

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Christoph-Thomas Germer

Die Rolle der NF- κ B-Aktivierung beim LPS-induzierten Zusammenbruch der Endothelbarriere

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Rhea Leweke
aus Tübingen

Würzburg, Juni 2013

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Nicolas Schlegel

Korreferent: Prof. Dr. med. Jens Waschke

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08. November 2013

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Bedeutung der Endothelbarriere und klinische Bezüge	1
1.2.	Aufbau und Regulation der Endothelbarriere	4
1.3.	Die Bedeutung von Lipopolysaccharid	5
1.4.	Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B	8
1.5.	Fragestellung	11
2.	Material und Methoden	12
2.1.	Material	12
2.1.1.	Zellkultur	12
2.1.2.	Testreagenzien	15
2.1.3.	Antikörper	17
2.2.	Zellbiologische Methoden	19
2.2.1.	Transfektion von HDMEC mit p65 siRNA	19
2.2.2.	Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie	19
2.2.3.	Nukleäre Proteinextraktion	21
2.2.4.	Proteinanalyse mittels Western Blot	21
2.2.5.	Messung des transendothelialen elektrischen Widerstands	26
2.2.6.	Spezifität der p65-Antikörper	27
2.3.	Angaben zur Statistik	29
3.	Ergebnisse	30
3.1.	LPS führt innerhalb von 30 Minuten zu einer deutlichen NF- κ B-Aktivierung in Endothelzellen	30
3.2	LPS veränderte weder Caveolin-1- noch VASP-Mengen in der Zelle	32

3.3	Bay 11-7082 sowie NEMO-binding domain (NBD)-Peptid verhinderten die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung, nicht jedoch ein erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel.....	34
3.4.	Erhöhung des cAMP-Spiegels durch Forskolin/Rolipram verstärkte die Aktivierung von NF- κ B.....	41
3.5.	IKK-NBD-Peptid verhinderte die LPS-induzierte Bildung interzellulärer Lücken in HDMEC nicht	43
3.6.	Hemmung der LPS-induzierten NF- κ B-Aktivierung hielt den Zusammenbruch der Endothelbarriere nicht auf.....	45
3.7.	Repression von p65 mittels siRNA verhinderte den LPS-induzierten Abfall des transendothelialen elektrischen Widerstands in HDMEC nicht	48
4.	Diskussion	50
4.1.	Spezifität der verwendeten NF- κ B p65 Antikörper	50
4.2.	NBD-Peptid verhindert die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung.....	51
4.3.	Hemmung der NF- κ B-Aktivierung verhindert den Zusammenbruch der Endothelbarriere nicht.....	55
4.4.	Die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung könnte einen „Rescue“-Mechanismus der Endothelbarriere initiieren	57
5.	Zusammenfassung der Ergebnisse	60
6.	Literaturverzeichnis.....	62

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
dag	donkey anti-goat
DAPI	4',6-Diamidine-2'-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent assay
ESAM	Endothelial-selective adhesion molecule
F/R	Forskolin/Rolipram
F-Actin	filamentäres Actin
FCS	fetales Kälberserum
gam	goat anti-mouse
garb	goat anti-rabbit
HDMEC	humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IL-1	Interleukin-1
IκB	Inhibitor of kappa B
IKK-NBD-Peptid	IκB (inhibitor of kappa B)-Kinase (IKK)-NEMO (NF-κB essential modifier)-binding domain (NBD)-Peptid
JAM	Junctional adhesion molecule
LBP	Lipopolysaccharide-binding protein
LPS	Lipopolysaccharid
n. t. siRNA	non-target small interfering RNA
NBD-Peptid	siehe IKK-NBD-Peptid

NDS	normal donkey serum
NEMO	NF- κ B essential modifier
NF- κ B	Nuclear factor of κ B
NGS	normal goat serum
NPG	n-propyl-gallat
PBS	phosphate buffered saline
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PSEC	pulmonale Schweineendothelzellen
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	sodium-dodecyl-sulfate
siRNA	small interfering RNA
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
TBS	Tris-buffered saline
TMED	N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin
TER	transendothelialer elektrischer Widerstand (transendothelial electric resistance)
TLR-4	Toll-like Rezeptor-4
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
VE-Cadherin	Vascular endothelial cadherin
ZO-1	Zonula occludens Protein-1

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Massive generalisierte Ödembildung bei einem an Sepsis erkrankten Patienten	2
Abbildung 2: Einwirkung von LPS führt im Rahmen einer akuten Entzündungsreaktion zur Schädigung der endothelialen Zell-Zell-Kontakte	3
Abbildung 3: Barrierestabilisierende und -destabilisierende Effekte im Endothel	5
Abbildung 4: Der Aufbau von Lipopolysaccharid	7
Abbildung 5: Der NF- κ B-Signalweg	9
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Nassblotverfahrens	25
Abbildung 7: Spezifische Erkennung von NF- κ B p65 durch den polyklonalen und den monoklonalen p65 Antikörper	28
Abbildung 8: LPS induzierte die NF- κ B-Aktivierung in Endothelzellen nach 30 min	32
Abbildung 9: LPS änderte die Proteinmengen von Caveolin-1 und VASP nicht.....	33
Abbildung 10: Bay 11-7082 hemmte die LPS- induzierte NF- κ B-Aktivierung vollständig, schien jedoch die LPS-induzierte Lückenbildung eher zu verstärken.....	36
Abbildung 11: NBD-Peptid hemmte die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung	38
Abbildung 12: NBD-Peptid blieb auch nach 24h Inkubationszeit wirksam.....	40
Abbildung 13: Erhöhte cAMP-Spiegel verstärkten die NF- κ B-Aktivierung nach 4 h in HDMEC	42
Abbildung 14: NBD-Peptid verhinderte die Bildung von interzellulären Lücken und Stressfasern nicht.....	44
Abbildung 15: Hemmung der LPS-induzierten NF- κ B-Aktivierung hielt den Zusammenbruch der Endothelbarriere nicht auf	47

Abbildung 16: Der LPS-induzierte TER-Abfall wurde durch Repression von
NF- κ B p65 nicht verhindert..... 49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Primärantikörper.....	18
Tabelle 2: verwendete Sekundärantikörper	18

1. Einleitung

1.1. Bedeutung der Endothelbarriere und klinische Bezüge

Das Endothel besteht aus einer kontinuierlichen Zellschicht, die die Innenauskleidung aller Blutgefäße bildet. Dieser Zellverband übernimmt die Funktion einer Barriere zwischen Blut und umliegendem Gewebe und vermittelt zudem den selektiven Stofftransport zwischen den beiden Kompartimenten sowie gezielte Zellmigration (Mehta and Malik, 2006a, Vandenbroucke et al., 2008).

Eine intakte Endothelbarriere stellt eine unabdingbare Voraussetzung für den Erhalt eines gesunden Organismus dar. Eine Störung oder Dysregulation der Barrierefunktion dagegen führt im Zuge von verschiedenen Krankheitsbildern wie Atherosklerose (Libby et al., 2006), Lungenödem (Dudek and Garcia, 2001), oder Entzündungsprozessen (Michel and Curry, 1999, Mehta and Malik, 2006a), besonders im Rahmen der systemischen Entzündungsreaktion und Sepsis, zu lebensbedrohlichen Zuständen.

Das Krankheitsbild der Sepsis wird als eine systemische Inflammation (SIRS= (Systemic inflammatory response syndrome) in Verbindung mit einer nachgewiesenen Infektion definiert. Dies geht mit einem Kreislauf- und häufig auch Organversagen einher und ist auch in Zeiten modernster Intensivmedizin eine der häufigsten und gefürchtetsten Komplikationen bei schwer kranken Patienten auf Intensivstationen, nicht selten mit Todesfolge (Levy et al., 2010). Durch die systemische Entzündungsreaktion kommt es zu einer generalisierten Ödembildung, welche einem Zusammenbruch der endothelialen Barrierefunktion zugrunde liegt. Ursache der Ödembildung ist dabei unter anderem eine Einwirkung verschiedener Noxen wie bakterieller Endotoxine oder proinflammatorischer Zytokine auf das Endothel der Blutgefäße, die dann im Rahmen einer akuten Entzündungsreaktion zur Schädigung der endothelialen Zell-Zell-Kontakte führen. Der daraus resultierende

Zusammenbruch der Endothelbarriere ist gekennzeichnet durch interzelluläre Lückenbildung mit Ödembildung durch Verlust intravasaler Flüssigkeit (Cinel and Dellinger, 2007, Lee and Slutsky, 2010) (s. Abb. 1).



Abbildung 1: Massive generalisierte Ödembildung bei einem an Sepsis erkrankten Patienten

Die Einwirkung verschiedener Noxen führt im Rahmen einer akuten Entzündungsreaktion im Endothel zur Schädigung der Zell-Zell-Kontakte mit konsekutiver generalisierter Ödembildung.

Schlegel, Chirurgische Klinik I, Universität Würzburg

Eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Sepsis spielt das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien wie *Escherichia coli* (Opal, 2007). Kommt es im Rahmen einer Immunreaktion oder auch einer Antibiotikatherapie zur Lyse der Bakterien, so dissoziiert LPS aus der Zellwand in die Blutbahn, wo es vom LPS-binding protein (LBP) gebunden wird. Dieser Komplex bindet seinerseits über den apikal gelegenen Toll-like Rezeptor-4 (TLR-4) an die Endothelzelle, was über verschiedene Mechanismen zu einem Aufbrechen der Interzellularkontakte und somit zum Zusammenbruch der Endothelbarriere führt (Cinel and Dellinger, 2007) (s. Abb. 2). Darüber hinaus ist bekannt, dass neben LPS auch proinflammatorische Zytokine wie etwa Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) ebenfalls interzelluläre

Lückenbildung auslösen können (Cinel and Dellinger, 2007, Gong et al., 2008, Bogatcheva et al., 2009, Schlegel et al., 2009, Schlegel and Waschke, 2009).

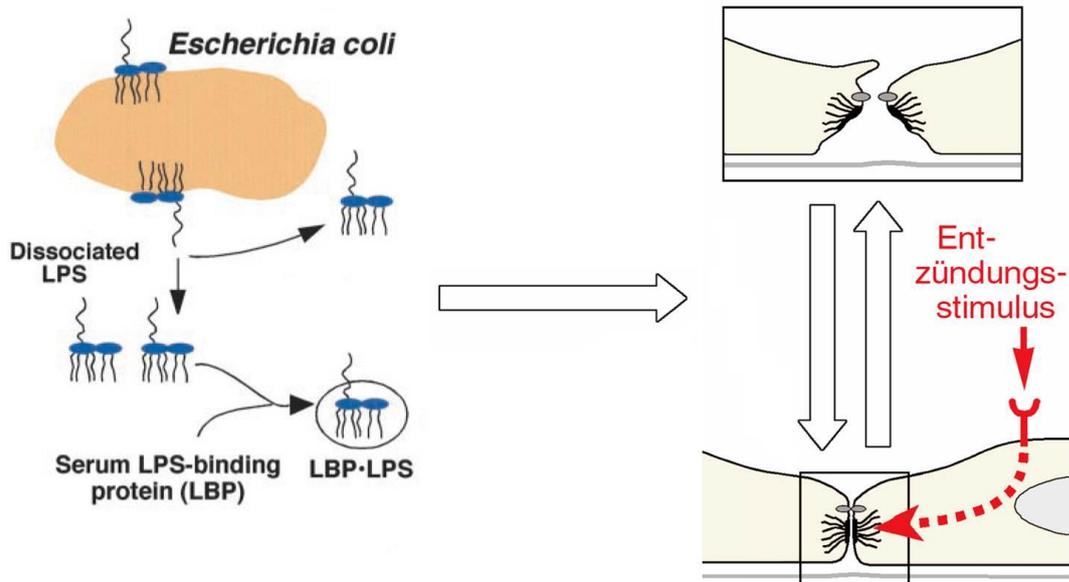


Abbildung 2: Einwirkung von LPS führt im Rahmen einer akuten Entzündungsreaktion zur Schädigung der endothelialen Zell-Zell-Kontakte

Kommt es zur Lyse von *E. coli*, so dissoziiert LPS aus der Bakterienzellwand ins Blut, wo es von LBP gebunden wird. Dieser Komplex bindet über TLR-4 an die Endothelzelle und löst ein Aufbrechen der Interzellulärkontakte und somit einen Zusammenbruch der Endothelbarriere aus.

Modifiziert nach Raetz und Whitfield, Benninghoff und Drenckhahn, Opal (Raetz and Whitfield, 2002, Benninghoff and Drenckhahn, 2004, Opal, 2007)

Es ist jedoch noch nicht abschließend geklärt, welche Signalwege entscheidend am entzündungsvermittelten Zusammenbruch der Endothelbarriere beteiligt sind. Aus diesem Grund existiert keine spezifische Therapie der endothelialen Schrankenstörung in der Sepsis. Es besteht also ein beträchtlicher Forschungsbedarf auf diesem Gebiet, sowohl im Hinblick auf das zellbiologische Verständnis dieses Krankheitsbildes als auch besonders auf den klinischen Bereich.

1.2. Aufbau und Regulation der Endothelbarriere

Die Endothelbarriere wird durch verschiedene Interzellularkontakte aufrechterhalten. Hierbei spielen die Occludenskontakte (Tight junctions) und die Adhärenskontakte (Adherens junctions) eine entscheidende Rolle (Abb. 3). Anders als im Epithelzellverband liegen die beiden genannten endothelialen Interzellularkontakte nicht in getrennten Abschnitten, sondern abwechselnd entlang der Zellgrenzen verteilt vor (Dejana, 2004).

Die Occludenskontakte oder Tight junctions dienen der Abdichtung des Interzellularspaltes. Die Hauptverankerungsproteine dieses Junctionstyps stellen Claudine (Claudin 1, 5 und 12) und Occludine dar. Zusätzlich erhalten ESAM (Endothelial-selective adhesion molecule) und JAMs (Junctional adhesion molecules A, B und C) die Zell-Zell-Adhäsion. Letztere sind zusätzlich mit Cingulin und Zonula occludens Protein-1 (ZO-1) verbunden, die als Adaptermoleküle die Kommunikation zum Actinzytoskelett herstellen.

Die Adhärenskontakte erhalten die mechanische Stabilität der Zell-Zell-Verbindung und sind aus dem endothelspezifischen VE-Cadherin (Vascular endothelial cadherin) aufgebaut. Auch dieses Adhäsionsprotein steht über verschiedene intrazelluläre Adaptermoleküle wie α -, β -, γ -Catenin, α -Aktinin und ZO-1 mit dem Actinzytoskelett in Kontakt. P-120-Catenin spielt zudem eine Rolle im Steuermechanismus der Expression von VE-Cadherin (Dejana, 2004, Mehta and Malik, 2006b).

Da alle Zellkontaktproteine über interzelluläre Adapterproteine mit dem kortikalen und intrazellulären Actinzytoskelett verbunden sind, haben Signalwege, die in direktem Zusammenhang mit dynamischen Vorgängen am Zytoskelett stehen, einen Effekt auf die Regulation der Integrität der Endothelbarriere (Spindler et al., 2010, Schick et al., 2012).

Hierbei konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass unter anderem GTPasen der Rho- (Ras-Homologie) Familie an der Regulation der Endothelbarriere maßgeblich beteiligt sind. Es konnte hierbei nachgewiesen werden, dass der sekundäre Botenstoff (second messenger) zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) in der Endothelzelle zu einer Aktivierung der

kleinen Rho-GTPase Rac1 führt. Diese übt über eine verstärkte Interaktion von Verbindungsproteinen mit dem kortikalen Actinzytoskelett eine barrirestabilisierende Wirkung aus. Intrazelluläre Erhöhung der Rho A-Aktivität aktiviert die Rho-Kinase, die ihrerseits über die Induktion kontraktile Effekte im Zytoskelett die Stabilität der interzellulären Junctionen vermindert und zu erhöhter endothelialer Permeabilität führt (Spindler et al., 2010).

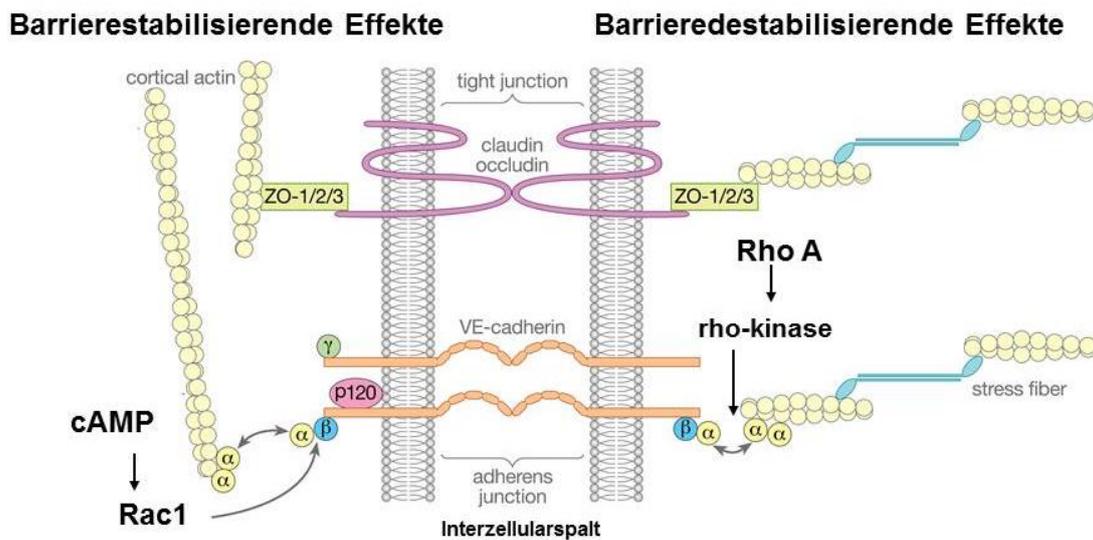


Abbildung 3: Barrirestabilisierende und -destabilisierende Effekte im Endothel

Die Endothelbarriere wird durch verschiedene Interzellularkontakte aufrechterhalten. Zum einen sind dies die Occludenskontakte (Tight junctions) und zum anderen die Adhärenskontakte (Adhärens junctions). Diese verbinden nicht nur die Zellmembranen benachbarter Zellen miteinander, sondern stellen auch einen Kontakt zum intrazellulären Actinzytoskelett dar. α , β , γ und p120 stehen für die entsprechenden Catenine.

Modifiziert nach: Spindler, Schlegel, Waschke Cardiovasc. Res. 2010 (Spindler et al., 2010)

1.3. Die Bedeutung von Lipopolysaccharid

1892 beschrieb der deutsche Bakteriologe Richard Pfeiffer erstmalig pathophysiologische Effekte in Meerschweinchen, denen er hitzeinaktivierte Lysate des Bakteriums *Vibrio cholerae* verabreicht hatte. Im Gegensatz zu den bereits bekannten hitzelabilen Exotoxinen nannte er den Verursacher dieser Effekte Endotoxin. Dieses befindet sich in der äußeren Zellwand aller

gramnegativer Bakterien wie auch dem weit verbreiteten Darmbakterium *Escherichia coli*, einem häufigen Auslöser der schweren Sepsis. Dieses Endotoxin besteht aus Lipopolysaccharid, kurz LPS, und wird inzwischen größtenteils synonym verwendet (Schletter et al., 1995). LPS ist aus drei Hauptkomponenten aufgebaut, einem inneren und äußeren Core-Oligosaccharid, einem O-Antigen aus sich wiederholenden Polysaccharidsequenzen und einer funktionelle Gruppe, Lipid A genannt (Abb. 4). Lipid A stellt die primär für die immunogene und proinflammatorische Wirkung von LPS verantwortliche Komponente von LPS dar. Aus diesem Grund bezeichnen einige Autoren auch nur diese funktionelle Gruppe von LPS als Endotoxin. Wie oben erwähnt, bindet aus der Zellwand dissoziiertes LPS über Lipid A unter anderem an den endothelialen Toll-like Rezeptor-4 (TLR-4). Dessen Aktivierung wiederum löst eine Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α oder IL-1 aus – im Rahmen der Sepsis in solchem Ausmaß, dass die charakteristischen Symptome des Krankheitsbildes auftreten (Raetz and Whitfield, 2002, Opal, 2007).

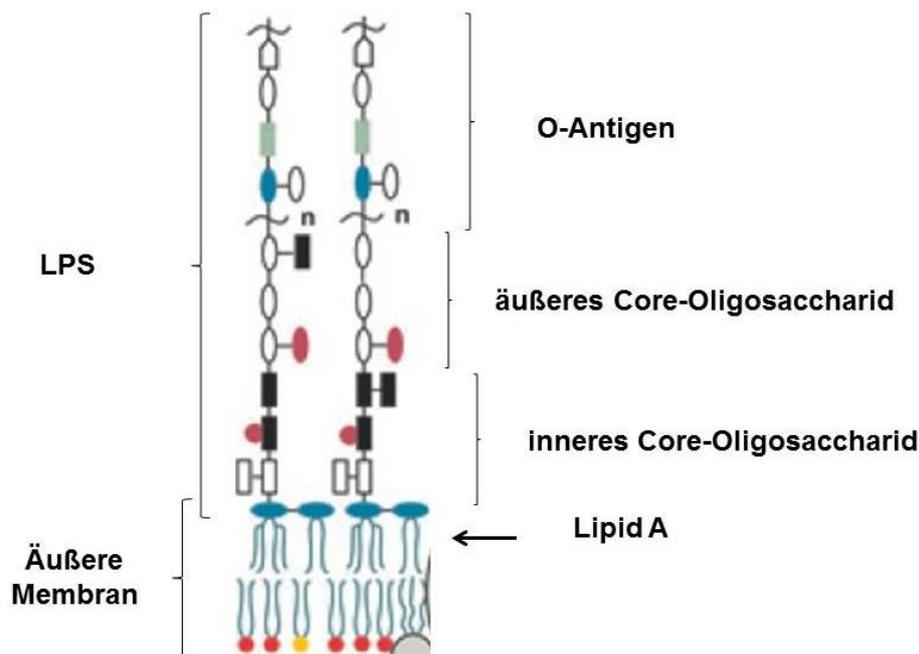


Abbildung 4: Der Aufbau von Lipopolysaccharid

LPS besteht aus drei Hauptkomponenten, einem inneren und äußeren Core-Oligosaccharid, einem O-Antigen aus sich wiederholenden Polysaccharidsequenzen und einer funktionelle Gruppe, Lipid A genannt.

