

Olympia Ekaterini Psathaki

**Die Analyse der Endothelzell-Leukozyten-Interaktion
an der Blut-Hirn Schranke *in vitro*:
Eine morphologische, biophysikalische und
immunzytochemische Studie**

-2003-

Zellbiologie/Biochemie

**Die Analyse der Endothelzell-Leukozyten-Interaktion
an der Blut-Hirn Schranke *in vitro*:
Eine morphologische, biophysikalische und
immunzytochemische Studie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Olympia Ekaterini Psathaki
aus Iraklion/Kreta (Griechenland)

-2003-

Dekan:

Prof.Dr. J. Leker

Erster Gutachter:

Prof. Dr. H.-J. Galla

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. K.-H. Klempnauer

Tag der mündlichen Prüfung:

10.07.03; 14.07.03; 24.07.03

Tag der Promotion:

25.07.2003

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Blut-Hirn-Schranke.....	1
1.2 Immunüberwachung und Entzündungsreaktion	5
1.2.1 Die Immunüberwachung des Zentralen Nervensystems	6
1.2.2 Die Blut-Hirn-Schranke im Kontext der entzündlichen Reaktion.....	10
1.3 Die Endothelzell-Leukozyten-Interaktion	12
1.3.1 Die Adhäsionskaskade	12
1.3.2 Die Leukozyten-Diapedese	20
1.3.2.1 Die parazelluläre Transmigration	21
1.3.2.2 Die transzelluläre Transmigration.....	28
1.3.3 Die BHS im Kontext der Leukozyten-Transmigration	29
2. Methoden.....	33
2.1 Zellbiologische Methoden.....	33
2.1.1 Cerebrale Kapillarendothelzellen aus dem Schweinehirn.....	33
2.1.1.1 Präparation	33
2.1.1.2 Subkultivierung der PBCEC	36
2.1.1.3 Beschichtung der Kulturgefäße	37
2.1.1.4 Präparation des Rattenschwanzcollagens	38
2.1.1.5 Mediumwechsel.....	39
2.1.1.6 Gewinnung konditionierter Medien der PBCEC	39
2.1.2 Die Leukozyten-Isolierung	39
2.1.2.1 Neutrophile Granulozyten.....	40
2.1.2.2 T-Helferzellen	41
2.1.2.3 Vitalitätsbestimmung der Leukozyten	43
2.1.2.4 Gewinnung konditionierter Medien der Leukozyten	45
2.2 Elektronenmikroskopie	46
2.2.1. Rasterelektronenmikroskopie	46
2.2.2 Transmissionselektronenmikroskopie.....	48
2.3 Proteinbiochemische Methoden	51
2.3.1 SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)	51
2.3.1.1 Probenaufbereitung	53

2.3.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford (1976).....	54
2.3.1.3 Proteinbestimmung nach (Lowry et al., 1951)	55
2.3.2 Immunoblot	56
2.3.2.1 Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulose (Western Blot)	56
2.3.2.2 Western Blot	56
2.3.3 Immunzytochemische Methoden.....	59
2.3.4 Enzymbiochemische Methoden	61
2.3.4.1 Bestimmung der Caspase-3-Aktivität	61
2.3.4.2 Bestimmung der Matrixmetalloproteasen (Zymographie).....	64
2.4 Molekularbiologische Methoden	68
2.4.1 `DNA-Ladder`	68
2.4.1.1 Isolierung der DNA.....	68
2.4.1.2 Agarose-Gelelektrophorese	68
2.4.1.3 Detektion der DNA-Fragmente	69
2.5 Biophysikalische Methoden	70
2.5.1 Grundlagen der Impedanzspektroskopie	70
2.5.1.1 Der transendotheliale elektrische Widerstand	70
2.5.1.2 Physikalische Grundlagen	71
2.5.1.3 Die Bestimmung des TER mittels der Impedanzspektroskopie	73
2.5.2 ECIS.....	75
2.5.2.1 Messprinzip.....	75
2.5.2.2 Modell zu Auswertung der Impedanzspektren	78
2.5.2.3 Messaufbau	81
3 Ergebnisse	83
3.1 Das Entzündungsmodell der BHS <i>in vitro</i>	83
3.1.1 Der Einfluss der Kulturbedingung.....	83
3.1.1.1 Impedanzspektroskopische Untersuchungen.....	84
3.1.1.2 Ultrastrukturelle und immunzytochemische Untersuchung	95
3.1.1.3 Apoptose-Studien	107
3.1.2 Die Entzündungsaktivierung	121
3.1.2.1 Serum	121
3.1.2.2 TNF- α	124
3.1.2.3 LPS	144
3.1.2.4 Die Matrixmetalloproteasen-Sekretion.....	146
3.2 Die Endothelzell-Leukozyten-Interaktion	149
3.2.1 Vitalitätsbestimmung der Leukozyten.....	149

3.2.1.1 T-Helferzellen	150
3.2.1.2 Neutrophile Granulozyten.....	151
3.2.2 Die Neutrophilen-Endothelzell-Interaktion	151
3.2.2.1 Der Einfluss der E/L-Ratio (Endothelzell/ Leukozyten-Ratio)	160
3.2.2.2 Morphologische Detail-Analyse der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion ..	184
3.2.2.3 Der Einfluss des Neutrophilen-konditionierten Mediums	194
3.2.3 Die T-Helferzell-Endothelzell-Interaktion	217
3.2.4 Die Neutrophilen-Plexusepithel Interaktion.....	225
3.2.5 Die Neutrophilen-Interaktion mit dem Aortenendothel <i>in situ</i>	229
4. Diskussion	231
4.1 BHS-Modelle im Vergleich.....	232
4.2 Das BHS-Entzündungsmodell	234
4.2.1 Der Einfluss von Serum und Glucocorticoiden	234
4.2.2 Die Barrierefunktion.....	237
4.2.3 Die Apoptoserate.....	245
4.2.3.1 Der Einfluss der Kulturbedingung auf die Apoptoserate	246
4.2.3.2 Die Barrierefunktion im Kontext der CHX-induzierten Apoptose	247
4.2.4 TNF-a als Entzündungsinduktor	251
4.2.5 Das BHS-Entzündungsmodell als Modell für Transmigrations studien..	255
4.3 Die Endothelzell-Neutrophilen-Interaktion	258
4.3.1 Der Einfluss der Neutrophilen auf die Barrierefunktion.....	259
4.3.1.1 Die Rolle der E/L-Ratio.....	260
4.3.1.2 Der Zeitverlauf der Barrierefunktionsstörung durch die Neutrophilen....	265
4.3.2 Die <i>tight junction</i> -assoziierten Proteine und die Barrierefunktion	267
4.3.2.1 ZO-1, Occludin und Claudin-5.....	267
4.3.3 Transmigration oder Adhäsion ?	275
4.3.4 Neutrophilen-Proteasen und Cytokine.....	281
4.4 Die Endothelzell-Lymphocyten-Interaktion	288
4.5 Die Transmigration	293
4.5.1 Die Neutrophilen-Transmigration.....	293
4.5.1.1 Transzellulär oder parazellulär?	293
4.5.1.2 Das Neutrophilen-Transmigrationsmodell.....	298
4.5.2 Die CD4 ⁺ -T-Zell-Transmigration	302
4.5.3 Neutrophilen-Transmigration durchs Plexusepithel	303
4.6 Zusammenfassende Wertung und Ausblick.....	305

5. Zusammenfassung	315
6. Literaturverzeichnis.....	316
7. Anhang	339
7.1 Materialien	339
7.1.1 Chemikalien, Substanzen und Antikörper	339
7.1.1.1 Allgemeine Chemikalien	339
7.1.1.2 Kits	341
7.1.1.3 Antikörper.....	342
7.1.1.4 Zellkultur	344
7.1.2 Verbrauchsmaterialien	345
7.1.3 Geräte	346
8. Abbildungsverzeichnis	347