Modifiziert nach Raetz und Whitfield (Raetz and Whitfield, 2002)

Seit der Entdeckung des Endotoxins beschäftigen sich zahlreiche Wissenschaftler mit LPS und nutzen seine potenten immunogenen und proinflammatorischen Eigenschaften für Untersuchungen in diversen Forschungsbereichen. Besonders in der Sepsisforschung spielt LPS eine bedeutende Rolle als Modellsubstanz.

Es sind bereits mehrere Pathomechanismen des LPS-induzierten Zusammenbruchs der Endothelbarriere im Rahmen der Sepsis untersucht worden. So wurde unter LPS-Einwirkung eine Fragmentierung des Barriereproteins VE-Cadherin sowie eine Herunterregulation von Claudin-5 beobachtet (Schlegel and Waschke, 2009). Ein bekannter pathogener Effekt von LPS ist in diesem Zusammenhang das Absenken des cAMP-Spiegels in der Endothelzelle. Dies bewirkt eine Inaktivierung der barrierestabilisierenden kleinen Rho-GTPase Rac 1 und somit eine gesteigerte parazelluläre

Permeabilität in vivo und in vitro (Schlegel et al., 2009). Zugleich führt LPS zu einer Aktivitätssteigerung von Rho A, ebenfalls einer kleinen GTPase, der eine entscheidende Bedeutung für die Bildung von Actin-Stressfasern beigemessen wird. Diese wiederum aktiviert die Rho-Kinase, was letztendlich zu einer Permeabilitätssteigerung des Endothels führt (Wojciak-Stothard and Ridley, 2002). Es wurde außerdem eine apoptotische Wirkung von LPS auf Endothelzellen nachgewiesen (Bannerman and Goldblum, 2003), die sich jedoch nicht als entscheidender Faktor für den Barrierezusammenbruch erwiesen hat (Schlegel et al., 2009).

Ein weiterer wichtiger durch LPS angestoßener Signalweg resultiert in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der neben Immunprozessen auch entzündungsassoziierte Prozesse im Endothel reguliert und in diesem Zusammenhang als Induktor des Zusammenbruchs der Endothelbarriere vorgeschlagen wurde (Tirupathi et al., 2008, Henes et al., 2009).

1.4. Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B (nuclear factor κ B) erhielt seinen Namen im Jahre 1986 durch seine Erstbeschreibung als Kernfaktor, der an ein Enhancerelement des κ -Leichtkettengens von Immunglobulinen aus B-Lymphozyten gebunden ist. Entgegen der anfänglichen Annahme, dass es sich um einen B-Lymphozytenspezifischen Transkriptionsfaktor handele, wurde bald bekannt, dass NF- κ B in nahezu allen Zellen vorhanden ist, wenn auch in überwiegend inaktiver Form im Zytoplasma (Sen and Baltimore, 1986, Rothwarf and Karin, 1999).

NF- κ B besteht aus mehreren Untereinheiten, p50, p52, p65/RelA, RelB und c-Rel, die im Ruhezustand im Zytoplasma an die α -Untereinheit des Inhibitorproteins I- κ B gebunden vorliegen. Unter Anwesenheit von LPS oder proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α oder IL-1 kommt es in der Zelle zu einer Aktivierung von I- κ -Kinasen (IKK α , β , γ), die ihrerseits I- κ B durch Phosphorylierung der Serinreste 32 und 36 aktivieren. Es kommt zur Ubiquitinierung und zum proteosomalen Abbau des Inhibitorproteins I- κ B. In der

Folge dissoziieren die aus ihrer Bindung befreiten NF- κ B-Untereinheiten p50 und p65 aus ihrer Bindung, translozieren in den Zellkern, wo es schließlich zur Aktivierung oder Repression der Transkription bestimmter DNA-Abschnitte kommt (Ghosh et al., 1998) (s. Abb. 5). Somit wird die Translokation der p50 und p65 Untereinheiten in den Zellkern als Aktivierung des NF- κ B Signalwegs betrachtet.

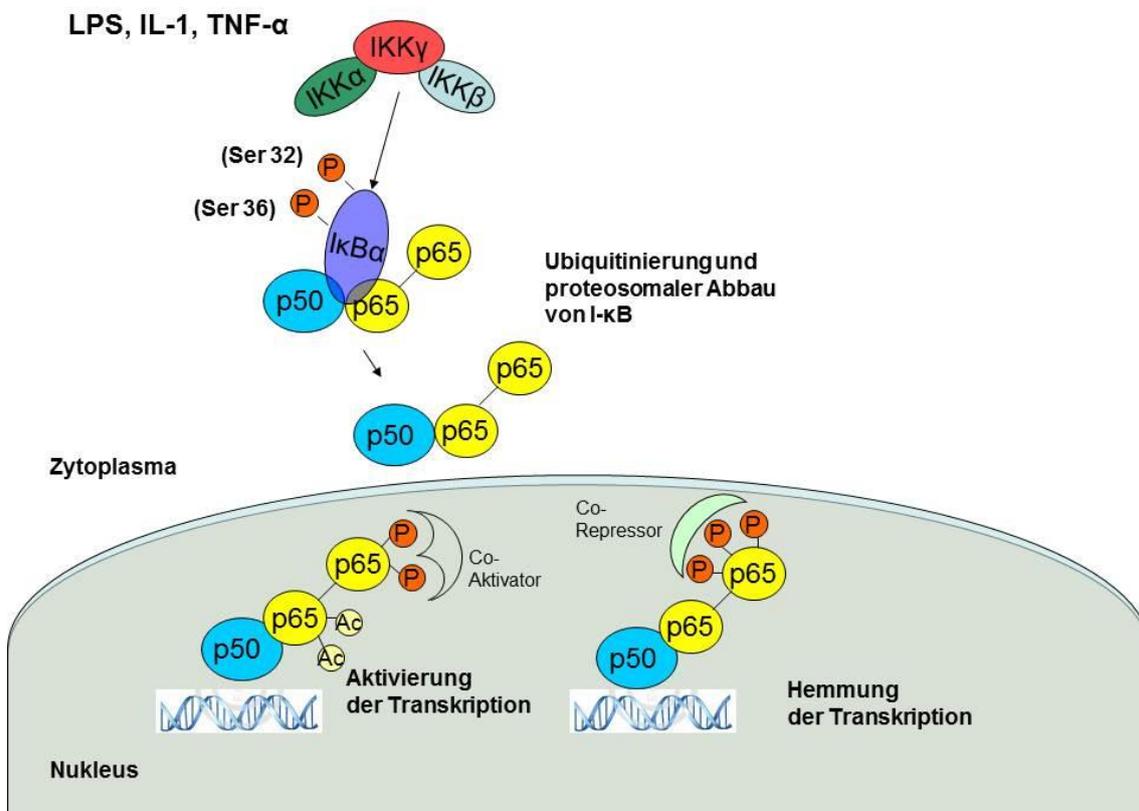


Abbildung 5: Der NF- κ B-Signalweg

LPS und proinflammatorische Zytokine aktivieren I- κ -Kinasen, die ihrerseits das Inhibitorprotein I- κ B durch Phosphorylierung aktivieren. I- κ B entlässt daraufhin die NF- κ B-Untereinheiten p50 und p65, diese translozieren in den Zellkern und aktivieren oder hemmen dort die Transkription bestimmter Zielgenabschnitte.

Wie bereits seit längerer Zeit bekannt ist, kommt es in Immunzellen im Zuge einer akuten Entzündungsreaktion zu einer Aktivierung von NF- κ B, die zu einer Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine, Chemokine, antimikrobieller Peptide und antiapoptotischer Proteine führt. Auch im Rahmen

vieler chronisch-entzündlicher Erkrankungen konnte eine konstitutiv erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors in Zellen des Immunsystems nachgewiesen werden. (Ghosh et al., 1998, Krishnaswamy et al., 1999, Li and Verma, 2002, Bonizzi and Karin, 2004)

Doch neben seiner Rolle in Zellen des Immunsystems ist die Aktivierung von NF- κ B auch in Endothelzellen von Bedeutung. In diesem Zusammenhang wurde diskutiert, dass die entzündungsassoziierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors möglicherweise entscheidend am LPS-induzierten Zusammenbruch der Endothelbarriere beteiligt ist.

Es wurden bereits einige Mechanismen hierfür vorgeschlagen. So könnte eine inflammationsassoziierte NF- κ B-Aktivierung eine Repression des Actin-regulierenden Proteins Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) nach sich ziehen (Henes et al., 2009). In der Vergangenheit wurde nachgewiesen, dass dieses Protein für die Aufrechterhaltung der Endothelbarriere von großer Bedeutung ist (Schlegel and Waschke, 2010).

Es wurde auch gezeigt, dass eine NF- κ B-Aktivierung zu einer intrazellulären Erhöhung von Caveolin-1, einem membranständigen Oberflächenprotein, das unter anderem am Membrantransport beteiligt ist, führt und somit zu einem Anstieg der transzellulären Permeabilität (Tiruppathi et al., 2008). Vor dem Hintergrund, dass die *parazelluläre* Permeabilität als Folge eines entzündungsinduzierten Zusammenbruchs der Endothelbarriere die vorrangige Rolle spielt, ist die pathophysiologische Bedeutung dieser Beobachtung zu klären.

Der Frage, ob die Aktivierung von NF- κ B entscheidend am Zusammenbruch der Endothelbarriere beteiligt ist, wurde auf zellulärer Ebene jedoch bisher nicht ausreichend nachgegangen.

1.5. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung eine entscheidende Rolle beim Zusammenbruch der Endothelbarriere spielt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurde mit zwei primären Endothelzelllinien gearbeitet. Zum einen wurden PSEC (pulmonal artery swine endothelial cells), auch als PAEC (porcine pulmonary artery endothelial cells) bezeichnet, als makrovaskuläre Zelllinie und zum anderen HDMEC (human dermal microvascular endothelial cells) verwendet.

Die Haltung der Zellkulturen erfolgte in einem offenen System im CO₂-auto-zero-Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 80% Luftfeuchtigkeit. Als Kulturmedien wurden M199 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) für PSEC-Kulturen und supplementiertes Endothel-Wachstumsmedium (Endothelial Growth Medium, PromoCell, Heidelberg) für HDMEC verwendet. Die Medien wurden vor Gebrauch mit 2,5 ml Penicillin-G/Streptomycin (Pen/Strep-Stammlösung: je 10000 U Penicillin und Streptomycin pro 1000 ml PBS, pH 5,58) und 10 % fetalem Kälberserum (FCS) versetzt. Das Medium für HDMEC wurde als gebrauchsfertige Lösung, M199 als Pulvermischung geliefert. Für den Gebrauch wurde M199 in H₂O_{dest} gelöst und mit NaHCO₃ auf einen pH von 7,5 gepuffert, anschließend steril filtriert und bei 4 °C gelagert. In der Zellkultur erfolgte jeden zweiten Tag ein Mediumswechsel, M199 wurde zuvor auf 37 °C erwärmt, Endothelial Growth Medium bei Raumtemperatur verwendet.

2.1.1.1. PSEC

2.1.1.1.1. Isolierung und Präparation

Zur Präparation der primären makrovaskulären pulmonalen Schweineendothelzellen (PSEC) wurden Trunci pulmonales aus frisch geschlachteten Schweinen vom Schlachthof bezogen. Zunächst wurde jeder

Truncus pulmonalis von Fettresten befreit und mit sterilem PBS (= phosphat buffered saline: 0,137 M NaCl; 2,68 mM KCl; 9,58 mM Na₂HPO₄ und 1,47 mM KH₂PO₄ in Aqua bidest.) gespült. Um die Endothelzellen abzulösen, wurde das Blutgefäß unter sterilen Bedingungen mit ca. 3 ml Kollagenase A-Lösung (1 mg/ml in PBS) gefüllt, die Enden wurden dabei mit Klemmen verschlossen. Nach 15-minütiger Inkubation in angewärmtem PBS konnten die abgelösten Zellen mit 2x5 ml FCS-freiem M199 in ein Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert werden. Das Zellsediment wurde dann pro Arterienstück in 5 ml Aussaatmedium (M199 + 20% FCS) resuspendiert und auf eine T25-Kulturflasche (25 cm² Fläche) überführt. Das Medium wurde zum ersten Mal nach drei Stunden gewechselt, dann am folgenden Tag und danach wie in der Routinekultur nach zwei Tagen. Nach frühestens einer Woche konnte die erste Ablösung und Aufteilung auf weitere Kulturschalen (Splittung) vorgenommen werden (Baumer et al., 2008).

2.1.1.1.2. Routinekultur

PSEC wachsen besonders gut auf mit Kollagen (Gelatine) beschichteten Oberflächen.

Gelatinieren von Kulturflaschen und Petrischalen

Vor dem Überführen der Zellen in Kulturflaschen, Petrischalen oder Elektrodenschalen mussten diese gelatiniert werden. Dazu wurde der Boden mit 0,5 % Gelatine in H₂O bedeckt. Nach 30 min wurde die Gelatinelösung abgesaugt, das Behältnis mit PBS gespült und Medium vorgelegt.

Gelatinieren von Deckgläschen

Deckgläschen wurden 30 min in 0,5 % Gelatine in H₂O geschwenkt. Die Lösung wurde abgesaugt und die beschichteten Waren anschließend, zur

Quervernetzung der Gelatineschicht, weitere 30 min in 2 % Glutaraldehyd in PBS inkubiert (Schnittler et al., 1993). Nach dreimalig zehnmütigem Waschen in PBS ließen sich die Deckgläschen in mit Pen/Strep versetztem PBS (10000 U/l, Verhältnis 1:100) bei 4 °C aufbewahren.

Die auf T25-Kulturflaschen in 5 ml Aussaatmedium angewachsenen Zellen wurden bei Konfluenz nach 5-7 Tagen im Verhältnis 1:3 aufgesplittet. Sie wurden dazu nach vorsichtigem Abspülen mit Trypsin durch dreiminütige Trypsininkubation bei 37 °C abgelöst und auf neue Kulturflaschen, Petrischalen, Deckgläschen oder Elektrodenwells überführt und von nun an mit Kulturmedium (M199 + 10% FCS + Pen/Strep) versorgt. In allen Experimenten wurden Zellen aus Passage 1-2, zur Herstellung von Zelllysaten auch aus Passage 3, verwendet, die einen konfluenten Zellrasen gebildet hatten.

2.1.1.2. HDMEC

Die Zellen wurden auf ungelatinierten Gefäßen kultiviert. Bevor die nach 7-10 Tagen konfluenten Zellrasen gesplittet und im Verhältnis 1:3 ausgesät werden konnten, wurde das in die vorgesehenen Kulturgefäße vorgelegte Medium für 30 min im Brutschrank inkubiert, um Temperatur und pH für die frisch abtrypsinieren Zellen optimal einzustellen. Die abzulösenden Zellen wurden zunächst mit 100 µl/cm² HEPES/BSA-Lösung (PromoCell) abgespült, bevor sie dann durch dreiminütige Inkubation mit 100 µl/cm² Trypsin-Lösung (Trypsin/EGTA, PromoCell) bei Raumtemperatur abgelöst wurden. Abschließend wurde 100 µl/cm² Trypsin-Neutralisations-Lösung hinzugefügt. Für die Versuche wurden konfluente HDMEC der Passagen 1-6 verwendet.

2.1.2. Testreagenzien

2.1.2.1. Bay 11-7082

Bay 11-7082 ((E)-3-(4-Methylphenylsulfonyl)-2-propenenitril) verhindert die Zytokin-induzierte Phosphorylierung von I κ B- α und somit die Aktivierung von NF- κ B (Pierce et al., 1997).

Im Experiment wurde Bay 11-7082 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) zur 60-minütigen Vorinkubation in einer 20 μ M Endkonzentration eingesetzt.

2.1.2.2. IKK-NBD-Peptid

I κ B (inhibitor of kappa B)-Kinase (IKK)-NEMO (NF- κ B essential modifier)-binding domain (NBD)-Peptid verhindert die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung, indem es die Interaktion der regulatorischen Untereinheit IKK γ (=NEMO) mit dem IKK-Komplex blockiert (May et al., 2000, Tiruppathi et al., 2008).

Zellgängiges IKK-NBD-Peptid (BML-P607-0500; Enzo Life Sciences, Lörrach) wurde in 100 μ M Verdünnung eingesetzt, dabei wurden die Zellen in den jeweiligen Experimenten 60 min mit dem Peptid vorinkubiert.

2.1.2.3. Forskolin/Rolipram

Forskolin, gewonnen aus dem Harfenkraut (*Coleus forskohlii*), stimuliert die Adenylatzyklase, Rolipram hingegen hemmt die Phosphodiesterase-4. Beide führen so zu einem intrazellulären Anstieg von cAMP, der erwiesenermaßen protektiv auf die Endothelbarriere wirkt (Waschke et al., 2004).

Forskolin und Rolipram (beide Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurden, wie vom Hersteller empfohlen und in der entsprechenden Literatur beschrieben (May et al., 2000, Tiruppathi et al., 2008), in Konzentrationen von 5 μ M bzw. 10 μ M ebenfalls zur 60-minütigen Vorinkubation verwendet.

2.1.2.4. LPS

Eingesetzt wurde LPS aus *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma, L2630; Deisenhofen) mit einem Endotoxingehalt von mindestens 500000 EU (endotoxin units)/mg in einer Konzentration von 100 ng/ml.

2.1.2.5. siRNA

Small interfering RNA (siRNA) sind einzel- oder doppelsträngige Ribonucleinsäuremoleküle, die aus etwa 20-30 Nucleotiden bestehen. Sie codieren keine Proteine, sind aber ein wichtiges Instrument zur Abwehr und Zerstörung fremder RNA, beispielsweise aus Viren, sowie zur Regulation der Genexpression über postranskriptionelles Gene-silencing. Der Arbeitsmechanismus besteht dabei aus drei Schritten. Zunächst wird die doppelsträngige DNA durch das Enzym Ribonuclease III zu RNA-Paaren prozessiert. Daraufhin werden diese Paare entwunden und einer der nun getrennten siRNA-Stränge, als Führungsstrang bezeichnet, wird an den sogenannten RNA-induzierten silencing-Komplex (RISC) geheftet. Dieser Komplex sucht gezielt nach transkribierten Genabschnitten und somit potenzieller Ziel-RNA. Die an den RISC gebundene Führungsstrang-RNA steuert schließlich eine im Komplex enthaltene Endonuklease zu zu diesem Einzelstrang homologer mRNA hin, um jene zu spalten. Dies geschieht in mehreren Durchgängen und führt zum Abbau der durch den Führungsstrang bestimmten und zu diesem homologen RNA-Sequenz (Siomi and Siomi, 2009). Besonders die Grundlagenforschung macht sich diesen Mechanismus zur gezielten Abschaltung eines zu untersuchenden Gens zunutze.

2.1.2.5.1. non-target siRNA

Als Negativkontrolle setzten wir lyophilisierte non-target siRNA-A (Santa Cruz, Heidelberg) ein.

2.1.2.5.2. p65 siRNA

Zur gezielten Ausschaltung von p65 NF- κ B und damit Hemmung der NF- κ B-Aktivierung in menschlichen Zellkulturen wurde eine zielspezifische humane lyophilisierte siRNA (Santa Cruz, Heidelberg) verwendet.

Zur Zubereitung der Transfektionslösungen wurden zunächst je 6 μ l non-target bzw. p65 siRNA duplex (entspricht 0,75 μ g siRNA) in 94 μ l Transfektionsmedium (Santa Cruz, Heidelberg, serumreduziertes modifiziertes Eagle's Minimal Essential Medium, mit HEPES und Natriumbicarbonat gepuffert und mit Hypoxanthin, Thymidin, Natriumpyruvat, L-Glutamin, Spurenelementen, Wachstumsfaktoren und Phenolrot versetzt) gelöst. Ebenfalls wurden 6 μ l Transfektionsreagenz, das die Freisetzung der siRNA bei geringer Zelltoxizität erleichtern soll (Santa Cruz, Heidelberg), in 94 μ l Transfektionsmedium solubilisiert. Die beiden Lösungen wurden nun vorsichtig vermischt und 45 min bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verwendung inkubiert.

2.1.3. Antikörper

Für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie und zur Immundetektion im Western Blot wurden mehrere Antikörper verwendet. Hierbei wurden gegen Epitope des zu untersuchenden Zielproteins gerichtete Primärantikörper eingesetzt (Tab. 1). Die fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Sekundärantikörper (Tab. 2) erkennen den Fc-Teil des jeweiligen Primärantikörpers.

Zur Färbung von Actin wurde das Fluorophor ALEXA 488 (Morbitec, Göttingen), gekoppelt an Phalloidin, ein Toxin des Knollenblätterpilzes, das spezifisch an filamentäres (F-) Actin bindet, verwendet (1:60 in PBS).

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ist ein Immunfluoreszenzfarbstoff, der sich an die kleine Furche Arginin-Thymidin-reicher DNA-Sequenzen anlagert und hier zur Darstellung der Zellkernintegrität eingesetzt wurde. (Kapuscinski, 1995)

Tabelle 1: verwendete Primärantikörper				
Antikörper	Typ	Hersteller	Konzentration (in PBS)	
			IF	Blot
a-NF-κB p65	polyklonal	Biozol, Eching	1:100	1:1000
a-NF-κB p65	monoklonal	Santa Cruz, Heidelberg	-	1:1000
a-VE-Cadherin	polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg	1:100	-
a-Caveolin-1	polyklonal	BD Biosciences, Heidelberg	1:1000	-
a-Claudin-5	polyklonal	Zymed/Invitrogen, Carlsbad	1:50	1:500
a-VASP	polyklonal	Immunoglobine, Himmelstadt	-	1:1000
a-β-Actin	monoklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	-	1:1000
a-Lamin A	polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg	-	1:1000

Tabelle 2: verwendete Sekundärantikörper				
Antikörper	Abkürzung	Hersteller	Konzentration (in PBS)	
			Cy2/3-gek.	POX-gek.
Ziege-anti-Kaninchen	garb	Dianova, Hamburg	1:600	1:3000
Ziege-anti-Maus	gam	Dianova, Hamburg	1:600	1:3000
Ziege-anti-Ratte	gart	Dianova, Hamburg	1:600	1:3000
Esel-anti-Ziege	dag	Dianova, Hamburg	1:600	-

2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.1. Transfektion von HDMEC mit p65 siRNA

HDMEC wurden bis zu 80 %-iger Konfluenz kultiviert. Vor der Transfektion wurde das Kulturmedium abgesaugt und einmal mit Transfektionsmedium gewaschen. Die nach obiger Beschreibung hergestellten Lösungen aus non-target bzw. p65 siRNA duplex und Transfektionsreagenz wurden jeweils mit weiteren 800 µl Transfektionsmedium verdünnt. Die Zellen wurden anschließend mit entsprechend angegebenen Mengen dieser Lösungen (8 x 100 µl pro 8-Loch-Elektrodenschale und 250 µl pro Petrischale) bedeckt und 6 h bei 37 °C inkubiert. Jeweils die Hälfte der Zellen wurde mit humaner p65 siRNA versetzt, die andere Hälfte diente als Kontrolle und wurde mit zerkleinerter non-target siRNA inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde das mit der jeweiligen siRNA versehene Medium entfernt und durch frisches HDMEC Medium ersetzt. Daraufhin wurden die Endothelzellen für weitere 20 h bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Nach einem erneuten Wechsel des HDMEC Mediums und weiteren 24 h waren die Zellen nun bereit für die unten beschriebenen Versuchsmethoden. Um eine erfolgreiche Herunterregulation von p65 zu verifizieren und somit eine gelungene Transfektion nachzuweisen, wurden sie zum einen als Zelllysate für Western Blot-Experimente verwendet, zum anderen wurden an den transfizierten Zellen Messungen des transendothelialen elektrischen Widerstands durchgeführt.

2.2.2. Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Diese Methode dient der Darstellung bestimmter zellulärer Strukturen. Dazu wurden spezifische, gegen die Epitope der Zielstruktur gerichtete Primärantikörper verwendet. Deren Fc-Teil wiederum wird von einem Sekundärantikörper gebunden, an den ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Angeregt durch Licht bestimmter Wellenlänge emittieren diese Fluorophore sichtbares Licht. So

emittiert Indocarbocyanin (Cy 3) rotes Licht, Carbocyanin (Cy 2), ALEXA Fluor 488-Phalloidin grünes und DAPI blaues.

Die Zellen wurden auf runde Deckgläschen (\varnothing 12 mm) ausgesät und nach Konfluenz mit den jeweiligen Toxinen und Mediatoren behandelt. Anschließend wurden die Zellen 10 min mit 2 % Formalin (frisch aus Paraformaldehyd, PFA, gewonnen) auf den Deckgläschen fixiert, dreimal mit PBS gewaschen und für weitere 5 min mit 0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen auf Objektträger überführt und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 30 min bei Raumtemperatur mit je 15 μ l BSA-NDS (normal donkey serum, 0,1 % Rinderse- rumalbumin mit 10 % Eselserum in PBS) bedeckt. Nach vorsichtigem Absaugen des BSA-NDS, wurden die Zellen mit je 15 μ l Primärantikörper (s. Tab. 1) in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Vor Zugabe des Sekundärantikörpers wurden die Zellen dreimal mit PBS gespült. Nun wurden sie für 1,5 bis 2 h bei Raumtemperatur mit 15 μ l des entsprechenden Sekundärantikörpers inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen mit der zellbedeckten Seite nach unten auf Objektträger mit einem Tropfen NPG (1 % n-propyl-Gallat mit 60 % Glycerin) überführt, um die Präparate vor Ausbleichen zu schützen (Giloh and Sedat, 1982).

Nun konnten die Präparate durch ein Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden und mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (LSM 510; Carl Zeiss Microimaging Inc., Göttingen, Germany) oder mit einem Zeiss Axioskop mit angeschlossener Spot Digitalkamera (Visitron Systems, Puchheim) digitalisiert werden. Zur Quantifizierung der Kerntranslokationsuntersuchungen wurde mit Hilfe von Microsoft Image J die Fluoreszenzintensität innerhalb eines Quadrates gemessen. Es wurden pro Zelle je zwei Quadrate im Zytoplasma und je zwei identisch große Areale im Nukleus positioniert und die gemessenen Intensitäten verglichen. Schließlich wurde der Quotient aus nukleärer und zytoplasmatischer Fluoreszenzintensität gebildet, auch als F_n/c bezeichnet (Rauert et al., 2010). Auf diese Weise wurden pro Versuchsbedingung mindestens 120 Zellen aus wenigstens vier unabhängigen Experimenten ausgewertet.

2.2.3. Nukleäre Proteinextraktion

Kernextrakte wurden wie in folgender Beschreibung aus PSEC gewonnen (Corsini et al., 1997). Die in 60 mm Petrischalen zur Konfluenz gewachsenen Zellen wurden einmalig mit kaltem PBS gewaschen und mit jeweils 2 ml hypotonem Lysepuffer versetzt (Puffer A: 10 mM Hepes, pH 7.8, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden je 125 µl Nonidet P-40-Lösung (Sigma) auf die Zellen gegeben. Diese wurden sodann abgekratzt, für 15 sec gründlich durchmischt und für weitere 30 sec bei 12000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Die im Pellet befindlichen Zellkerne wurden mit je 400 µl Puffer A sowie 25 µl 10 % Nonidet P-40 gewaschen, erneut zentrifugiert und danach in 50 µl Puffer C (50 mM Hepes, pH 7.8, 50 mM KCl, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 0.1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 % (v/v) glycerol) suspendiert. Nach weiterem 20-minütigem Mischen und 5-minütigem Zentrifugieren bei 1000 rpm wurde der Überstand abgenommen, die Konzentration der darin befindlichen Kernproteine bestimmt, und die Proben bis zur Verwendung in der unten beschriebenen Elektrophorese bei -80 °C gelagert.

2.2.4. Proteinanalyse mittels Western Blot

Diese Analyse dient dem Nachweis des Vorhandenseins bestimmter Proteine oder einer Mengenveränderung derselben in einem Zelllysat.

2.2.4.1. Herstellung von Zelllysaten

Die auf einer Petrischale konfluent gewachsenen Zellen wurden nach Absaugen des Mediums mit PBS gespült, anschließend mit 80 µl dreifach konzentriertem SDS-Probenpuffer mit DTE (Dithiothreitol, spaltet Disulfidbrücken) abgekratzt und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Vor der Weiterverwendung wurden die Proben mit Ultraschall zerstört.

2.2.4.2. Amidoschwarz-Proteinkonzentrationsbestimmung

Diese Methode ermöglicht die Bestimmung des Proteingehalts auch in Anwesenheit hoher Konzentrationen von Detergenzien (Nakamura et al., 1985) und ist somit auch für in SDS-Puffer gelöste Proben geeignet. Der Farbstoff Amidoschwarz bindet bei niedrigen pH-Werten an Amidstickstoffe des Proteingemisches und kann so photometrisch bei 620 nm detektiert werden.

Zunächst wurde ein Zelluloseacetatstreifen in 1 cm² große Streifen unterteilt und frei schwebend zwischen zwei Metallklemmen aufgehängt. Auf die jeweiligen Felder wurden je 5 µl der Zelllysate-Proben aufgetragen, ebenso die Proteinstandards aus BSA in den Konzentrationen 1.25, 2.5, 5, 10, 20 und 40 µg/µl. Nach 20 min Trocknen bei Raumtemperatur wurden die Streifen 10 min in der Färbelösung [0,5 % (w/v) Amidoschwarz, 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure und 45 % (v/v) Aqua dest.] geschwenkt. Anschließend wurde der Farbstoff mittels Entfärbelösung [47,5 % (v/v) Methanol, 5 % (v/v) Essigsäure und 47,5 % (v/v) Aqua dest.] so lange abgewaschen, bis die proteinfreien Abschnitte vollständig von Farbstoffresten befreit waren. Die Streifen wurden abermals getrocknet, danach den Unterteilungen gemäß zerschnitten und in Eppendorfgefäße überführt. Jedem Streifenzuschnitt wurde 1 ml Lyselösung [2 % (w/v) Trichloressigsäure, 16 % (v/v) Ameisensäure, 2 % (v/v) Essigsäure, 82 % (v/v) Aqua dest.] zugefügt, mit Hilfe derer sich die Membranen bei 50 °C über 30 min auflösten. Nach gründlichem Durchmischen der Proben ließ sich im Photometer bei 620 nm die Absorption messen und die Gesamtproteinmenge anhand der Eichstandards bestimmen.

2.2.4.3. SDS-PAGE

Das Prinzip der von Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese beruht auf der Trennung von Proteinen auf Grund unterschiedlicher Laufgeschwindigkeiten durch eine polymerisierte Gelmatrix aus Acrylamid und Bisacrylamid im elektrischen Feld (Laemmli, 1970). Das in Gel und Probenpuffer enthaltene anionische SDS bindet an die Proteine in der Probe, führt zu deren Denaturierung und maskiert durch Besetzung mit negativen Ladungen sämtliche Eigenladungen. Die Denaturierung wird zudem durch Erhitzen der Proben auf 95 °C unterstützt. Folglich wandern nach Anlegen einer Spannung alle nun negativ geladenen und in linearer Form vorliegenden Proteine zur Anode und werden dabei ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Gemäß der Methode nach Laemmli wurden die Zelllysate-Proben in 5 % (v/v) Polyacrylamid-Gel gesammelt und dann in 10 % oder 15 % (v/v) Gel aufgetrennt.

Als Initiator der Gelpolymerisation diente APS (Ammoniumpersulfat), als Katalysator TMED (Tetramethylethyldiamin).

Zwischen zwei durch einen 1 mm dicken Abstandhalter getrennte Glasplatten wurde zunächst das Trenngel gegossen und mit Aqua dest. überschichtet, um Luftausschluss und eine ebene Oberfläche zu gewährleisten. Nach Polymerisation wurde das Wasser entfernt, das Sammelgel aufgegossen und ein Taschenkamm aufgesetzt. In die so entstandenen Taschen wurden die einzelnen Proben in ihrer mittels Amidoschwarz bestimmten Gesamtproteinkonzentration entsprechender Menge gefüllt. Zur Größenordnung der getrennten Proteine wurde in eine Tasche eines jeden Gels ein Gemisch von Proteinen bekannter Größe gegeben (PPL-Marker, prestained protein ladder, Fermentas, St. Leon-Rot). Die Elektrophorese wurde in einfach konzentriertem Elektrophoresepuffer (50 g SDS, 720 g Glycin, 150 g Tris, ad 100 ml Aqua dest., vor Gebrauch 1:4 verdünnt in Aqua dest.) bei einer Spannung von 80 V im Sammelgel und bis zu 140 V im Trenngel gegen Ende der Elektrophorese durchgeführt, bis die Lauffront aus dem Gel herausgelaufen war. Das Gel wurde nun für einen Immunoblot weiterverwendet (s.u.).

2.2.4.4. Western Blot

Zur Immunodetektion der aufgetrennten Proteine wurden diese nach der SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran mit hoher Proteinaffinität überführt. Der Transfer fand im Nassblotverfahren in vertikalen Blotkammern statt (Towbin et al., 1992).

Auf zwei mit Transferpuffer [25mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol] getränkte Filterpapiere, sogenannte Whatman-Paper, wurde eine gleichgroße Nitrozellulosemembran (Hybond-C extra, Amersham, Braunschweig) gelegt. Darauf wurde das Gel nach Abtrennen des Sammelgels blasenfrei positioniert und mit zwei weiteren getränkten Filterpapieren bedeckt. Diese Anordnung wurde zwischen zwei Fiber-Schwämme in die Halterung geklemmt und der Wanderungsrichtung der Proteine zur Anode entsprechend so in die Blotkammer gestellt, dass das Gel zur Kathode und die Nitrozellulosemembran zur Anode der Blotapparatur zeigten. Für den Proteintransfer wurde ein Stromfluss von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ über 90 min angelegt (s. Abb. 6).

Zur Kontrolle des Transfers konnten die Proteine nun 1-2 min mit Ponceau rot angefärbt werden, sodass nach Entfärben der Membran mit Aqua dest. das Bandenmuster sichtbar wurde.

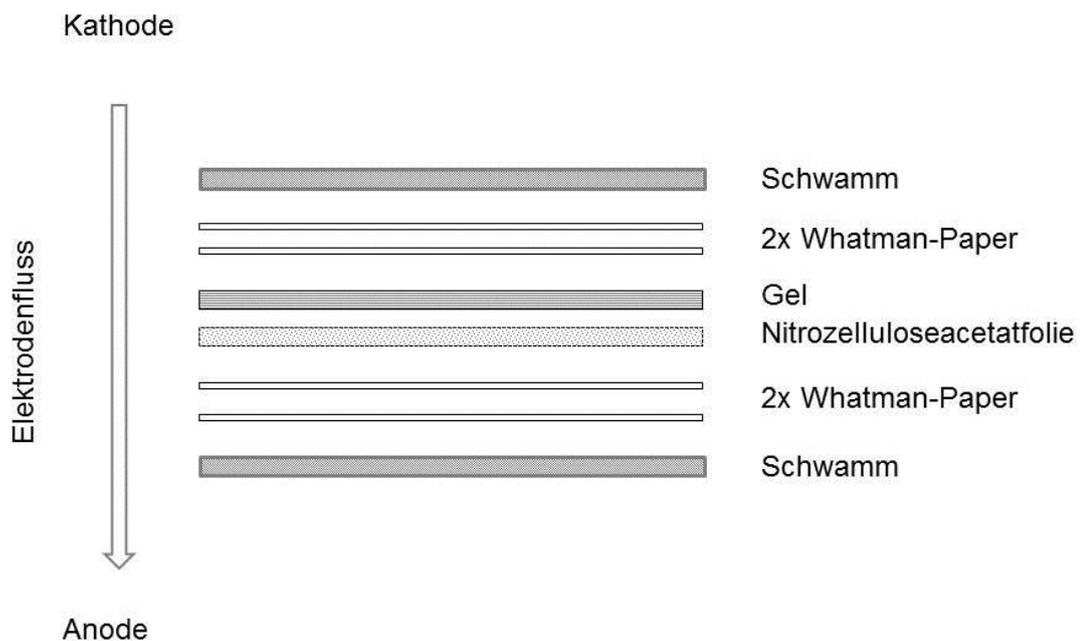


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Nassblotverfahrens

2.2.4.5. Western Blot-Analyse

Mit Hilfe spezifischer Antikörper können auf die Nitrozellulosemembran übertragene Proteine detektiert werden.

Um unspezifische Bindungsstellen an den Proteinen zu blockieren, wurden die Nitrozelluloseacetatfolien nach dem Elektrotransfer 30 min in einer Lösung aus 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS mit 0,05 % Tween 20 (v/v) geschwenkt. Danach wurden die Membranen mit dem Primärantikörper gegen das entsprechende Epitop (s. Tab. 1) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimal 7 min Waschen in PBS (bzw. TBS) mit 0,05 % Tween 20 folgte eine zwei- bis dreistündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur. Dieser Antikörper ist gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet und an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Beide Antikörper waren in 5 % Magermilch in PBS (TBS) mit 0,05 % Tween verdünnt, die Inkubation erfolgte stets unter kontinuierlichem Schwenken, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten.

Nach erneutem dreimal 7 min Waschen in PBS (TBS) mit 0,05 % Tween 20 konnte schließlich die Detektion mittels ECL (enhanced chemiluminescence)-Methode erfolgen (Whitehead et al., 1979). Dazu wurden die Membranen 1 min in einer 1:1 Mischung der ECL-Lösungen I und II geschwenkt, in der Dunkelkammer in eine Röntgenkassette gelegt und mit Klarsichtfolie abgedeckt. Darauf wurde ein entsprechend großer Röntgenfilm positioniert und die Röntgenkassette lichtundurchlässig verschlossen. Der Film blieb in der Regel 1 min exponiert, je nach Signalintensität auch nur minimal 15 sec oder maximal 30 min. Die Chemilumineszenz resultiert dabei aus einem Oxidationsprozess, bei dem die an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase die Oxidation des in ECL I enthaltenen Luminols in Anwesenheit von H_2O_2 in ECL II zu einem Licht emittierenden Carbonyl katalysiert. Nach der Exposition wurde der Röntgenfilm 1 min in Entwicklerlösung gebadet, kurz in Wasser geschwenkt und eine weitere Minute in Fixierlösung gelegt. Abschließend wurde erneut mit Wasser abgespült, getrocknet und die Färbungsintensität schließlich in digitalisierter Form ausgewertet.

2.2.5. Messung des transendothelialen elektrischen Widerstands

Die Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (transendothelial electrical resistance, TER) (Tiruppathi et al., 1992, Garcia et al., 2001, Hartmann et al., 2007) stellt eine besonders sensitive Methode zur Beobachtung von funktionellen Veränderungen der Endothelbarriere dar. Das hierfür verwendete Messsystem ECIS 1600R (Applied BioPhysics Inc., USA) ist in der Lage, den durch einen angelegten elektrischen Strom von $1 \mu A$ induzierten Spannungsabfall und somit den Widerstand der mit Endothelzellen beschichteten Goldelektrode zu messen. Dabei erfolgt die Messung durch 40 Elektroden pro Vertiefung einer 8-Loch-Platte mit einer Frequenz von 4000 Hz, die Elektroden kommunizieren über die im Kulturmedium enthaltenen Elektrolyte. HDMEC oder PSEC wurden auf ECIS 8-Loch-Platten mit einem Durchmesser von $1,96 \text{ mm}^2$ pro Vertiefung (Loch, well) ausgesät und bis zur

Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde gewechselt und frisches vorgelegt, sodass jede Vertiefung nach späterer Zugabe der entsprechenden Mediatoren ein Gesamtvolumen von 400 µl enthielt. Die Platten wurden für 30 min in die Messkammer eingespannt. Nach weiteren 10 min Äquilibration wurden für wiederum 10 min die basalen TER-Werte bestimmt. Die Messung wurde möglichst kurz unterbrochen und die verdünnten Mediatoren hinzu pipettiert, für die Kontrollen wurde eine entsprechende Menge Medium hinzugegeben. Die Messergebnisse wurden mit Microsoft Excel ausgewertet und grafisch visualisiert.

2.2.6. Spezifität der p65-Antikörper

Wie in Tab. 1 aufgeführt, verwendeten wir einen polyklonalen Antikörper gegen NF-κB p65 aus dem Kaninchen (Biozol, Eching) sowie einen ebenfalls gegen NF-κB p65 gerichteten monoklonalen Antikörper aus der Maus (sc-8008, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg). Eine zuvor erschienene Veröffentlichung hatte die Verwendung verschiedener mono- und polyklonaler Antikörper gegen NF-κB p65 kritisch hinterfragt und Zweifel an deren Spezifität nahegelegt (Herkenham et al., 2011). Daraufhin untersuchten wir die Spezifität der beiden in unserer Studie verwendeten Antikörper gegen NF-κB p65. Durch Transfektion von HDMEC mit einer spezifischen p65 siRNA schalteten wir die Translation von p65 in den Endothelzellen aus. Im Western Blot ließ sich daraufhin eine stetige Reduktion der p65-Bande bei ca. 65 kDa in den mit p65 siRNA transfizierten Zellen beobachten, während die p65-Bande in mit unspezifisch bindender non-target siRNA transfizierten HDMEC unverändert blieb (Abb. 7A, B). Dieses Ergebnis zeigte sich stets sowohl bei Verwendung des monoklonalen (Abb. 7A) als auch des polyklonalen Antikörpers (Abb. 7B) gegen NF-κB.

Da wir in der vorliegenden Studie den polyklonalen Antikörper auch für Immunfluoreszenzfärbungen verwendeten, untersuchten wir das immunhistochemische Färbungsmuster der endothelialen Zellschicht nach

Transfektion mit p65 siRNA im Vergleich zu Kontrollen und nach Transfektion mit non-target siRNA (Abb. 7C). Es zeigte sich ein punktförmig verteiltes Färbungsmuster von p65 im Zytoplasma und im Zellkern unbehandelter Kontrollzellen sowie mit non-target siRNA transfizierter HDMEC (Abb. 7C a, b). In mit p65 siRNA transfizierten Endothelzellschichten dagegen ließ sich ein nur schwaches Hintergrundmuster beobachten (Abb. 7C c). Es ist also sowohl von einer erfolgreichen Herunterregulation von p65 in den Endothelzellen, als auch von einer spezifischen Detektion des p65 Antigens in immunhistochemischen Färbungen auszugehen.