1. Einleitung

1.1 Die Blut-Hirn-Schranke

Die Barriere zwischen dem Blut und dem Gehirn der Wirbeltiere wird durch das Endothel der cerebralen Kapillarendothelzellen gebildet. Diese sogenannte Blut-Hirn-Schranke (BHS) gewährleistet ein konstantes inneres Milieu im komplexen Gehirn der Wirbeltiere. Die Aufrechterhaltung dieses als Homöostase bezeichneten Zustandes ist erforderlich, um die Funktion des Gehirns, insbesondere die neuronale Aktivität, unbeeinflusst von den Konzentrationsschwankungen im Blut zu gewährleisten.

Der molekulare Stoffaustausch wird hauptsächlich durch die BHS-charakteristischen festen Zell-Zell-Kontakte, den sogenannten tight junctions, die die Endothelzellen auf der apikalen Seite gürtelartig umschließen, verhindert. Sie unterbinden den parazellulären Stofftransport für hydrophile Substanzen und sind für die charakteristische Barriereeigenschaft der BHS verantwortlich, die eine extrem niedrige Permeabilität mit einem sehr hohen transendothelialen elektrischen Widerstand (TER) vereint. Das unfenestrierte, lückenlose Endothel und die durchgehende Basalmembran tragen zusätzlich dazu bei, dass ein unkontrollierter Stoffaustausch zwischen Blut und Gehirn weitestgehend beschränkt wird. Zudem wird durch die vergleichsweise geringe Anzahl endozytischer Vesikel der cerebralen Kapillarendothelzellen der transzelluläre Stofftransport minimiert (Staddon & Rubin, 1996).

Die BHS fungiert allerdings nicht als strikte Barriere, die für jegliche Substanzen undurchlässig ist. So können lipophile Moleküle, wie beispielsweise Vitamin A, D, E und K, sowie Koffein, Nikotin und Heroin durch die Plasmamembran der Endothelzellen diffundieren (Oldendorf et al., 1972; Pratt et al., 1992). Auch die lebensnotwendigen Gase wie Sauerstoff und Kohlendioxid passieren die BHS. Zur Versorgung des Gehirns mit dem essentiellen Nährstoff D-Glucose, sind hochspezifische Transporter in hoher Anzahl in der Membran der cerebralen Endothelzellen vorhanden, die auch die notwendigen Aminosäuren ins Gehirn transportieren. Ein sehr wichtiger Transporter, der in relativ hoher Konzentration in den cerebralen Endothelzellen zu finden ist, ist der P-Glycoprotein-Transporter, der Substanzen, wie beispielsweise lipophile Moleküle aus dem Gehirn zurück ins Blut transportiert (Rubin & Staddon, 1999). Auch einige Rezeptor-vermittelte Endozytose-Systeme, die Makromoleküle ins Gehirn transportieren sind in der Plasmamembran der cerebralen Kapillarendothelzellen vertreten. Der bekannteste unter ihnen ist der Transferrin-Rezeptor (Pardridge, 1997).

Die festen Zell-Zell-Kontakte (*tight junctions*)

Die festen Zell-Zell-Kontakte, die sogenannten *tight junctions*, die die Endothelzellen apikal gürtelartig umschließen, bilden die wichtigsten Strukturelemente der BHS (Wolburg et al., 1994). Die *tight junctions* der cerebralen Kapillarendothelzellen sind generell komplexer aufgebaut als diejenigen der Endothelzellen peripherer Gefäße (Nagy et al., 1984). Die interendothelialen *junctions* sind diejenigen Strukturen der BHS, die unter pathologischen Bedingungen modifiziert werden (Rubin & Staddon, 1999), was sie in den Fokus zahlreicher Fragestellungen zur BHS-Barrierefunktion stellt.

In der Transmissionselektronenmikroskopie erscheinen die *tight junctions* deutlich erkennbar als Fusionspunkte (*‘kissing points’*) aneinandergrenzender Plasmamembranen zweier benachbarter Endothelzellen. An den sogenannten *‘kissing points’* ist der interzelluläre Spalt elektronenmikroskopisch nicht mehr zu erkennen. Dagegen weisen die Membranen der in basolateraler Richtung angrenzenden *adherens junctions* und Desmosomen einen Abstand von 15-20 nm auf (Tsukita et al., 2001). In elektronenmikroskopischen *freeze-fracture*-Analysen erscheinen die *tight junctions* als Bündel durchgehender partikulärer Fibrillen, die sog. *tight junction*-Stränge (Staehein, 1973). Die Anzahl dieser Stränge und die Komplexität ihrer Vernetzung ist abhängig vom jeweiligen Zelltyp. Jeder *tight junction*-Strang in der Plasmamembran ist lateral mit einem *tight junction*-Strang der Nachbarzelle assoziiert und bildet auf diese Weise einen gepaarten Strang (Tsukita et al., 2001).

Die *tight junctions* bilden einen dichten interzellulären Verschluss (Schneeberger & Lynch, 1992) und dürfen dennoch keine impermeable Barriere bilden, da ansonsten zahlreiche physiologische Vorgänge nicht funktionieren würden. Die Dichtigkeit der *tight junctions* kann durch die Messung des transendothelialen Widerstands (TER) direkt bestimmt werden. Auch die Strangzahl der *tight junctions* korreliert mit dem TER, wie die Untersuchungen der Endothelzellen verschiedener Gewebe gezeigt haben (Claude & Goodenough, 1973; Claude, 1978).

Zwar lässt sich durch die Bestimmung der Strangzahl der *tight junctions* die Barriere-eigenschaft der Zell-Zell-Kontakte sehr gut beschreiben, allerdings ist über den molekularen Mechanismus, der die Anzahl der Stränge reguliert, bisher noch nichts bekannt (Tsukita et al., 2001). Die Korrelation der Strangzahl mit der Expressionsrate des Claudins (und des Occludins) wird diskutiert (Tsukita et al., 2001). Die Gegenüberstellung des TERs und der *tight junction*-Strang-Morphologie führte zu der von Claude (1978) aufgestellten Korrelation, die besagt, dass eine Steigerung der *tight junction*-Strangzahl mit einem logarithmischen Anstieg des TERs einhergeht. Dieses Beziehungsgefüge ist durch die in den gepaarten *tight junction*-Strängen auftretenden Wasserporen erklärbar, die geschlossen und geöffnet sein können (Reuss, 1992; Cereijido et al., 1989; Claude, 1978). Der Grund der unterschiedlichen Dichtig-

keit der einzelnen *tight junction*-Stränge könnte in der Heterogenität der geöffneten bzw. geschlossenen Wasserporen liegen (Stevenson et al., 1988a).

Zur Beschreibung des *tight junction*-Komplexes wurden bisher zwei Modelle vorgeschlagen: das sog. 'Protein-Modell' beschreibt die *tight junctions* als Einheiten integraler Membranproteine, die innerhalb der Lipid-Doppelschicht linear assoziiert sind. Im 'Lipid-Modell' sind die Lipide als invertierte, zylindrische Micellen angeordnet, die die *tight junction*-Stränge bilden (Kachar & Reese, 1982). Die identifizierten *tight junction*-spezifischen integralen Membranproteine unterstützen eher die Vorstellung des Protein-Modells, obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch spezifische Lipide am Aufbau des *tight junction*-Komplexes beteiligt sind (Wegener & Galla, 1996).

Occludin wurde als erstes Transmembran-Protein der *tight junctions* identifiziert (Ando-Akatsuka et al., 1996). Occludin weist vier Transmembran-Domänen auf und ist vermutlich direkt am Aufbau der *tight junction*-Stränge beteiligt (Saitou et al., 1997). Bisher ist die genaue physiologische Funktion des Occludins allerdings noch nicht bekannt.