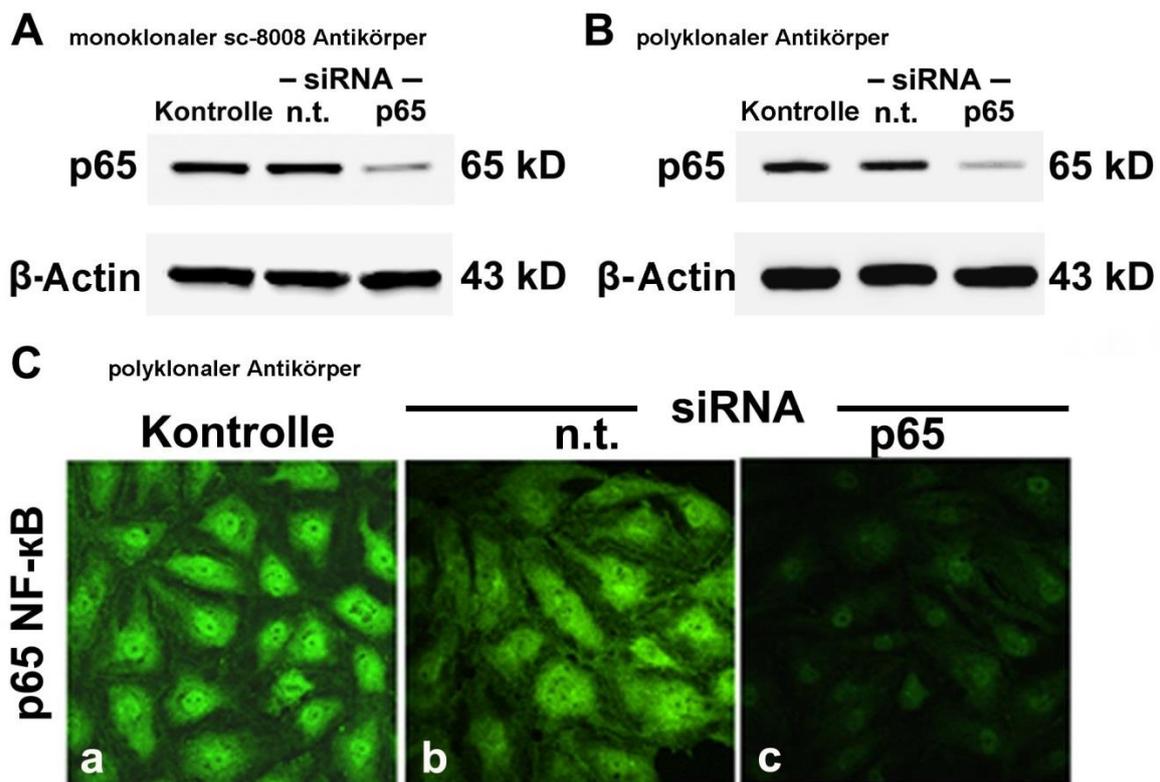


Abbildung 7: Spezifische Erkennung von NF-κB p65 durch den polyklonalen und den monoklonalen p65 Antikörper

A und B Die Abbildungen zeigen Western Blots von unbehandelten HDMEC (Kontrolle), sowie nach Transfektion mit p65 siRNA (p65) oder non-target siRNA (n.t.). Während Kontrollen und mit non-target siRNA transfizierte Endothelzellen gleichbleibende Proteinmengen von p65 enthielten, ließ sich nach Transfektion mit p65 siRNA eine deutliche Reduktion der p65-spezifischen Bande erkennen. Dieses Ergebnis zeigte sich sowohl bei Verwendung des monoklonalen (A) als auch des polyklonalen (B) p65 NF-κB Antikörpers.

Zum Nachweis gleichmäßiger Proteinbeladung wurden die Membranen mit β -Actin Antikörper reinkubiert.

Die gezeigten Experimente sind repräsentativ für $n > 5$ für jeden der beiden Antikörper.

C In Immunfluoreszenzfärbungen verwendeten wir den polyklonalen p65 Antikörper. Während sich in Kontrollzellen (a) und mit non-target siRNA transfizierten HDMEC (b) ein vergleichbares Färbungsmuster von p65 NF- κ B zeigte, ließ sich nach Transfektion mit p65 siRNA eine nur schwache Hintergrundfärbung beobachten (c).

Die abgebildeten Experimente sind repräsentativ für $n=3$.

2.3. Angaben zur Statistik

Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Statistische Unterschiede der jeweiligen Versuchsgruppen in der TER-Messung wurden mittels zweiseitigem „student's t-test“ bzw. nonparametrischem Mann-Whitney-Test (Microsoft Excel, Sigma Stat 2.0) beurteilt. Zur statistischen Evaluation der Fn/c-Messungen wurde der Kruskal-Wallis-Test (Kruskal-Wallis one way analysis of variance on ranks) angewendet, gefolgt von einem Dunn-Test. Von statistischer Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ ausgegangen.

3. Ergebnisse

3.1. LPS führt innerhalb von 30 Minuten zu einer deutlichen NF-κB-Aktivierung in Endothelzellen

Zuerst interessierten wir uns für den Zeitpunkt, zu dem eine LPS-Applikation zu einer Aktivierung von NF-κB im Endothel führte. Dazu nahmen wir Kernextraktionsmessungen vor, um die Translokation der NF-κB-Untereinheit p65 aus dem Zytoplasma in den Zellkern unter diesen Bedingungen und somit die Aktivierung von NF-κB nachzuweisen.

Wir inkubierten PSEC für 15, 30, 60 und 120 min mit LPS. Hierzu verwendeten wir LPS in pathophysiologisch relevanten Dosen von 100 ng/ml (Schlegel et al., 2009). Kontrollen blieben unbehandelt. Daraufhin wurden Kernextrakte aus den Zellen gewonnen und Western Blots von äquivalenten Proteinmengen aus der jeweiligen zytoplasmatischen und nukleären Fraktion der Endothelzelllysate angefertigt.

Die Ergebnisse der Versuche zeigten in der zytoplasmatischen Fraktion eine deutliche Abschwächung der p65-spezifischen Bande bei 65 kD bereits nach 30-minütiger LPS-Inkubation (Abb. 8A a). Gleichzeitig ließ sich in der nukleären Fraktion der ebenfalls für 30 min inkubierten PSEC eine deutliche Intensivierung der p65-spezifischen Bande beobachten. Der Effekt war auch nach 60 und 120 min klar erkennbar (Abb. 8A b), was auf eine anhaltende NF-κB-Aktivierung auch nach längeren Inkubationszeiten mit LPS schließen lässt.

Um eine gleichmäßige Auftragung der Proteinmengen und den korrekten Ursprung aus zytoplasmatischer oder nukleärer Fraktion zu verifizieren, reinkubierten wir die Nitrozellulosemembranen jeweils mit Antikörpern, die gegen das zytoplasmatische β-Actin, beziehungsweise das nukleäre Protein Lamin A gerichtet waren.

Ergänzend führten wir Immunfluoreszfärbungen durch, um die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung anhand der Kerntranslokation der p65-Untereinheit des Transkriptionsfaktors zu visualisieren.

Wir inkubierten sowohl PSEC als auch HDMEC über verschiedene Zeiträume hinweg mit LPS und färbten die p65-Untereinheit mit einem spezifischen Antikörper an.

Unter Kontrollbedingungen zeigte sich hierbei eine nahezu gleichmäßige Verteilung von p65 in Zytoplasma und Zellkern der Endothelzellen (Abb. 8B a, g). Nach 15-minütiger Einwirkzeit mit LPS (nicht abgebildet), kam es zu keiner sichtbaren Veränderung, allerdings wurde, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen unserer Kernextraktionsversuche, auch in diesem Versuch nach 30-minütiger Einwirkung von LPS eine signifikante Translokation von NF- κ B in den Zellkern sichtbar (Abb. 8B b, h). Dieser Befund blieb über längere Zeiträume von 1 h (Abb. 8B c, i), 2h (Abb. 8B d, j) und 4h (Abb. 8B e, k) bestehen. Nach 24 h schien die Fluoreszenzintensität im Zytoplasma wieder etwas anzusteigen (Abb. 8B f, l).

Dieses Resultat ließ sich durch Evaluation der Fn/c mit hoher Signifikanz bestätigen.

Es lässt sich aus den beschriebenen Experimenten also schlussfolgern, dass LPS nach 30 min eine starke Aktivierung von NF- κ B in Endothelzellen induziert.

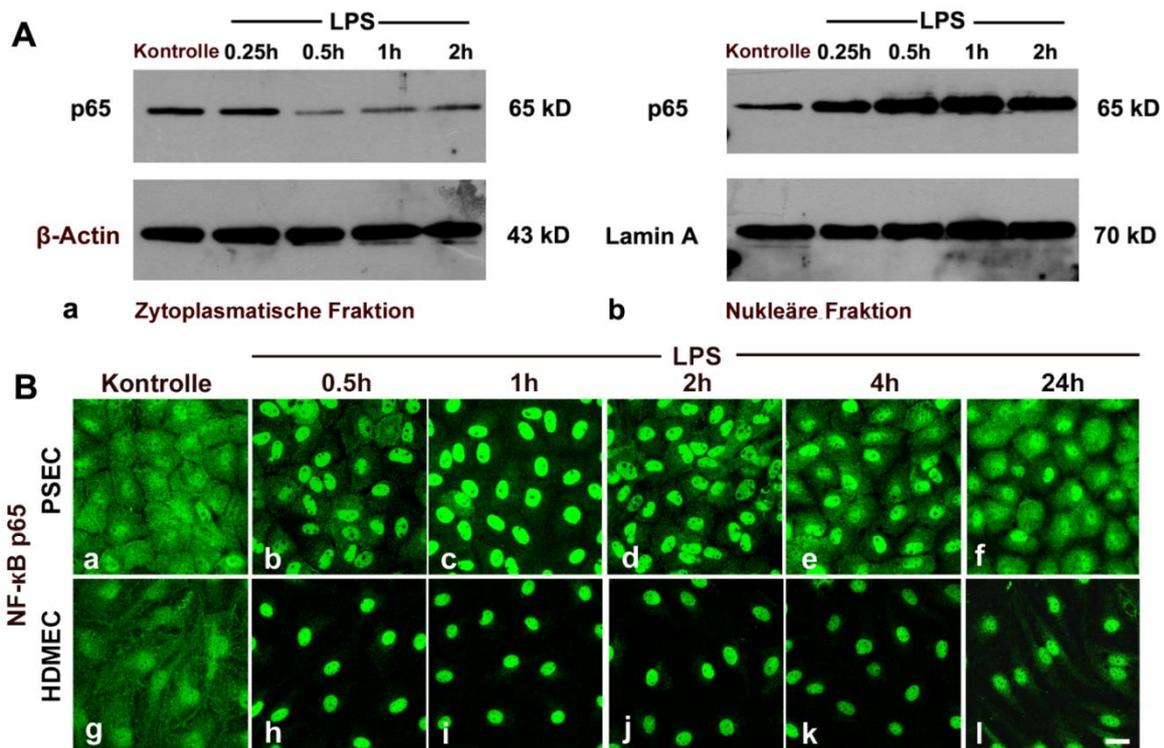


Abbildung 8: LPS induzierte die NF-κB-Aktivierung in Endothelzellen nach 30 min

A Wir führten Kernextraktionsversuche in PSEC durch, um die Translokation des Transkriptionsfaktors NF-κB aus dem Zytoplasma der Endothelzellen in den Zellkern zu veranschaulichen. 30 min nach LPS-Applikation war das p65-Signal im Zytoplasma reduziert, ebenso über spätere Zeitpunkte hinweg (a). Gleichzeitig zeigte sich eine Signalverstärkung von p65 in der nukleären Fraktion (b). Zu Überprüfung von Fraktionszugehörigkeit und gleichmäßiger Proteinauftragung wurden die Membranen mit gegen β-Actin bzw. Lamin A gerichteten Antikörpern reinkubiert. Der gezeigte Western Blot ist repräsentativ für n>4 Experimente.

B Ergänzend wurden Immunfluoreszenzfärbungen zur Darstellung der LPS-induzierten Kerntranslokation von NF-κB in PSEC (a-f) und HDMEC (g-l) angefertigt. Während die Kontrollen (a, g) eine recht gleichmäßige Verteilung von p65 in Zytoplasma und Zellkern aufwiesen, kam es unter Einwirkung von LPS (b-f, h-l) zu einer Abnahme von p65 in Zytoplasma und einer gleichzeitigen Zunahme im Zellkern. Die gezeigten Experimente sind repräsentativ für n>5 Versuchsreihen. Maßstab 20 μm.

3.2 LPS veränderte weder Caveolin-1- noch VASP-Mengen in der Zelle

Um die Arbeiten anderer Forschungsgruppen nachzuvollziehen, prüften wir die Wirkung von LPS auf intrazelluläre Veränderungen der Proteinmengen von Caveolin-1 und VASP in HDMEC. Es war vorgeschlagen worden, dass es als Folge einer entzündungsassoziierten NF-κB-Aktivierung zu einer

Hochregulation von Caveolin-1 (Tiruppathi et al., 2008), beziehungsweise zu einer Herunterregulation von VASP komme (Henes et al., 2009).

Die bei 22 kD detektierte Caveolin-1-spezifische Bande blieb in unseren Experimenten jedoch auch nach längerer Inkubation der Endothelzellen mit LPS unverändert im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Abb. 9A). Auch die VASP-spezifische Bande bei 46 kD zeigte sich im Zeitverlauf und auch nach 24-stündiger LPS-Inkubation in ihrer Intensität unverändert gegenüber der Kontrolle (Abb. 9B). Zur Ladungskontrolle wurden die Membranen mit β -Actin-Antikörper reinkubiert.

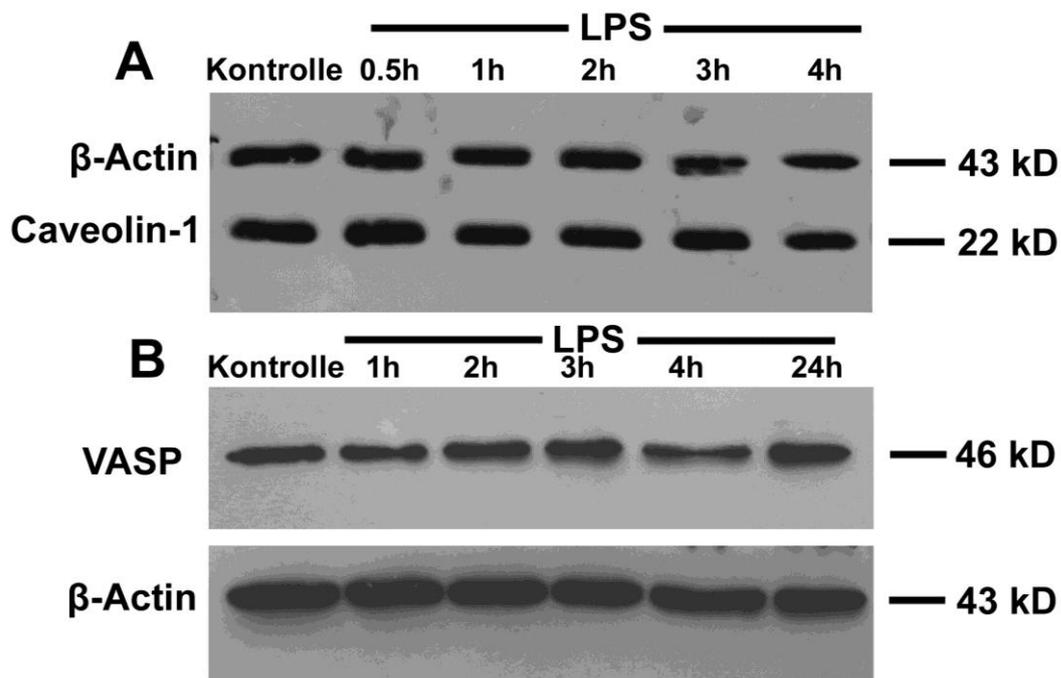


Abbildung 9: LPS änderte die Proteinmengen von Caveolin-1 und VASP nicht

Western Blots wurden angefertigt, um Veränderungen der intrazellulären Proteinmengen von Caveolin-1 (A) und VASP (B) nach LPS-Applikation in HDMEC zu untersuchen. Die Caveolin-1-spezifische Bande bei 22 kD (A) zeigte sich nach LPS-Inkubation unverändert verglichen mit der Kontrolle und auch die spezifische VASP-Bande bei 46 kD blieb im Zeitverlauf unverändert (B). Die Membranen wurden zum Nachweis gleichmäßig aufgetragener Proteinmengen mit gegen β -Actin gerichtetem Antikörper reinkubiert. Die gezeigten Western Blots sind repräsentativ für $n > 5$ Experimente.

3.3 Bay 11-7082 sowie NEMO-binding domain (NBD)-Peptid verhinderten die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung, nicht jedoch ein erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel

Um die Bedeutung der LPS-induzierten NF- κ B-Aktivierung für die Dysregulation der Endothelbarriere zu untersuchen, wurde die Wirksamkeit von Substanzen untersucht, die die Aktivierung des Transkriptionsfaktors hemmen.

Zunächst verwendeten wir Bay 11-7082, ein Molekül, das die Zytokin-induzierte Phosphorylierung von I κ B- α und somit die Aktivierung von NF- κ B verhindert (Pierce et al., 1997). PSEC wurden zunächst für 60 min mit dem Inhibitor vorinkubiert, bevor sie über verschiedene Zeiträume der LPS-Wirkung ausgesetzt wurden. Im Folgenden führten wir Immunfluoreszenzfärbungen durch, um die Verteilung der p65-Untereinheit in Zellkern und Zytoplasma zu visualisieren.

Unter Kontrollbedingungen fand sich, wie bereits zuvor beschrieben, eine fast gleichmäßige Verteilung der p65-Untereinheit in Kern und Zytoplasma (Abb. 10A a), die auch durch alleinige Inkubation mit Bay 11-7082 für 30 min (Abb. 10A c) und 4 h (Abb. 10A f) unbeeinflusst blieb. Nach bereits 30-minütiger LPS-Einwirkung hingegen ließ sich eine signifikante Kerntranslokation von p65 beobachten (Abb. 10A c), die sich bis zum Messzeitpunkt von 4 h noch intensiviert (Abb. 10A e). In mit Bay 11-7082 vorbehandelten Zellen dagegen blieb dieser Effekt nach 30-minütiger LPS-Inkubation aus (Abb. 10A c) und auch nach 4 h war die LPS-induzierte Kerntranslokation von p65 augenscheinlich gehemmt (Abb. 10A f). Die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung konnte also offensichtlich durch das Inhibitormolekül erfolgreich blockiert werden.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz quantifizierten wir über die Berechnung des Quotienten aus Fluoreszenzintensität in Kern und Zytoplasma (Fn/c). Ein Anstieg der Fn/c auf das Doppelte der Kontrollwerte nach sowohl 30-minütiger als auch vierstündiger LPS-Inkubation bestätigte den visuellen Aspekt der NF- κ B-Aktivierung durch LPS und deren Hemmung mittels Bay 11-7082 (Abb. 10B).

Zur Untersuchung der Auswirkung von Bay 11-7082 auf die Morphologie der Endothelzellen färbten wir zusätzlich immunhistochemisch das Barriereprotein VE-Cadherin (Abb. 10A a₁-g₁) sowie das Actin-Zytoskelett (Abb. 10A a₂-g₂) an. Unbehandelte Kontrollzellen wiesen eine gleichmäßig an die Zellgrenzen angelagerte VE-Cadherin-Markierung sowie das typische Muster des kortikalen Actinnetzes auf (Abb. 10A g, g₁). Inkubation der PSEC mit LPS für 30 min veränderte das Bild zunächst kaum (Abb. 10A h, h₁). 4h nach Applikation von LPS dagegen kam es zu einer deutlich sichtbaren Bildung von Lücken zwischen den durch VE-Cadherin markierten benachbarten Zellgrenzen sowie einer Stressfaserbildung im Actin-zytoskelett (Abb. 10A e₁,e₂, Pfeile).

Als nächstes beobachteten wir die Reaktion der Morphologie der Endothelzellschicht auf Bay 11-7082 in alleiniger Inkubation (Abb. 10A c₁,c₂ und f₁, f₂) sowie mit anschließender LPS-Zugabe (Abb. 10A d₁, d₂ und g₁, g₂). Hierbei zeigte sich, im Gegensatz zum Einfluss auf die NF-κB-Aktivierung, keine Hemmung des LPS-Effektes auf die Junctionsmorphologie. Im Gegenteil, bereits nach alleiniger Behandlung der PSEC mit Bay 11-7082 für 30 min und 4 h reagierten die Zellen mit einer deutlichen Fragmentierung des linearen VE-Cadherin-Verteilungsmuster mit interzellulärer Lückenbildung sowie mit beginnender sichtbarer Actin-Stressfaserbildung (Abb. 10A c₁, c₂ und f₁, f₂, Pfeile). Diese Effekte zeigten sich noch drastischer nach anschließender Applikation von LPS für 30 min und 4h (Abb. 10A d₁, d₂ und g₁, g₂).

Bay 11-7082 selbst schien also trotz effektiver Hemmung der LPS-induzierten NF-κB-Aktivierung auf anderem Wege einen schädlichen Einfluss auf die Zelljunctionen und die gesamte Endothelzellintegrität auszuüben.

Dies bestätigte auch die Färbung der Zellkerne mit DAPI (Abb. 10A a₃-g₃). Sie zeigte unter Kontrollbedingungen (Abb. 10A a₃) sowie nach alleiniger Inkubation mit LPS für 30 min und 4 h (Abb. 10A b₃, e₃) und ebenfalls nach alleiniger Behandlung mit Bay 11-7082 für 30 min (Abb. 10A c₃) eine intakte Chromatinintegrität. Bereits nach alleiniger Behandlung mit Bay 11-7082 für 4 h (Abb. 10A f₃) sowie nach Vorbehandlung mit Bay 11-7082 und anschließender Inkubation mit LPS für 30 min (Abb. 10A d₃) ließ sich eine beginnende und nach Vorbehandlung mit Bay 11-7082 gemeinsam mit LPS für 4 h (Abb. 10A g₃) eine

deutliche Kondensation des Chromatins mit Schrumpfung der Zellkerne als Zeichen des Zelltods beobachten.

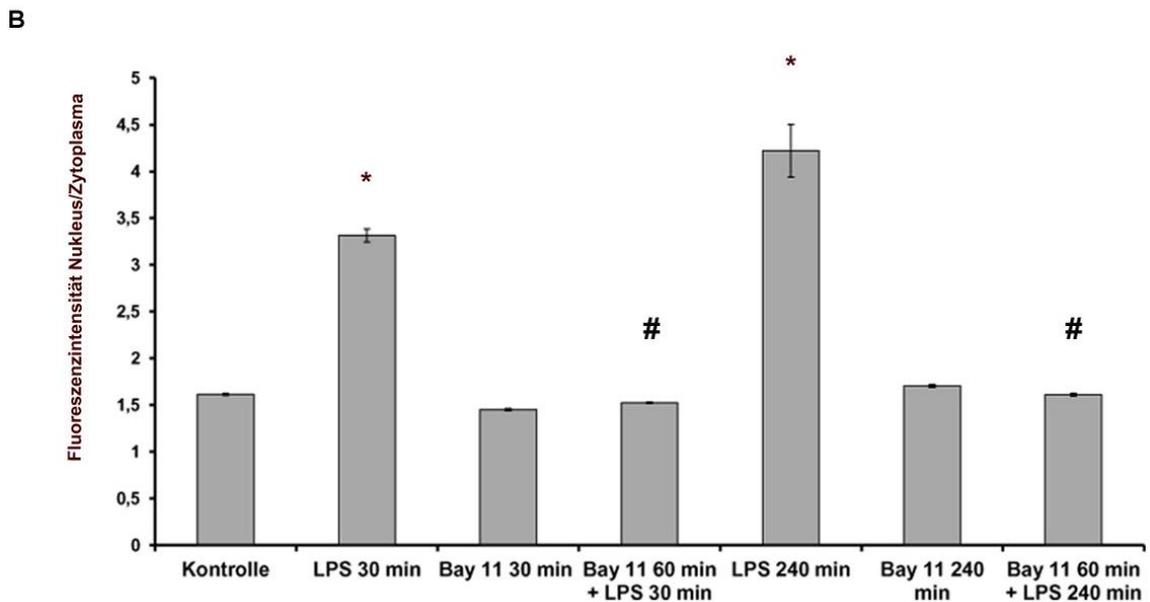
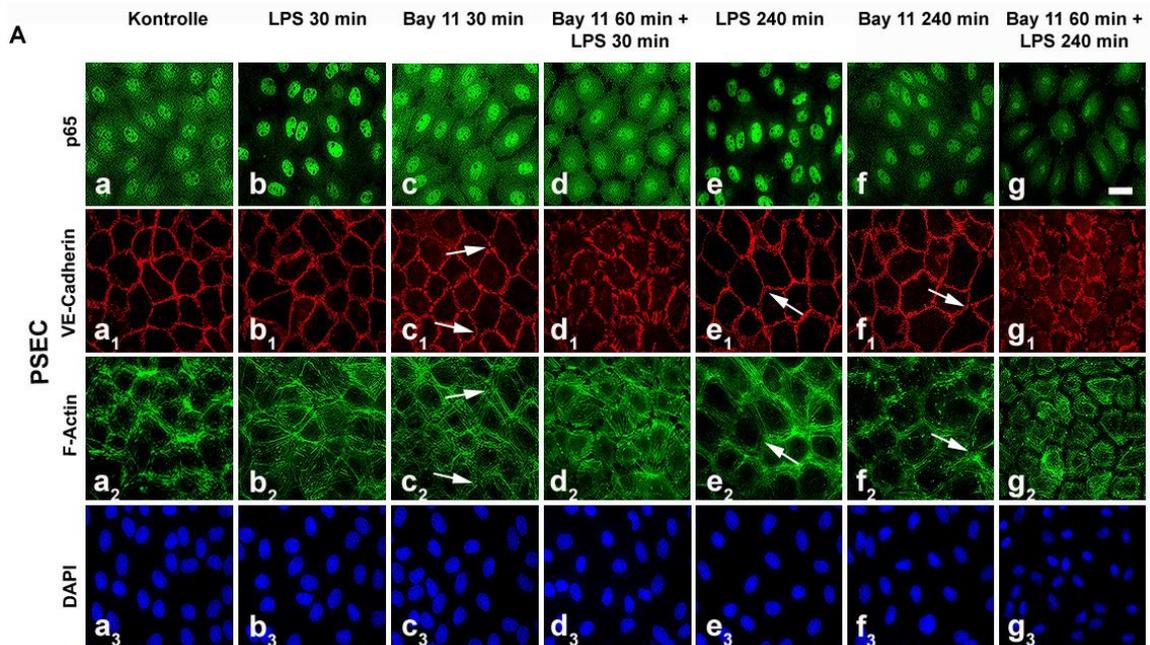


Abbildung 10: Bay 11-7082 hemmte die LPS- induzierte NF- κ B-Aktivierung vollständig, schien jedoch die LPS-induzierte Lückenbildung eher zu verstärken

A Es wurden Immunfärbungen der NF- κ B-Untereinheit p65 in PSEC angefertigt, um die Auswirkungen des Inhibitorpeptids Bay 11-7082 auf die LPS-induzierte Kerntranslokation von p65 (a-g) sowie die Morphologie der Endothelzellen (a₁-g₁ und a₂-g₂) und

die Vitalität bzw. Zellkernintegrität (α_3 - β_3) zu visualisieren. Die Pfeile zeigen auf interzelluläre Lücken. Die gezeigten Experimente sind repräsentativ für $n > 3$.

B Um den visuellen Aspekt der Immunfluoreszenz zu quantifizieren, berechneten wir die Fn/c aller aufgenommenen Zellen. Die gezeigten Experimente sind repräsentativ für $n > 3$. * $p < 0,05$ verglichen mit Kontrollen, # $p < 0,05$ verglichen mit LPS allein für 30 min bzw. 4 h.

Da der NF- κ B-Inhibitor Bay 11-7082 die Zellintegrität also offensichtlich auf NF- κ B-unabhängigen Wegen zu stören schien, entschieden wir uns für die Verwendung eines weiteren Inhibitors. Wir verwendeten in der Folge das IKK-NBD-Peptid, welches, wie früher beschrieben, durch spezifische Hemmung der Interaktion der regulatorischen Kinasenuntereinheit IKK γ (=NEMO) mit dem IKK-Komplex die Aktivierung von NF- κ B verhindert (May et al., 2000, Tirupathi et al., 2008).

Wir wählten den gleichen Versuchsansatz und behandelten PSEC und HDMEC diesmal mit NBD-Peptid für 1 h vor, bevor wir die Endothelzellen über oben genannte Zeiträume der Wirkung von LPS aussetzten.

Auch in den mit IKK-NBD-Peptid vorbehandelten Zellen war die immunhistochemisch visualisierte Translokation von NF- κ B signifikant gehemmt (Abb. 11A c, j, f, m) im Vergleich zu über 30 min (Abb. 11A b, i) bzw. 4 h (Abb. 11A e, l) mit LPS behandelten Zellen.

Die Quantifizierung zeigte in PSEC eine Abschwächung der Fn/c vom 2,0-fachen der Kontroll-Fn/c nach alleiniger LPS-Behandlung auf das 1,2-fache nach 30 min sowie vom 2,0-fachen auf das 1,1-fache nach 4 h. In gleicher Weise reduzierte sich der Fn/c-Anstieg durch LPS in mit IKK-NBD-Peptid vorinkubierten HDMEC vom 2,0-fachen auf das 1,1-fache des Kontrollwerts nach 30 min bzw. vom 2,0-fachen auf das 1,2-fache nach 4 h (Abb. 11B). Jedoch konnte das Inhibitorpeptid die Aktivierung von NF- κ B nicht vollständig hemmen. Statistische Analysen zeigten eine noch immer signifikant erhöhte Fn/c verglichen mit Kontrollbedingungen.

Um einen Einfluss des intrazellulären cAMP-Spiegels, der, wie oben ausgeführt, bekanntermaßen eine nicht unerhebliche Rolle in der Regulation der Endothelbarriere spielt, auf die Kerntranslokation von NF- κ B zu untersuchen, behandelten wir einen weiteren Teil der Zellen vor Zugabe von LPS über eine Stunde hinweg mit dem Adenylatzyklaseaktivator Forskolin und dem

Phosphodiesterase-4-Hemmer Rolipram. In der Immunfluoreszenz wurde in HDMEC sowie PSEC weder nach 30 min (Abb. 11A d, k) noch nach 4 h (Abb. 11A g, n) eine Hemmung der Translokation im Vergleich zu alleiniger LPS-Behandlung sichtbar. Auch die Quantifizierung zeigte keine relevante Reduktion der Fn/c im Vergleich zu alleiniger Inkubation mit LPS in PSEC, in HDMEC sogar eine Verstärkung (Abb. 11B).

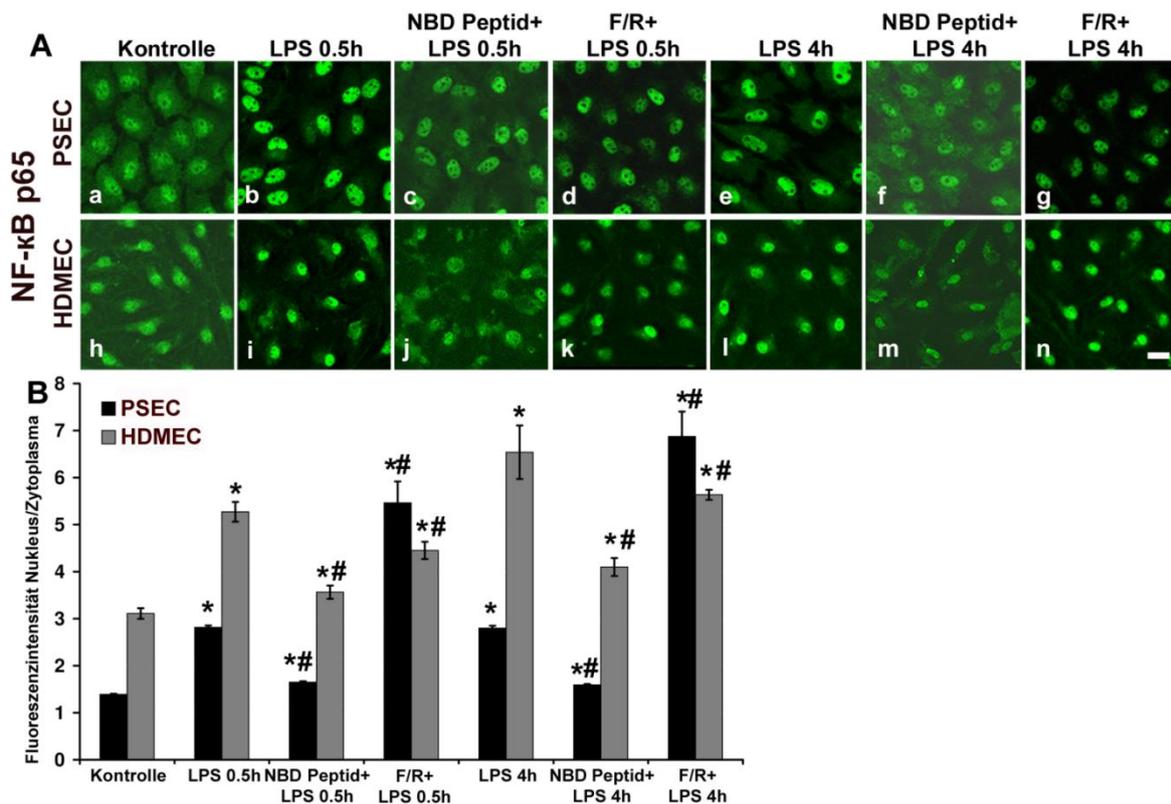


Abbildung 11: NBD-Peptid hemmte die LPS-induzierte NF-κB-Aktivierung

A Es wurden Immunfluoreszenzfärbungen von p65 in PSEC (a-g) und HDMEC (h-n) angefertigt, um zu untersuchen, ob eine Vorinkubation mit NBD-Peptid (c, f, j, m) oder F/R (d, k, g, n) zu einer Änderung der LPS-induzierten NF-κB-Aktivierung nach 30 min (b, i) und 4h (e, l) führt. Die Abbildungen sind repräsentativ für n>5 Versuche. Maßstab 20 µm.

B Die Fn/c wurde gemessen, um visuelle Aspekte der Immunfärbungen objektiv zu quantifizieren. n>4 für jede Versuchsbedingung. * p<0,05 verglichen mit Kontrollen, # p<0,05 verglichen mit LPS allein für 30 min bzw. 4 h.

Nach Langzeitinkubation von HDMEC mit LPS zeigte sich immer noch eine verstärkte Intensität der Fluoreszenzfärbung von p65 im Kern im Vergleich zu

Kontrollen (Abb. 12A a, b). Die Fn/c war nach dieser Inkubationszeit signifikant auf das 1,8fache des Kontrollniveaus erhöht (Abb. 12B). In mit NBD-Peptid vorbehandelten Zellen zeigte sich dieser Effekt nicht, es ließ sich keine nukleäre Fluoreszenzfärbung von p65 beobachten (Abb. 12A c). Entsprechend bewegten sich die Fn/c-Werte auf Kontrollniveau (Abb. 12B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass LPS auch nach Langzeitinkubation von 24 h noch zu einer effektiven Aktivierung von NF- κ B führt. Gleichermäßen zeigte sich aber auch eine Vorinkubation mit NBD-Peptid noch wirksam, die Aktivierung über diesen Zeitraum hinweg erfolgreich zu verhindern.

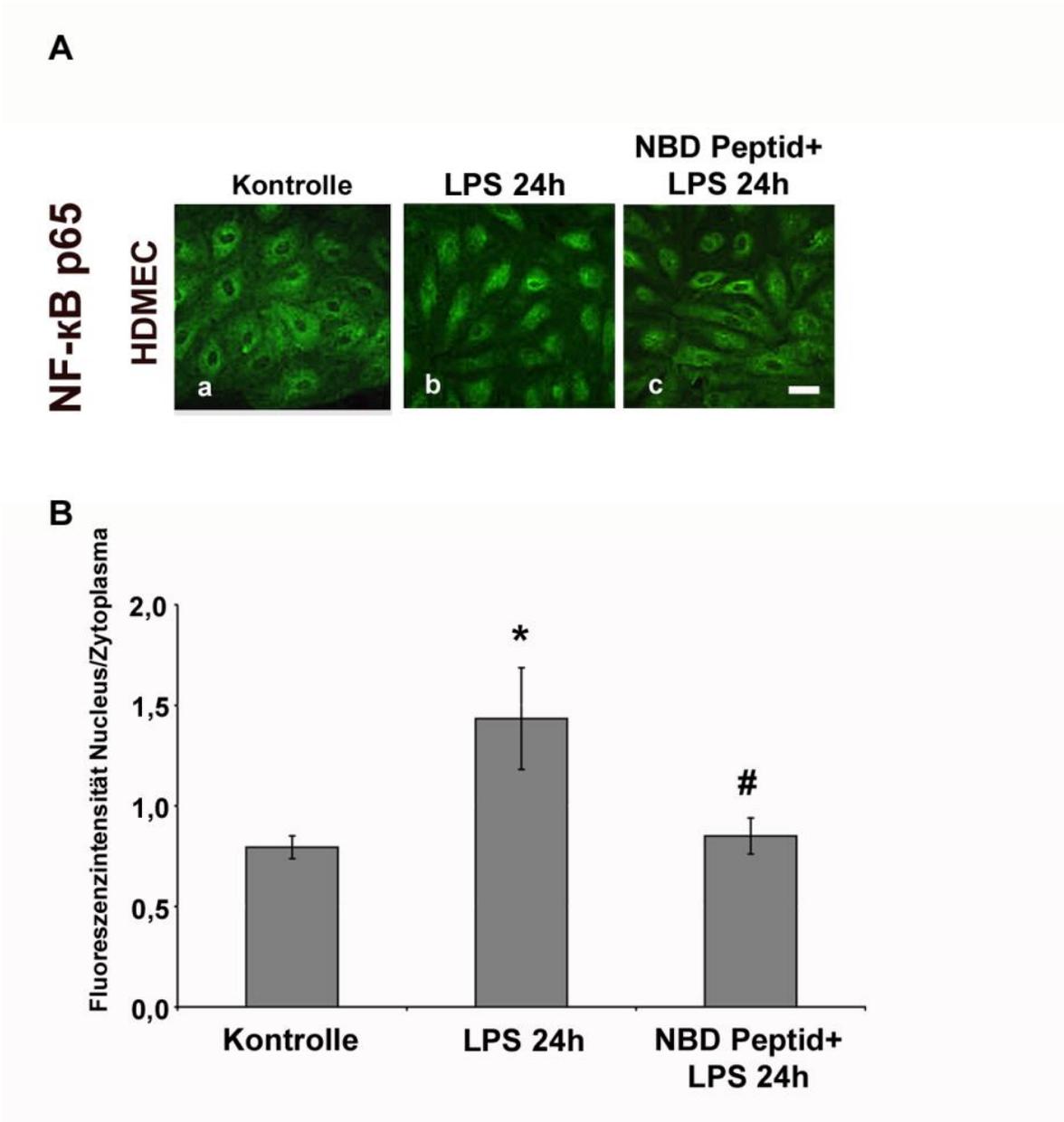


Abbildung 12: NBD-Peptid blieb auch nach 24h Inkubationszeit wirksam

A In HDMEC wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen NF-κB p65 unter Kontrollbedingungen (a), 24 h Inkubation mit LPS (b) sowie einstündiger Vorinkubation mit NBD-Peptid, gefolgt von 24 h Behandlung mit LPS (c), angefertigt. Gezeigte Experimente sind repräsentativ für n=5, Messbalken entspricht 20 μm.

B Zur Quantifizierung des visuellen Aspekts der Immunfärbung wurden Fn/c-Messungen durchgeführt. * p<0,05 gegenüber Kontrollen, # p<0,05 verglichen mit LPS. Repräsentativ für n=5 für jede Versuchsbedingung.

3.4. Erhöhung des cAMP-Spiegels durch Forskolin/Rolipram verstärkte die Aktivierung von NF- κ B

Bei genauerer Betrachtung der Kerntranslokation von NF- κ B fiel auf, dass diese durch Vorbehandlung der Endothelzellen mit Forskolin/Rolipram und anschließender LPS-Inkubation im Vergleich zu alleiniger Behandlung mit LPS nicht nur nicht verhindert wurde, sondern sogar leicht verstärkt schien (vgl. Abb. 11). Daher untersuchten wir nun, ob in PSEC und HDMEC bereits eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels allein schon zu einer Aktivierung von NF- κ B führte.

In PSEC konnte nach 1 h, 4 h und 24 h Inkubation mit F/R keine signifikante Veränderung der p65-Verteilung in Kern und Zytoplasma beobachtet werden.

In HDMEC dagegen kam es 1 h nach Applikation von F/R in einigen Zellen der Endothelschicht zu einer sichtbaren Kerntranslokation von p65 (Pfeile in Abb. 13A b) und einem leichten Anstieg der Fn/c (Abb. 13B). Nach vierstündiger Inkubation verdeutlichte sich dieser Effekt, beinahe alle Zellen zeigten eine deutliche Kerntranslokation von p65 (Abb. 13A c) und die Werte der Fn/c-Messung erreichten das 1,6fache der Kontrollwerte (Abb. 13B). 24 h nach Applikation von F/R war keine nennenswerte Kerntranslokation mehr erkennbar, es fiel allerdings eine verstärkte Lokalisation von p65 an den Zellgrenzen auf (Pfeil in Abb. 13A d).

Zu allen genannten Zeitpunkten nach F/R-Applikation ließ sich eine gleichmäßige Verteilung von VE-Cadherin an den Zellgrenzen beobachten (Abb. 13A f-h). Es trat keine interzelluläre Lückenbildung auf, ebensowenig eine Stressfaserbildung im Actin-Zytoskelett (Abb. 13A j-l).

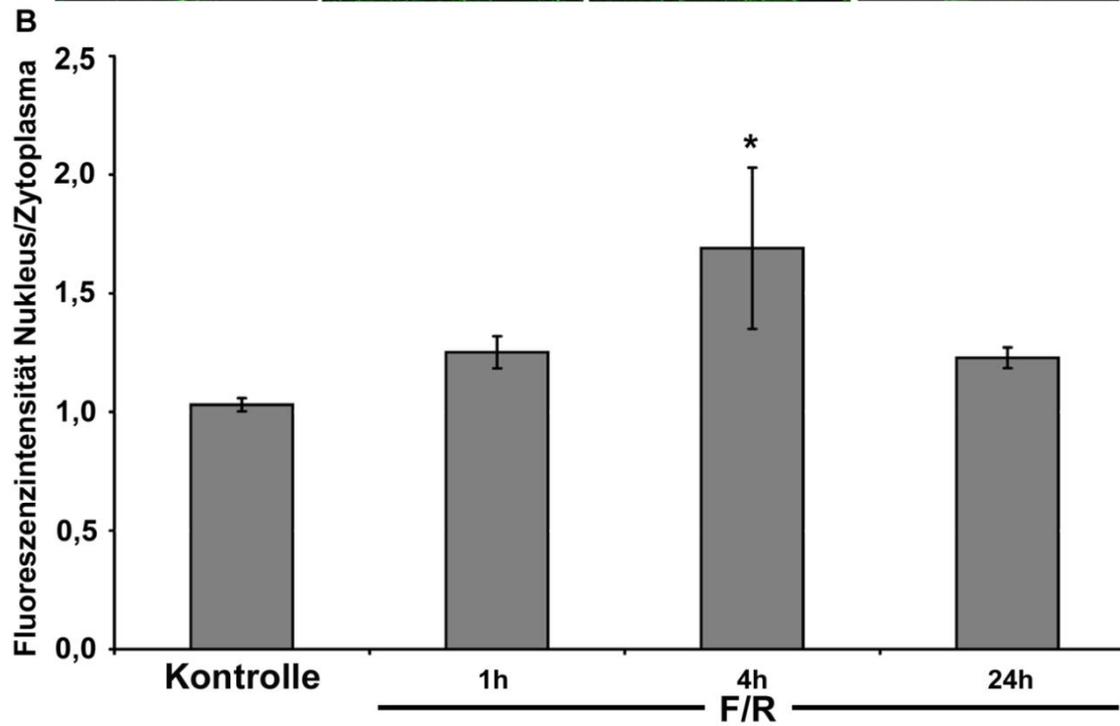
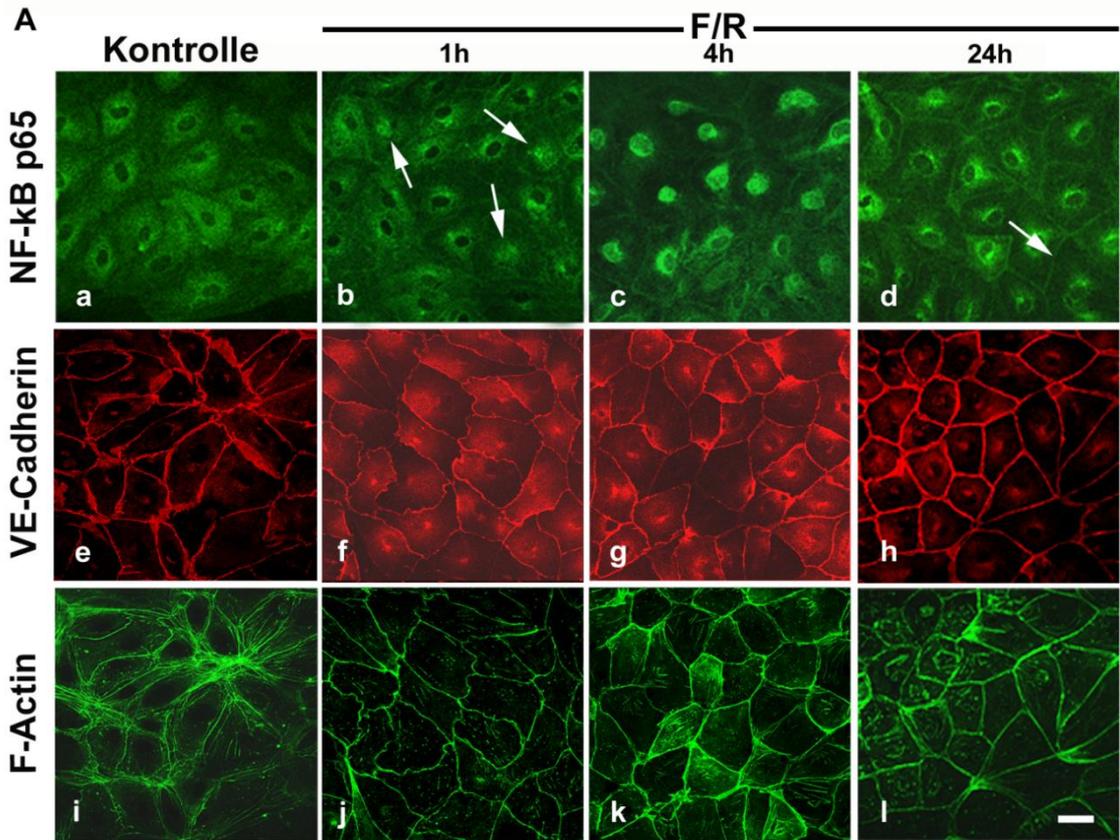


Abbildung 13: Erhöhte cAMP-Spiegel verstärkten die NF-κB-Aktivierung nach 4 h in HDMEC

A In HDMEC wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen NF- κ B p65 unter Kontrollbedingungen (a) sowie 1 h (b), 4 h (c) und 24 h (d) nach Applikation von F/R angefertigt. Anfärbung von VE-Cadherin (e-h) und F-Actin (i-l) dienen zur Darstellung der morphologischen Integrität der Endothelzellschicht unter den genannten Versuchsbedingungen. Die Pfeile in b zeigen auf verstärkt gefärbte Zellkerne, der Pfeil in d auf die Zellgrenze. Gezeigte Experimente sind repräsentativ für n=5, Messbalken entspricht 20 μ m.

B Zur Quantifizierung des Aspekts der Immunfärbung wurden Fn/c-Messungen durchgeführt. * p<0,05 verglichen mit Kontrollen, n=5 für jede Versuchsbedingungen.

3.5. IKK-NBD-Peptid verhinderte die LPS-induzierte Bildung interzellulärer Lücken in HDMEC nicht

Als nächstes führten wir Immunfluoreszenzfärbungen an HDMEC durch, um Auswirkungen einer Hemmung der NF- κ B-Aktivierung auf die Morphologie der Endothelzellen und deren interzellulären Verbindungen zur Darstellung zu bringen.

Wir markierten dazu zum einen das Barriereprotein VE-Cadherin, zum anderen das Zytoskelettprotein F-Actin.

Unter Kontrollbedingungen war eine gleichmäßige Verteilung von VE-Cadherin an den Zellgrenzen zu beobachten. Ebenso zeigte sich ein kortikaler Zytoskelettring als typisches Verteilungsmuster von F-Actin (Abb. 14 a,j).

Dieses Bild veränderte sich weder nach 30-minütiger Behandlung der Zellen mit LPS alleine (Abb. 14 b, k), noch in Gegenwart von NBD-Peptid (Abb. 14 c, l) oder Forskolin/Rolipram (Abb. 14 d, m).

Vierstündige LPS-Inkubation dagegen führte zu einer deutlichen Bildung interzellulärer Lücken (Abb. 14 e) sowie intrazellulärer Stressfasern im Actin-Zytoskelett (Abb. 14 n). Dieser Effekt konnte durch Vorinkubation der Zellen mit NBD-Peptid nicht vermindert werden. Im Gegenteil, es schien im Vergleich zur alleinigen LPS-Behandlung sogar zu einer verstärkten Fragmentierung von VE-Cadherin (Abb. 14 f) sowie Desorganisation des Actinzytoskeletts zu kommen (Abb. 14 o).

Allerdings wurde die LPS-induzierte Lücken- und Stressfaserbildung durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels mittels Forskolin/Rolipram gänzlich verhindert (Abb. 14 g, p).

24 h nach Applikation von LPS zeigte sich VE-Cadherin an den Zellgrenzen weniger fragmentiert als nach vierstündiger LPS-Inkubation und auch die Bildung von Stressfasern und interzellulären Lücken erschien im Vergleich zum vorherigen Zeitpunkt abgemildert, was als Hinweis auf eine spontane Regeneration der Endothelbarriere gedeutet werden kann (Abb. 14 h, q). Mit NBD-Peptid vorbehandelte und anschließend ebenfalls über 24 h mit LPS inkubierte Zellschichten zeigten dagegen, wie nach vierstündiger LPS-Inkubation, noch immer eine deutliche Fragmentierung von VE-Cadherin sowie Bildung von interzellulären Lücken und Stressfasern (Abb. 14 i, r). Im Gegensatz dazu waren erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel effektiv, die LPS-vermittelte Lückenbildung vollständig zu hemmen.

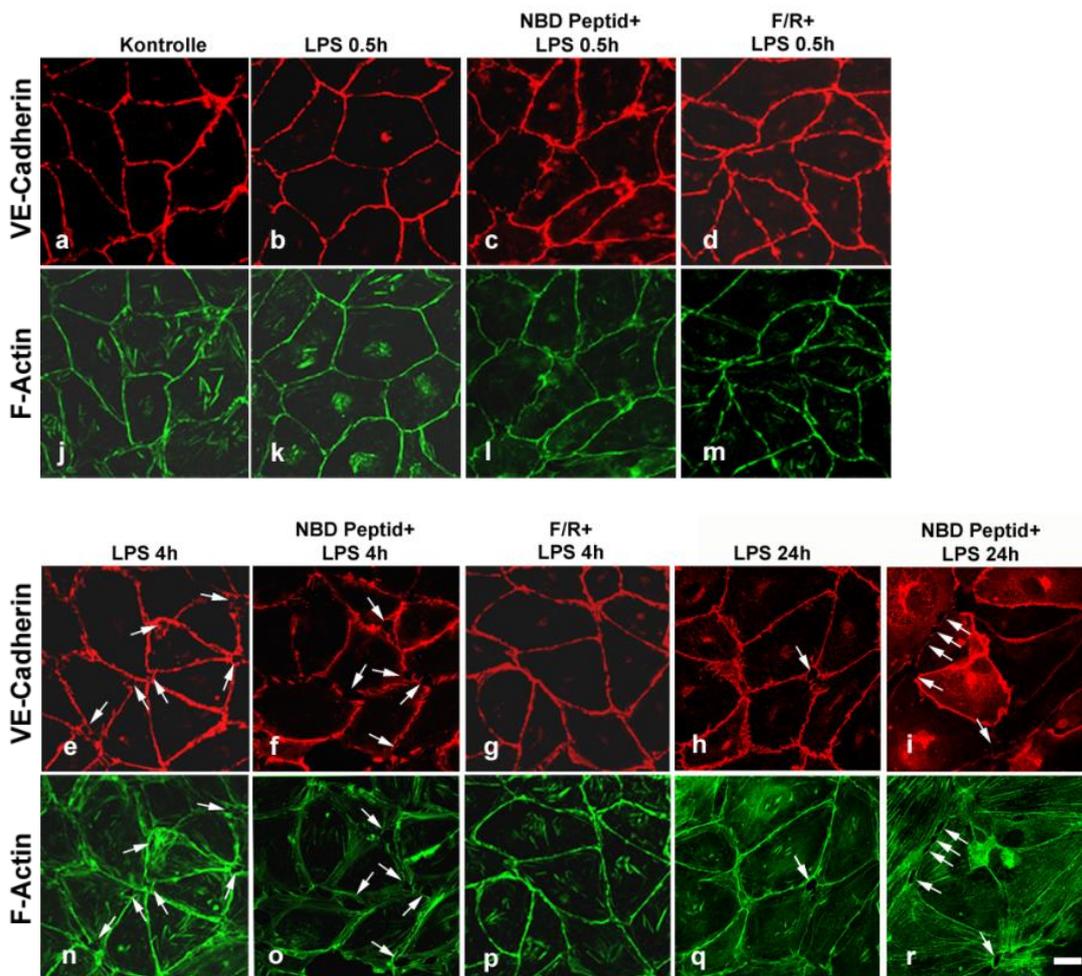


Abbildung 14: NBD-Peptid verhinderte die Bildung von interzellulären Lücken und Stressfasern nicht

Mittels Immunfluoreszenzfärbung wurden VE-Cadherin (a-g) und F-Actin (h-n) markiert. Die Verteilung der beiden Proteine wurde nach Vorinkubation der Endothelzellen mit NBD-Peptid (c, j, f, m) bzw. F/R (d, k, g, n) und anschließender LPS-Applikation für 30 min (c, j, d, k) bzw. 4 h (f, m, g, n) beobachtet und mit den Kontrollen (a, h) und alleiniger LPS-Inkubation für 30 min (b, i) bzw. 4 h (e, l) verglichen. Die Pfeile zeigen auf interzelluläre Lücken. Gezeigte Experimente sind repräsentativ für $n > 5$. Maßstab: 20 μm .

3.6. Hemmung der LPS-induzierten NF- κ B-Aktivierung hielt den Zusammenbruch der Endothelbarriere nicht auf

Nach morphologischem Nachweis interzellulärer Lückenbildung untersuchten wir im Folgenden Veränderungen der Barriereeigenschaften mittels Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (transendothelial electric resistance, TER) unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Registrierte Barriereveränderungen wurden in Prozent der Grundlinie aufgetragen.

Kontrollen, denen nur Kulturmedium zugesetzt wurde, blieben sowohl in PSEC als auch in HDMEC über den gesamten Messzeitraum von 24 h konstant auf Grundlinienniveau (Abb. 15 A, B). Zugabe von LPS resultierte in beiden Zelllinien in einem Zusammenbruch der Endothelbarriere, erkennbar an einem Abfall des TER auf $75 \pm 1 \%$ der Grundlinie in PSEC und $80 \pm 3 \%$ in HDMEC 4 h nach Applikation von LPS. Im Zeitverlauf fiel der TER kontinuierlich weiter ab, auf ein Minimum von $70 \pm 1 \%$ der Grundlinie in PSEC und $66 \pm 4 \%$ in HDMEC nach etwa 8 h. Interessanterweise schien es jedoch in beiden Zelllinien zu einer spontanen Regeneration der Endothelbarriere zu kommen. So erreichte der TER-Wert 24 h nach Zugabe von LPS in PSEC und noch rascher in HDMEC beinahe das Ausgangsniveau.

Um die Rolle der LPS-induzierten NF- κ B-Aktivierung in diesem Zusammenhang zu untersuchen, versetzten wir die Endothelzellen in einer Versuchsreihe eine Stunde vor Applikation von LPS mit NBD-Peptid. In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Endothelzellen nur mit NBD-Peptid versetzt, um eine eventuelle Alteration der Endothelbarriere durch das Peptid selbst auszuschließen.

Wie in der unteren Abbildung sichtbar, fiel der TER-Wert auch unter diesen Versuchsbedingungen 4 h nach Zugabe von LPS auf $77 \pm 5 \%$ der Grundlinie in

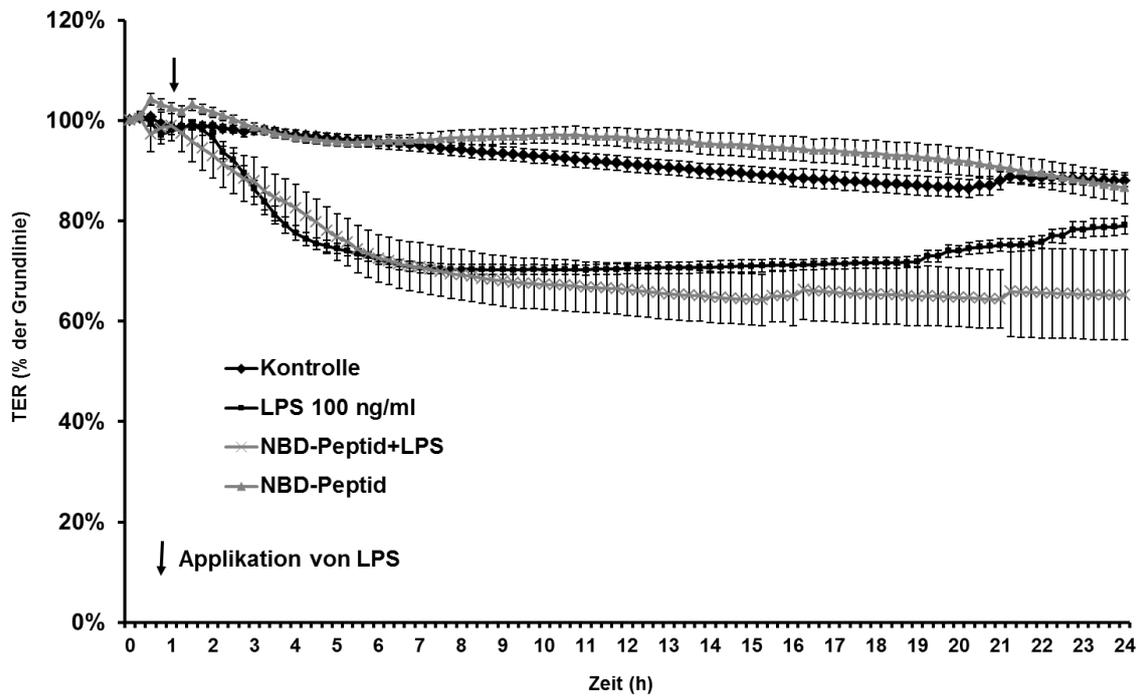
PSEC und $79 \pm 4 \%$ in HDMEC ab. Hemmung der NF- κ B-Aktivierung durch Vorinkubation mit NBD-Peptid verhinderte den LPS-induzierten Barrierezusammenbruch folglich nicht.

Interessanterweise blieb unter diesen Gegebenheiten jedoch die spontane Regeneration des TER-Wertes, wie nach alleiniger LPS-Applikation beobachtet, aus.

Alleinige Inkubation mit NBD-Peptid führte zu keiner relevanten Veränderung des TER-Wertes.

Zusammenfassend lässt sich also schlussfolgern, dass eine Hemmung der LPS-induzierten NF- κ B-Aktivierung den Zusammenbruch der Endothelbarriere nicht aufhält, wohl aber die spontane Regeneration derselben.

A PSEC



B HDMEC

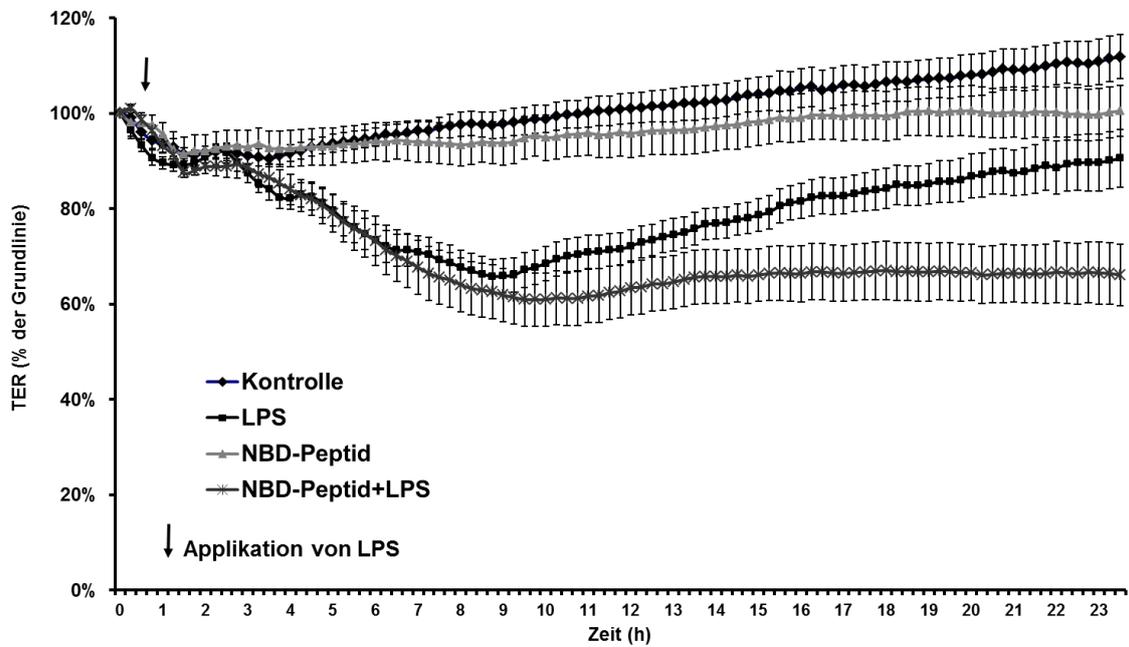


Abbildung 15: Hemmung der LPS-induzierten NF- κ B-Aktivierung hielt den Zusammenbruch der Endothelbarriere nicht auf

In PSEC (A) und HDMEC (B) wurde der TER unter verschiedenen Versuchsbedingungen gemessen, um das Verhalten der Barrierefunktion zu untersuchen. Die Kontrollen blieben über den gesamten Zeitverlauf von 24 h unverändert, wobei es nach Applikation von LPS zu einem Einbruch des TER kam, allerdings mit spontaner Regeneration der Barrierefunktion. Alleinige Inkubation mit NBD-Peptid änderte den TER in beiden Zelllinien nicht. Einstündige Vorbehandlung mit NBD-Peptid verhinderte den Verlust der Barrierefunktion nach LPS-Zugabe nicht, jedoch blieb die spontane Regeneration der Endothelbarriere aus. Repräsentativ für $n > 6$ für jede Versuchsbedingung.

3.7. Repression von p65 mittels siRNA verhinderte den LPS-induzierten Abfall des transendothelialen elektrischen Widerstands in HDMEC nicht

Um die aus unseren Beobachtungen gewonnene Hypothese der Unabhängigkeit des LPS-induzierten Barrierezusammenbruchs von einer NF- κ B-Aktivierung zu überprüfen, versuchten wir in weiteren Experimenten, p65 mittels Transfektion mit einer spezifischen siRNA auszuschalten und so eine NF- κ B-Aktivierung zu verhindern und verfolgten die Auswirkungen auf den transendothelialen elektrischen Widerstand. Um zunächst eine erfolgreiche Transfektion nachzuweisen, wurden Western Blots angefertigt. Während sich unter Kontrollbedingungen oder nach Transfektion von HDMEC mit non-target siRNA eine intensive p65 Bande abzeichnete, verifizierte eine deutlich intensitätsgeminderte p65 Bande nach Transfektion der Zellen mit spezifischer p65 siRNA eine erfolgreiche Repression der NF- κ B-Untereinheit p65, wie bereits weiter oben beschrieben (s. Abb. 7A, B).

Im Anschluss wurden Messungen des transendothelialen elektrischen Widerstands durchgeführt. Unter Kontrollbedingungen, also nur nach Zugabe von Kulturmedium, zeigten sowohl mit non-target als auch mit p65 siRNA transfizierte Zellen einen signifikanten Anstieg des TER-Wertes über den Versuchszeitraum von 24 h auf 125 ± 6 % bzw. 122 ± 2 % ohne signifikante Unterschiede zwischen den beiden Bedingungen (Abb. 16B). Wurden die mit non-target siRNA transfizierten Zellen einer Behandlung mit LPS ausgesetzt, kam es zu einem TER-Abfall auf 71 ± 3 % der Grundlinie nach 4 h, jedoch zu keiner spontanen Regeneration, wie oben beschrieben, in nicht transfizierten und mit LPS behandelten HDMEC. Gleichmaßen führte eine Applikation von

LPS zu mit p65 siRNA transfizierten Endothelzellen zu einer Reduktion des TER-Wertes auf $72\pm 3\%$ des Ausgangswertes nach 4 h, ebenfalls ohne spontane Regeneration der Barrierefunktion. Nach 24 h war der TER-Wert sogar weiter auf $68\pm 4\%$ der Grundlinie gesunken (Abb. 16B). Es bestanden somit keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit non-target und p65 siRNA transfizierten Zellen.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass eine Repression von p65 über eine spezifische siRNA und damit eine Hemmung der NF- κ B-Aktivierung den LPS-induzierten Zusammenbruch der Endothelbarriere nicht verhinderte.

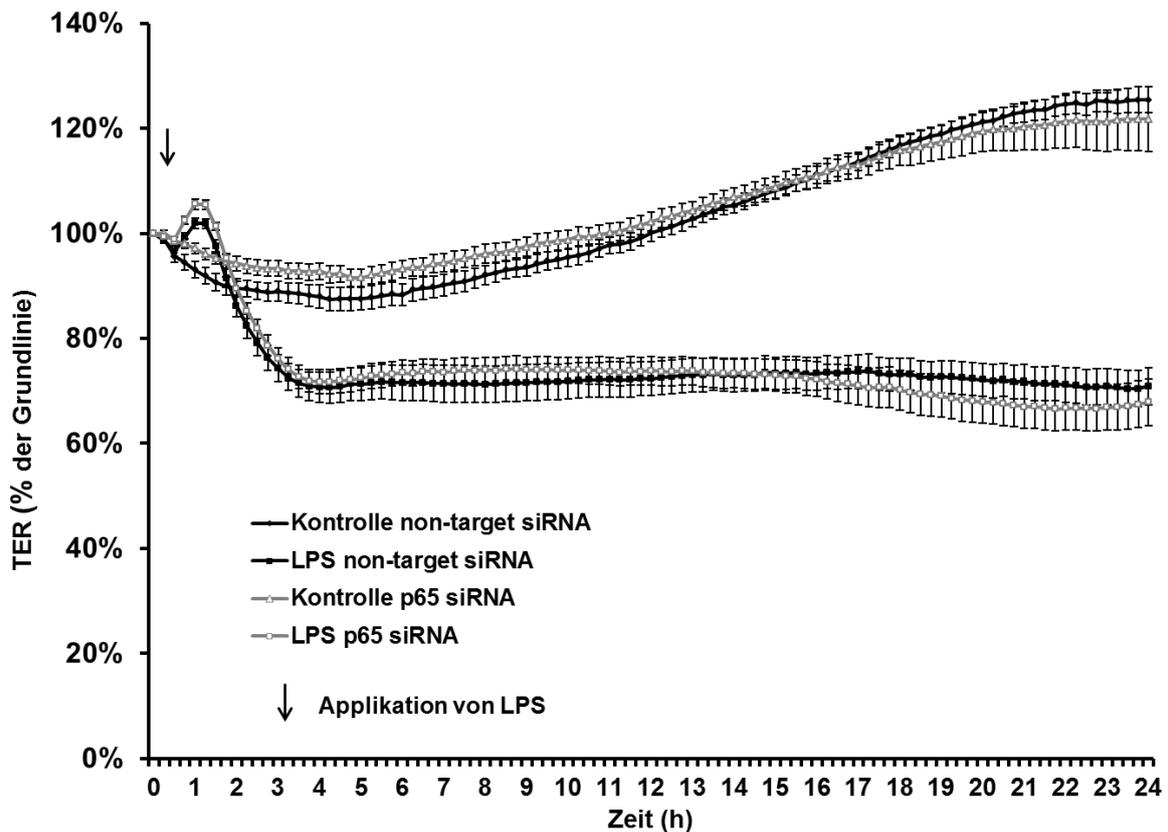


Abbildung 16: Der LPS-induzierte TER-Abfall wurde durch Repression von NF- κ B p65 nicht verhindert

Messungen des TER wurden durchgeführt, um Veränderungen der Endothelbarriere unter den verschiedenen Versuchsbedingungen zu beobachten. Repräsentativ für $n > 5$ für jede Versuchsbedingung.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die systematische Untersuchung der Bedeutung der NF- κ B-Aktivierung für den LPS-induzierten Zusammenbruch der Endothelbarriere, der die Ursache für die ausgeprägte Ödembildung im Rahmen des Krankheitsbilds der Sepsis darstellt.

Wir konnten zeigen, dass LPS in einer makrovaskulären und einer mikrovaskulären Zelllinie zu einer signifikanten NF- κ B-Aktivierung führte. Zudem zeigte sich unter diesen Bedingungen eine drastische Störung der Morphologie der Zelljunctionen mit Lückenbildung sowie der Endothelbarrierefunktion. Nach Langzeitinkubation mit LPS kam es jedoch zu einer spontanen Regeneration der Endothelbarriere.

Erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel verhinderten zwar die Lückenbildung, schienen jedoch die NF- κ B-Translokation zu verstärken.

NBD-Peptid dagegen hemmte die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung, jedoch weder interzelluläre Lückenbildung noch Abfall der TER-Werte. Die spontane Regeneration der Barrierefunktion wurde unter diesen Bedingungen sogar verhindert. Vergleichbare Beobachtungen ließen sich auch nach Transfektion der Zellen mit p65 siRNA machen.

Proteinmengen NF- κ B-abhängiger Proteine wie VASP und Caveolin-1, deren LPS-induzierte Alteration in der Literatur vorgeschlagen wurde, blieben in unseren Experimenten unverändert.

So lässt sich schlussfolgern, dass die NF- κ B-Aktivierung nicht grundlegend für den LPS-induzierten Barrierezusammenbruch verantwortlich ist, sondern möglicherweise Teil eines „Rescue“-Mechanismus der Endothelbarriere darstellen könnte.

4.1. Spezifität der verwendeten NF- κ B p65 Antikörper

Kürzlich hatte die Arbeitsgruppe um Herkenham in einer Publikation Zweifel an der Spezifität verschiedener in zahlreichen vergangenen Studien allgemein hin verwendeter Antikörper gegen NF- κ B p65 geäußert (Herkenham et al., 2011).

In der genannten Veröffentlichung wurde die mangelhafte Spezifität verschiedener Antikörper in NF- κ B-knock-out-Mäusen nachgewiesen. Insbesondere für den monoklonalen Antikörper, den auch wir in unserer vorliegenden Arbeit verwendeten, konnte die Markierung einer deutlichen Bande auf der annähernd exakten Höhe der Proteingröße von p65 in Gehirn, Leber und Milz von Wildtyp-Mäusen detektiert werden, jedoch auch in NF- κ B-knock-out-Tieren. Dagegen ließ sich diese Bande in Präparaten von aus NF- κ B-knock-out-Tieren isolierten Neuronen nicht nachweisen. Diese Beobachtung könnte auf die mögliche Existenz eines kreuzreagierendes Proteins hindeuten, das jedoch nicht in allen Zelltypen vorhanden ist.

Unseren Untersuchungen zufolge fehlt dieses Protein offensichtlich auch in Endothelzellen.

Wir hatten in unseren siRNA-knock-out-Experimenten unter Verwendung des monoklonalen NF- κ B p65-Antikörpers eine konstante Abschwächung der Bande bei 65kDa erhalten. Es ist also von einer spezifischen Erkennung von NF- κ B p65 durch den verwendeten monoklonalen Antikörper auszugehen, was die Verwendung der Ergebnisse unserer Experimente und die daraus gezogenen Schlussfolgerungen rechtfertigt. Gleiches gilt für den verwendeten polyklonalen Antikörper, der in Western Blot-Experimenten und Immunfluoreszenzfärbungen nach Knock-down von NF- κ B p65 offensichtlich ebenfalls kein zusätzliches kreuzreagierendes Protein markierte.

4.2. NBD-Peptid verhindert die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung

In der Vergangenheit erschienen bereits mehrere Artikel, die aufzeigten, dass eine Aktivierung von NF- κ B im Rahmen akuter Entzündungsreaktionen in Endothelzellen zu einer Herauf- oder Herunterregulation diverser Proteine führt (Irwin et al., 2005, Gao et al., 2006, Garrean et al., 2006, Tiruppathi et al., 2008, Henes et al., 2009). So ist bekannt, dass eine NF- κ B-Aktivierung unter Bedingungen akuter Entzündung die intrazelluläre Produktion proinflammatorischer Zytokine im Endothel anregt (Krishnaswamy et al., 1999). In welchem Zusammenhang die NF- κ B-Aktivierung allerdings mit dem

LPS-induzierten Zusammenbruch der Endothelbarriere steht, bleibt bisher umstritten.

Zuvor hatten Ye und Mitarbeiter Untersuchungen an transgenen Mäusen durchgeführt, die selektiv im Endothel eine abbauresistente Variante des NF- κ B-Inhibitorproteins I- κ B überexprimierten. Anhand dieses Modells gelang es ihnen, zu zeigen, dass selektive Hemmung der NF- κ B-Aktivierung im Endothel im Rahmen einer LPS-induzierten Hyperinflammation oder Sepsis zur Repression verschiedener endothelialer Adhäsionsmoleküle führte. Ebenso konnten sie eine abgeschwächte Gefäßpermeabilität, eine verminderte Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in verschiedene Organe, eine Reduktion von Multiorganversagen und systemischer Hypotonie sowie eine aufgehobene intravasale Gerinnung beobachten (Ye et al., 2008). Die Autoren führten zudem Messungen des Quotienten aus Feucht- und Trockenmasse verschiedener Organe der Versuchstiere durch, aus denen sie schlossen, dass eine Hemmung der NF- κ B-Aktivierung zu einer Stabilisierung der Barriereigenschaften des Endothels führte.

Genauere Untersuchungen der interzellulären Kontakte wurden im Zuge der genannten Studie dagegen nicht vorgenommen.

Dies, nämlich die Auswirkungen der NF- κ B-Aktivierung auf die Integrität der Endothelbarriere auf zellulärer Ebene genauer zu beobachten, war das Ziel der vorliegenden Arbeit.

In der vorliegenden Studie beobachteten wir nach Applikation von LPS eine rasche deutliche NF- κ B-Aktivierung sowohl in makrovaskulären PSEC als auch in mikrovaskulären HDMEC. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit vorausgehenden Untersuchungen, die gezeigt hatten, dass LPS in der Lage ist, über Toll-like Rezeptor (TLR)-4-abhängige Signalwege den Transkriptionsfaktor NF- κ B zu aktivieren (Garrean et al., 2006, Lu et al., 2008, Tiruppathi et al., 2008, Xing and Birukova, 2010).

Setzten wir die Zellen über längere Zeiträume bis zu 24 h der LPS-Wirkung aus, so nahm der Zustand der NF- κ B-Aktivierung leicht ab. Dieses Phänomen war in ähnlicher Weise in Lungenendothelzellen beobachtet worden, die auf TNF- α -Applikation mit I κ B α -Phosphorylierung reagierten. Dieser

Phosphorylierungszustand nahm gleichermaßen über einen längeren Zeitraum hinweg graduell ab, blieb aber bis hin zu 24 h nach TNF- α -Zugabe deutlich nachweisbar (Xing and Birukova, 2010).

Um den Einfluss und damit die Bedeutung der NF- κ B-Aktivierung für die Pathogenese des LPS-induzierten Endothelbarrierezusammenbruchs zu untersuchen, verwendeten wir zunächst zwei verschiedene zellgängige Inhibitoren und eine spezifische siRNA. Bay 11-7082, ein Molekül, das die Zytokin-induzierte Phosphorylierung von I κ B α und somit die Aktivierung von NF- κ B verhindert (Pierce et al., 1997), vermochte die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung erfolgreich abzuschwächen. Dies zeigte sich in Immunfluoreszenzfärbungen von Endothelzellen, die wir eine Stunde vor LPS-Applikation mit dem Inhibitormolekül vorbehandelt hatten.

Trotz der in Immunfärbungen dargestellten hervorragenden Wirksamkeit von Bay 11-7082, die Kerntranslokation von p65 NF- κ B zu hemmen, schien dieses Inhibitormolekül jedoch bereits in alleiniger Applikation über andere Effekte die Integrität der Barriere und der Zelle selbst zu stören, sodass es uns im Verlauf nicht gelang, in weiter unten beschriebenen Messungen des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TER) und auch in Immunfluoreszenzfärbungen nach längeren Inkubationszeiträumen verwertbare Ergebnisse zu erarbeiten.

Wir entschieden wir uns deshalb für die Verwendung eines anderen Inhibitors, des IKK-NBD-Peptids. Dieses Peptid verhindert spezifisch die NF- κ B-Aktivierung durch Hemmung der Interaktion der regulatorischen Kinasenuntereinheit IKK (=NEMO) mit dem IKK-Komplex (May et al., 2000, Tiruppathi et al., 2008). Auch mit IKK-NBD-Peptid vorinkubierte mikrovaskuläre und makrovaskuläre Zellen zeigten in der Immunfluoreszenz mit Fn/c-Messung eine deutlich reduzierte NF- κ B-Aktivierung nach LPS-Applikation im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen. Dies bestätigte das Ergebnis einer vorangehenden Studie, in der selbiges Inhibitorpeptid in der gleichen Konzentration, wie wir es in unseren Experimenten einsetzten, die LPS-abhängige NF- κ B-Aktivierung in humanen Lungenendothelzellen hemmte (Tiruppathi et al., 2008). Auffällig war jedoch die Tatsache, dass NBD-Peptid keine vollständige Hemmung der NF- κ B-Aktivierung erzielen konnte, was Bay

11-7082 im Übrigen ebensowenig möglich gelang. Wie aus Abb. 11 ersichtlich, waren die Fn/c-Werte sowohl nach 30-minütiger als auch nach vierstündiger LPS-Inkubation auch in mit NBD-Peptid vorbehandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollen immernoch erhöht. 24 h nach Applikation von LPS zu mit NBD-Peptid vorbehandelten Zellen zeigte die Darstellung der NF- κ B-Aktivierung keine erkennbaren Unterschiede zu Kontrollen, wohingegen eine alleinige LPS-Inkubation immernoch eine deutliche Aktivierung des Transkriptionsfaktors auslöste. NBD-Peptid verlor seine Wirkung also auch nach langen Inkubationszeiten nicht.

Erwähnenswert bleibt, dass alleinige Inkubation der Zellen mit NBD-Peptid in der TER-Messung keine Veränderung des Widerstands im Vergleich zum Kontrollniveau nach sich zog. Da diese Methode doch recht empfindlich auf jegliche Alterationen der Endothelzellbarriere und -integrität reagiert, lässt sich ableiten, dass sich Effekte der NF- κ B-Aktivierung von LPS auf die Endothelbarriere ohne Verfälschung durch Einflüsse des Hemmpeptids selbst evaluieren lassen.

Da es uns im ersten Ansatz nicht gelungen war, eine vollständige Hemmung der Kerntranslokation von p65 nach 30 min und 4 h zu erreichen, verwendeten wir zusätzlich eine spezifische p65 siRNA, um weitere Hemmversuche der NF- κ B-Aktivierung in HDMEC durchzuführen, wie dies auch bereits in vorangehenden Studien beschrieben wurde (Tiruppathi et al., 2008). Der Nachteil dieser Herangehensweise in Anlehnung an unsere vorherigen Methoden besteht jedoch darin, dass eine Transfektion unseren Erfahrungen nach zu einer stärkeren Empfindlichkeit der Endothelzellkulturen während des Reifungsprozesses der Zellkontakte sowie zum Zelltod nach spätestens 72 h führt, unabhängig davon, mit welcher Art von siRNA transfiziert wird. Um unter diesen Umständen möglichst repräsentative Ergebnisse zu erhalten, entschieden wir uns deshalb, die Experimente frühestmöglich nach Konfluenz der Zellen zu beginnen. Die Tatsache, dass die Reifung der Zellkontakte zu diesem Zeitpunkt möglicherweise noch nicht ganz abgeschlossen ist, erklärt möglicherweise, warum es bei den Messungen des TER-Wertes zu einem

Anstieg der Kontrollen, und zwar sowohl der mit non-target als auch mit p65 siRNA transfizierten, über den Messzeitraum von 24 h kam.

4.3. Hemmung der NF- κ B-Aktivierung verhindert den Zusammenbruch der Endothelbarriere nicht

Unsere Daten zeigen, dass eine Blockierung der NF- κ B-Aktivierung, sowohl durch zwei verschiedene Inhibitoren, als auch durch eine spezifische siRNA, einen LPS-induzierten Zusammenbruch der Endothelbarriere nicht verhindert. Diese Tatsache spricht gegen eine nennenswerte Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B am Zusammenbruch der Endothelbarriere unter Einwirkung von LPS. Darüber hinaus konnten wir unter diesen Bedingungen in sämtlichen Einzelversuchen keine Veränderungen von Caveolin-1 oder VASP, beides an der Barriereintegrität beteiligte und bekanntermaßen NF- κ B-abhängige Proteine, feststellen (Mehta and Malik, 2006a, Schlegel and Waschke, 2010), auch wenn dieses Ergebnis im Widerspruch zu vorangegangenen Beobachtungen steht. Diese berichteten von einer vermehrten Expression von Caveolin-1 in Endothelzellen 4h nach Applikation von LPS (Tiruppathi et al., 2008). Der Widerspruch zwischen unseren Daten und den Ergebnissen der letzteren Untersuchung lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die vermehrte Caveolin-1-Expression in jener Studie mit höheren Dosen von LPS erreicht wurde als wir sie in unseren Experimenten einsetzten (bis 8 μ g/ml im Vergleich zu 100 ng/ml in unserer Studie). Zieht man jedoch in Betracht, dass LPS-Spiegel im Blut von an Sepsis leidenden Patienten im Bereich zwischen 0,26 ng/ml und 300 ng/ml liegen (Scheifele et al., 1985, Dofferhoff et al., 1991), so ist die pathophysiologische Bedeutung einer nur durch Applikation höherer Dosen von LPS provozierten Hochregulation von Caveolin-1 kritisch zu hinterfragen.

Ein weiteres Ergebnis einer früheren Studie, das wir nicht reproduzieren konnten, war die Repression von VASP, die im Zuge der inflammationsassoziierten NF- κ B-Aktivierung beobachtet worden war (Henes et al., 2009). In jener Studie wurde die VASP-Repression durch Applikation

verschiedener proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , Interleukin-6 und Interleukin-1 β induziert (Henes et al., 2009). In unseren Versuchen dagegen blieben VASP-Mengen nach Inkubation der Endothelzellen mit LPS auch über längere Zeiträume hinweg unverändert. Diese Beobachtung unterstützt wiederum indirekt unsere Schlussfolgerung, dass die NF- κ B-Aktivierung am LPS-induzierten Zusammenbruch der Endothelbarriere nicht beteiligt ist.

Wie bereits oben erwähnt, berichtete eine andere Studie von der Beobachtung einer Verminderung des Quotienten aus Feucht- und Trockengewicht verschiedener Organe nach endothelspezifischer Repression der inflammationsassoziierten NF- κ B-Aktivierung, die zu der Hypothese geführt hatte, NF- κ B spiele in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle im für den Zusammenbruch der Endothelbarriere verantwortlichen Mechanismus (Ye et al., 2008). Die Unterschiede zu unseren Ergebnissen lassen sich nur zum Teil durch speziesspezifische Unterschiede zwischen den in der vorliegenden Studie verwendeten Endothelzellen aus Mensch bzw. Schwein und dem Mausmodell in der obigen Untersuchung erklären. Beachtenswerter ist in dieser Hinsicht aber wohl die Erkenntnis, dass aktivierte Endothelzellen im Rahmen von Entzündungsprozessen für einen beträchtlichen Anteil an der Produktion von Zytokinen verantwortlich sind (Hack and Zeerleder, 2001), die bekanntermaßen NF- κ B-abhängig ist (Krishnaswamy et al., 1999).

Auf Grund dieser Gegebenheiten ist es also durchaus in Betracht zu ziehen, dass der protektive Einfluss einer endothelspezifischen Repression der NF- κ B-Aktivierung auf die Barriereintegrität nicht direkt auf diesem Mechanismus selbst beruhen, sondern als sekundärer Effekt aus einer Suppression der systemischen Entzündungsreaktion resultieren könnte. Die vorliegende Arbeit kann also einen wichtigen Beitrag leisten, diese Unterschiede genauer zu beleuchten und zu analysieren.

Wir unternahmen daraufhin einen weiteren Versuch, eine mögliche Beteiligung von NF- κ B am LPS-induzierten Verlust der Barriereintegrität zu untersuchen und prüften, ob eine Abhängigkeit der Aktivierung von NF- κ B in Endothelzellen vom intrazellulären Spiegel des Signalmoleküls cAMP besteht. Diese Überlegung lag nahe, da eine Veränderung der cAMP-Signaltransduktion

beziehungsweise ein erniedrigter intrazellulärer cAMP-Spiegel eine wichtige Rolle beim Zusammenbruch der Endothelbarriere spielt (Koga et al., 1995, Bogatcheva et al., 2009, Schlegel et al., 2009, Schlegel and Waschke, 2009). Eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration verhinderte in unseren Experimenten zwar eine durch LPS ausgelöste Bildung interzellulärer Lücken, eine Aktivierung von NF- κ B erschien unter diesen Bedingungen jedoch unbeeinflusst im Vergleich zu alleiniger LPS-Behandlung (Vgl. Abb. 13 und 14). Eine Beteiligung von NF- κ B an barrierekompromittierenden Effekten als direkte Folge eines durch die LPS-Wirkung erniedrigten cAMP-Spiegels ist demzufolge unwahrscheinlich. Dies wird zudem durch die Beobachtung unterstützt, dass alleinige Erhöhung des cAMP-Spiegels zu einer Aktivierung von NF- κ B führte, ohne die Unversehrtheit der Barriere zu zerstören. Vielmehr bestätigt dieses Ergebnis die Daten früherer Studien, die aufzeigen, dass der LPS-induzierte Barrierezusammenbruch durch Signalwege vermittelt wird, die über eine Alteration der zytoskelettalen Dynamik Einfluss auf interzelluläre Junctionsproteine ausüben (Bogatcheva et al., 2009, Schlegel et al., 2009, Bogatcheva et al., 2011).

4.4. Die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung könnte einen „Rescue“-Mechanismus der Endothelbarriere initiieren

In unseren Messungen des transendothelialen elektrischen Widerstands (TER) zeigte sich eine spontane Regeneration der Endothelbarriere, die etwa 10 h nach Applikation von LPS begann und zu einem Wiederanstieg des TER beinahe auf Ausgangsniveau nach 24 h führte (Vgl. Abb. 15). Von ähnlichen Beobachtungen berichteten bereits Bogatcheva und ihre Arbeitsgruppe (Bogatcheva et al., 2009, Bogatcheva et al., 2011). Dagegen wurde keine spontane Erholung der Endothelbarriere beobachtet, wenn extrem hohe Dosen von LPS bis 10 μ g/ml verwendet wurden (He et al., 2011). Gleichermaßen blieb die spontane Regeneration nach Transfektion von HDMEC mit non-target siRNA bzw. p65 siRNA aus. Wie bereits weiter oben ausgeführt, ist diese

Beobachtung wahrscheinlich auf eine erhöhte Empfindlichkeit der Zellen im Allgemeinen und der Zellkontakte im Speziellen unter diesen besonderen Versuchsbedingungen zurückzuführen.

Wir verwendeten in unseren Versuchen reine Endothelzellkulturen, eine Reaktion anderer Zelltypen auf die Einwirkung von LPS mit Beeinflussung der Barriereigenschaften ist somit als Störgröße ausgeschlossen.

Dass die spontane Regeneration der Endothelbarriere zudem unter ununterbrochener LPS-Exposition stattfand, könnte zusätzlich die Vermutung unterstützen, dass sich die Endothelzellen durch autokrine oder parakrine Signalmechanismen selbst vor barriereschädigenden Einflüssen zu schützen versuchen. Diese Hypothese stützt die Beobachtung aus früheren Studien, dass für die Aufrechterhaltung einer stabilen Barrierefunktion unter Kontrollbedingungen eine kontinuierliche Aktivität von β -Adrenorezeptoren vonnöten ist (Spindler and Waschke, 2011). Die Liganden, die eine stetige Stimulation der β -Adrenorezeptoren bewirken, scheinen dabei direkt aus dem Endothel selbst zu stammen (Spindler and Waschke, 2011). Zudem wurde bereits beschrieben, dass Endothelzellen unter hypoxischem Stress oder Einwirkung von LPS Prostaglandin (PG) E_2 und PGI $_2$ ausschütten, um sich dadurch möglicherweise im Sinne eines „Rescue“-Mechanismus auf autokrinem oder parakrinem Wege vor einem Zusammenbruch der Endothelbarriere zu schützen oder die verlorene Barrierefunktion wieder herzustellen (Sawyer et al., 2001).

Vor diesem Hintergrund ist es durchaus bemerkenswert, dass in unseren Experimenten eine spontane Regeneration der Endothelbarriere nach LPS-Applikation ausblieb, wenn die NF- κ B-Aktivierung blockiert wurde. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung nicht schädigt, also nicht Teil des Pathomechanismus, sondern möglicherweise vielmehr eines „Rescue“-Mechanismus darstellen könnte, der eine Rekonstitution der Endothelbarriere gewährleistet.

Die Beobachtung, dass eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch Forskolin/Rolipram zu einer Aktivierung von NF- κ B führte, während die Barriere durch diese Bedingungen stabilisiert wurde, stützt diese Hypothese zusätzlich.

Diese Interpretation würde darüber hinaus zu Ergebnissen aus Studien an Darmgewebe passen. Wie aus diesen hervorgeht, wurden bestimmte mikrobielle Produkte aus dem Darmlumen von epithelialen Toll-like-Rezeptoren (TLRs) erkannt. In der Folge kam es auch hier zu einer Aktivierung von NF- κ B. Diese führte interessanterweise nicht nur zu einer Stimulation der Immunabwehr gegen pathogene Faktoren, sondern förderte auch Schutzmechanismen der Darmepithelbarriere selbst (Spehlmann and Eckmann, 2009).

Zieht man diese Beobachtung in Betracht sowie die zuvor genannte Hypothese einer möglichen Fähigkeit von Prostaglandinen, welche nebenbei bemerkt NF- κ B-abhängige Transkriptionsprodukte sind, autokrine und parakrine „Rescue“-Mechanismen zur Wiederherstellung der Endothelbarrierefunktion in Gang zu setzen, so kann man zu der Überlegung gelangen, dass die NF- κ B-Aktivierung Teil eines „Rescue“-Mechanismus im Endothel sein könnte. Interessant wäre in diesem Zusammenhang eine nähere Betrachtung der Cyclooxygenase-II (Cox-II) als bekanntermaßen für die Prostaglandinproduktion entscheidendes und zudem NF- κ B-abhängiges Enzym, also denkbarer Teil eines „Rescue“-Mechanismus, insbesondere die Reaktion des Enzyms auf LPS unter Hemmung von NF- κ B.

Einen möglichen „Rescue“-Mechanismus und seinen Signalweg im Detail zu erforschen, wird nun Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, mit dem Ziel, neue Therapieoptionen aufzudecken um dem folgeschweren Zusammenbruch der Endothelbarriere im Rahmen von akuten Entzündungsreaktionen und Sepsis entgegenzuwirken oder vorzubeugen.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Eine intakte Endothelbarriere ist eine unabdingbare Voraussetzung für die uneingeschränkte Funktion sämtlicher Organe. Wird die Barrierefunktion durch entzündliche Prozesse gestört, so kommt es zum Austritt von Gefäßflüssigkeit ins Interstitium. Dies resultiert in Organversagen und ist Mitverursacher der hohen Sterblichkeit bei systemischen Entzündungsreaktionen und Sepsis.

Vorangehende Untersuchungen haben bereits wichtige Mechanismen aufgedeckt, die zum Barriereverlust führen (Schlegel et al., 2009). In dieser Studie wurde untersucht, ob die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B für den LPS-induzierten Zusammenbruch der Endothelbarriere von Bedeutung ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Einwirkung von LPS in zwei verschiedenen Endothelzelllinien, den makrovaskulären PSEC sowie den mikrovaskulären HDMEC, zu einer signifikanten Aktivierung von NF- κ B führte. Dies wurde sowohl mittels Kernextraktionsversuchen als auch durch Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen.

Messungen des TER zeigten eine Abnahme des endothelialen Widerstands und folglich der Barrierefunktion nach Applikation von LPS, gefolgt von einer spontanen Regeneration der Barriere nach einer Inkubationszeit von 24 h.

Eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch Applikation von Forskolin/Rolipram verhinderte zwar die LPS-induzierte Bildung interzellulärer Lücken, nicht jedoch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Vielmehr verstärkte eine cAMP-Erhöhung sogar eine NF- κ B-Aktivierung in HDMEC nach 4 h, ohne die Morphologie der Endothelzelljunctionen zu schädigen.

Der selektive NF- κ B-Inhibitor NBD-Peptid vermochte im Gegensatz dazu die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung deutlich zu hemmen, verhinderte allerdings weder die interzelluläre Lückenbildung noch den Abfall des TER durch LPS. Im Gegenteil – da unter Einwirkung von NBD-Peptid die spontane Regeneration des TER nach LPS-Applikation ausblieb, schienen barrierekompromittierende Effekte von LPS durch Hemmung der NF- κ B-Aktivierung mittels NBD-Peptid sogar verstärkt zu werden.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen hemmte auch die Repression von NF- κ B p65 durch eine spezifische p65 siRNA den LPS-induzierten Zusammenbruch der Endothelbarriere nicht.

Weitere NF- κ B-abhängige Proteine wie VASP und Caveolin-1, deren Beteiligung am Pathomechanismus von anderen Arbeitsgruppen vorgeschlagen wurde, blieben in unseren Experimenten unter LPS-Exposition unverändert.

Zusammenfassend scheint die NF- κ B-Aktivierung initial nicht entscheidend am LPS-induzierten Zusammenbruch der Endothelbarriere beteiligt zu sein. Unsere Ergebnisse legen vielmehr nahe, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors möglicherweise Teil eines „Rescue“-Mechanismus sein könnte.

6. Literaturverzeichnis

- Bannerman DD, Goldblum SE (2003) Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284:L899-914.
- Baumer Y, Burger S, Curry FE, Golenhofen N, Drenckhahn D, Waschke J (2008) Differential role of Rho GTPases in endothelial barrier regulation dependent on endothelial cell origin. *Histochem Cell Biol* 129:179-191.
- Benninghoff A, Drenckhahn D (eds.) (2004) *Anatomie, Band 2*, Urban&Fischer.
- Bogatcheva NV, Zemskova MA, Kovalenkov Y, Poirier C, Verin AD (2009) Molecular mechanisms mediating protective effect of cAMP on lipopolysaccharide (LPS)-induced human lung microvascular endothelial cells (HLMVEC) hyperpermeability. *J Cell Physiol* 221:750-759.
- Bogatcheva NV, Zemskova MA, Poirier C, Mirzapoiazova T, Kolosova I, Bresnick AR, Verin AD (2011) The suppression of myosin light chain (MLC) phosphorylation during the response to lipopolysaccharide (LPS): beneficial or detrimental to endothelial barrier? *Journal of cellular physiology* 226:3132-3146.
- Bonizzi G, Karin M (2004) The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25:280-288.
- Cinel I, Dellinger RP (2007) Advances in pathogenesis and management of sepsis. *Curr Opin Infect Dis* 20:345-352.
- Corsini E, Viviani B, Marinovich M, Galli CL (1997) Role of mitochondria and calcium ions in tributyltin-induced gene regulatory pathways. *Toxicol Appl Pharmacol* 145:74-81.
- Dejana E (2004) Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:261-270.
- Dofferhoff AS, Nijland JH, de Vries-Hospers HG, Mulder PO, Weits J, Bom VJ (1991) Effects of different types and combinations of antimicrobial agents on endotoxin release from gram-negative bacteria: an in-vitro and in-vivo study. *Scand J Infect Dis* 23:745-754.

- Dudek SM, Garcia JG (2001) Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *Journal of applied physiology* 91:1487-1500.
- Gao J, Zhao WX, Zhou LJ, Zeng BX, Yao SL, Liu D, Chen ZQ (2006) Protective effects of propofol on lipopolysaccharide-activated endothelial cell barrier dysfunction. *Inflamm Res* 55:385-392.
- Garcia JG, Liu F, Verin AD, Birukova A, Dechert MA, Gerthoffer WT, Bamberg JR, English D (2001) Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest* 108:689-701.
- Garrean S, Gao XP, Brovkovich V, Shimizu J, Zhao YY, Vogel SM, Malik AB (2006) Caveolin-1 regulates NF-kappaB activation and lung inflammatory response to sepsis induced by lipopolysaccharide. *Journal of immunology* 177:4853-4860.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16:225-260.
- Giloh H, Sedat JW (1982) Fluorescence microscopy: reduced photobleaching of rhodamine and fluorescein protein conjugates by n-propyl gallate. *Science (New York, NY)* 217:1252-1255.
- Gong P, Angelini DJ, Yang S, Xia G, Cross AS, Mann D, Bannerman DD, Vogel SN, Goldblum SE (2008) TLR4 Signaling Is Coupled to SRC Family Kinase Activation, Tyrosine Phosphorylation of Zonula Adherens Proteins, and Opening of the Paracellular Pathway in Human Lung Microvascular Endothelia. *J Biol Chem* 283:13437-13449.
- Hack CE, Zeerleder S (2001) The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med* 29:S21-27.
- Hartmann C, Zozulya A, Wegener J, Galla H-J (2007) The impact of glia-derived extracellular matrices on the barrier function of cerebral endothelial cells: An in vitro study. *Experimental Cell Research* 313:1318-1325.

- He F, Peng J, Deng XL, Yang LF, Wu LW, Zhang CL, Yin F (2011) RhoA and NF-kappaB are involved in lipopolysaccharide-induced brain microvascular cell line hyperpermeability. *Neuroscience* 188:35-47.
- Henes J, Schmit MA, Morote-Garcia JC, Mirakaj V, Kohler D, Glover L, Eldh T, Walter U, Karhausen J, Colgan SP, Rosenberger P (2009) Inflammation-associated repression of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) reduces alveolar-capillary barrier function during acute lung injury. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23:4244-4255.
- Herkenham M, Rathore P, Brown P, Listwak SJ (2011) Cautionary notes on the use of NF-kappaB p65 and p50 antibodies for CNS studies. *J Neuroinflammation* 8:141.
- Irwin DC, Tissot van Patot MC, Tucker A, Bowen R (2005) Direct ANP inhibition of hypoxia-induced inflammatory pathways in pulmonary microvascular and macrovascular endothelial monolayers. *vol. 288, pp L849-859.*
- Kapuscinski J (1995) DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem* 70:220-233.
- Koga S, Morris S, Ogawa S, Liao H, Bilezikian JP, Chen G, Thompson WJ, Ashikaga T, Brett J, Stern DM, et al (1995) TNF modulates endothelial properties by decreasing cAMP. *vol. 268, pp C1104-1113.*
- Krishnaswamy G, Kelley J, Yerra L, Smith JK, Chi DS (1999) Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *J Interferon Cytokine Res* 19:91-104.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lee WL, Slutsky AS (2010) Sepsis and endothelial permeability. *The New England journal of medicine* 363:689-691.
- Levy MM, Dellinger RP, Townsend SR, Linde-Zwirble WT, Marshall JC, Bion J, Schorr C, Artigas A, Ramsay G, Beale R, Parker MM, Gerlach H, Reinhart K, Silva E, Harvey M, Regan S, Angus DC (2010) The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based

- performance improvement program targeting severe sepsis. *Critical care medicine* 38:367-374.
- Li Q, Verma IM (2002) NF-kappaB regulation in the immune system. *Nature reviews Immunology* 2:725-734.
- Libby P, Aikawa M, Jain MK (2006) Vascular endothelium and atherosclerosis. *Handbook of experimental pharmacology* 285-306.
- Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS (2008) LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42:145-151.
- May MJ, D'Acquisto F, Madge LA, Glockner J, Pober JS, Ghosh S (2000) Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex. *Science (New York, NY)* 289:1550-1554.
- Mehta D, Malik AB (2006a) Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiological reviews* 86:279-367.
- Michel CC, Curry FE (1999) Microvascular permeability. *Physiological reviews* 79:703-761.
- Nakamura K, Tanaka T, Kuwahara A, Takeo K (1985) Microassay for proteins on nitrocellulose filter using protein dye-staining procedure. *Analytical biochemistry* 148:311-319.
- Opal SM (2007) The host response to endotoxin, antilipopolysaccharide strategies, and the management of severe sepsis. *International Journal of Medical Microbiology* 297:365-377.
- Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, Best J, Moore SA, Collins T, Gerritsen ME (1997) Novel inhibitors of cytokine-induced IkappaBalpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *The Journal of biological chemistry* 272:21096-21103.
- Raetz CR, Whitfield C (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71:635-700.
- Rauert H, Wicovsky A, Muller N, Siegmund D, Spindler V, Waschke J, Kneitz C, Wajant H (2010) Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100

- processing via TNF receptor-2 (TNFR2). *The Journal of biological chemistry* 285:7394-7404.
- Rothwarf DM, Karin M (1999) The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE* 1999:RE1.
- Sawyer SJ, Norvell SM, Ponik SM, Pavalko FM (2001) Regulation of PGE(2) and PGI(2) release from human umbilical vein endothelial cells by actin cytoskeleton. *American journal of physiology Cell physiology* 281:C1038-1045.
- Scheifele DW, Olsen EM, Pendray MR (1985) Endotoxemia and thrombocytopenia during neonatal necrotizing enterocolitis. *Am J Clin Pathol* 83:227-229.
- Schick MA, Wunder C, Wollborn J, Roewer N, Waschke J, Germer CT, Schlegel N (2012) Phosphodiesterase-4 inhibition as a therapeutic approach to treat capillary leakage in systemic inflammation. *The Journal of physiology* 590:2693-2708.
- Schlegel N, Baumer Y, Drenckhahn D, Waschke J (2009) Lipopolysaccharide-induced endothelial barrier breakdown is cyclic adenosine monophosphate dependent in vivo and in vitro. *Critical care medicine* 37:1735-1743.
- Schlegel N, Waschke J (2009) Impaired cAMP and Rac 1 signaling contribute to TNF-alpha-induced endothelial barrier breakdown in microvascular endothelium. *Microcirculation* 16:521-533.
- Schlegel N, Waschke J (2010) Vasodilator-stimulated phosphoprotein: crucial for activation of Rac1 in endothelial barrier maintenance. *Cardiovascular research* 87:1-3.
- Schletter J, Heine H, Ulmer AJ, Rietschel ET (1995) Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbiol* 164:383-389.
- Schnittler HJ, Franke RP, Akbay U, Mrowietz C, Drenckhahn D (1993) Improved in vitro rheological system for studying the effect of fluid shear stress on cultured cells. *Am J Physiol* 265:C289-C298.

- Sen R, Baltimore D (1986) Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47:921-928.
- Siomi H, Siomi MC (2009) On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 457:396-404.
- Spehlmann ME, Eckmann L (2009) Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. *Curr Opin Gastroenterol* 25:92-99.
- Spindler V, Schlegel N, Waschke J (2010) Role of GTPases in control of microvascular permeability. *Cardiovascular research* 87:243-253.
- Spindler V, Waschke J (2011) Beta-adrenergic stimulation contributes to maintenance of endothelial barrier functions under baseline conditions. *Microcirculation* 18:118-127.
- Tiruppathi C, Malik AB, Del Vecchio PJ, Keese CR, Giaever I (1992) Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: assessment of endothelial barrier function. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 89, pp 7919-7923.
- Tiruppathi C, Shimizu J, Miyawaki-Shimizu K, Vogel SM, Bair AM, Minshall RD, Predescu D, Malik AB (2008) Role of NF- κ B-dependent Caveolin-1 Expression in the Mechanism of Increased Endothelial Permeability Induced by Lipopolysaccharide. vol. 283, pp 4210-4218.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24:145-149.
- Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB (2008) Regulation of endothelial junctional permeability. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1123:134-145.
- Waschke J, Drenckhahn D, Adamson RH, Barth H, Curry FE (2004) cAMP protects endothelial barrier functions by preventing Rac-1 inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H2427-H2433.
- Whitehead TP, Kricka LJ, Carter TJ, Thorpe GH (1979) Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin Chem* 25:1531-1546.

- Wojciak-Stothard B, Ridley AJ (2002) Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol* 39:187-199.
- Xing J, Birukova AA (2010) ANP attenuates inflammatory signaling and Rho pathway of lung endothelial permeability induced by LPS and TNFalpha. *Microvascular research* 79:56-62.
- Ye X, Ding J, Zhou X, Chen G, Liu SF (2008) Divergent roles of endothelial NF-kappaB in multiple organ injury and bacterial clearance in mouse models of sepsis. *The Journal of experimental medicine* 205:1303-1315.

Zur Literatursuche diene folgende Internetseite:

PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Leweke
Vorname	Rhea
Familienstand	ledig
Geburtsdatum und -ort	14.03.1986, Tübingen
Anschrift	

Schulbildung

09/1992-08/1996	Grundschule Unterjesingen
09/1996-07/2005	Wildermuth-Gymnasium Tübingen, Abitur

Hochschulbildung

10/2005-03/2007	Studium der Ernährungswissenschaft, Universität Hohenheim
04/2007-06/2013	Studium der Humanmedizin, Julius-Maximilian-Universität Würzburg
06/2009	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/2013	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation als Ärztin

Berufliche Tätigkeit

Seit 10/2013	Assistenzärztin in der Abteilung für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie des Klinikums Konstanz
--------------	---

Verzeichnis der wissenschaftlichen Arbeiten

1. Arbeiten in Zeitschriften mit Gutachtersystem

Schlegel N¹, Leweke R¹, Meir M, Germer CT, Waschke J (2012) Role of NF-κB activation in LPS-induced endothelial barrier breakdown. *Histochem Cell Biol.* 2012 Oct; 138(4):627-412.

¹ geteilte Erstautorschaft

2. Veröffentlichte Abstracts/ Kongressbeiträge

Schlegel N, Leweke R, Germer CT, Waschke J (2010) Role of NF-κB in LPS-induced endothelial barrier breakdown
27. Arbeitstagung der Deutschen Anatomischen Gesellschaft vom 29.09.-01.10.2010 in Würzburg

Schlegel N, Leweke R, Germer CT, Waschke J (2011) Die Bedeutung der NF-κB Aktivierung für den LPS-induzierten Zusammenbruch der Endothelbarriere
88. Bayerischer Chirurgenkongress vom 20.07.- 22.07.2011 in München

Leweke R, Meir M, Germer CT, Waschke J, Schlegel N (2012) Role of NF-κB in LPS-induced endothelial barrier breakdown
129. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie in Berlin vom 24.04.-27.04.2012

Schlegel N, Leweke R, Germer CT, Waschke J (2012) Role of NF-κB in LPS-induced endothelial barrier breakdown
16. Chirurgische Forschungstage in Regensburg vom 04.10.- 06.2012 in Regensburg

Würzburg, Juni 2013