Zusätzlich zum Occludin wurden zwei weitere Transmembran-Proteine als integrale Komponenten des *tight junction*-Stranges identifiziert, Claudin-1 und -2 (Furuse et al., 1998). Höchstwahrscheinlich bilden die Claudine das 'Rückgrat' der *tight junctions* (Tsukita et al., 2001). Bis heute wurden 24 weitere Mitglieder der Claudin-Familie identifiziert (Morita et al., 1999b; Tsukita & Furuse, 1999). Das Auftreten der verschiedenen Claudine ist abhängig vom jeweiligen Gewebetyp (Furuse et al., 1998; Morita et al., 1999c). So wurden im Gehirn bisher die Claudine 1 und 5 nachgewiesen. Tsukita et al. (2001) postulierten, dass die Claudine in den *tight junction*-Strängen nicht linear angeordnet, sondern dicht gepackt sind und ihre zytoplasmatischen Carboxy-terminalen Enden auf der Oberfläche eines jeden Stranges erscheinen.

Das zuletzt entdeckte *tight junction*-assoziierte Transmembran-Protein ist das JAM (*junctional adhesion molecule*). Bisher wurden drei verschiedene JAM-Moleküle identifiziert (Aurrand-Lions et al., 2000; Palmeri et al., 2000). Diese zählen zur Immunglobulin-Superfamilie und weisen nur eine Transmembran-Domäne auf. JAM ist vermutlich lateral mit den Claudinen verbunden und sowohl in den Aufbau des *tight junction*-Komplexes als auch in die Monozyten-Diapese involviert (Martin-Padura et al., 1998; Bazzoni et al., 2000; Palmeri et al., 2000).

Neben den Transmembran-Proteinen sind am Aufbau der *tight junctions* die zytosolischen Proteine beteiligt. Hierzu gehört u. a. das Zonula-Occludens-1 (ZO-1)-Protein, das von Stevenson et al. (1988b) identifiziert wurde. (Gumbiner et al., 1991) deckten zudem die Existenz zweier weiterer zytosolischer Proteine (ZO-2 und ZO-3) auf, welche wiederum an das ZO-1-Protein gebunden sind. Itoh et al. (1999b) zeigten, dass

die Proteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3 zudem direkt an die Carboxy-terminalen Enden der Claudine binden. Furuse et al. (1994) und Fanning et al. (1998) konnten nachweisen, dass diese Proteine ebenfalls mit dem Carboxy-terminalen Ende des Occludins verbunden sind. Neben den Proteinen ZO-1, ZO-2 und ZO-3 existieren noch weitere zytosolische Proteine wie z. B. das Cingulin, das 7H6-Protein und das Symplektin. Das Protein Cingulin, das mit den Proteinen JAM, ZO-1, ZO-2 und ZO-3 assoziiert ist und zudem mit dem Aktomyosin-Zytoskelett verbunden ist, vermittelt den Kontakt der *tight junctions* mit dem Zytoskelett (Tsukita et al., 2001). ZO-1 und ZO-2 sind ebenfalls direkt mit dem Aktomyosin-Zytoskelett verbunden und zwar über ihre Carboxy-terminalen Ketten (Itoh et al., 1997; Fanning et al., 1998; Itoh et al., 1999a). Vermutlich dient der makromolekulare Komplex, der die zytoplasmatische Seite der *tight junctions* ausbildet, der interzellulären Signaltransduktion endothelialer und epithelialer Zellen und ist zudem in die zelluläre Proliferation und Polarisierung involviert (Tsukita et al., 2001).

1.2 Immunüberwachung und Entzündungsreaktion

Das Immunsystem hat die Aufgabe, den Organismus vor Infektionen durch Pathogene zu schützen und ihn von entarteten Tumorzellen zu befreien. Diese Aufgabe bewältigt das Immunsystem mit Hilfe der verschiedenen Leukozyten-Zelltypen. So vernichten Makrophagen und Granulozyten eingedrungene Erreger, während Lymphozyten (B-Zellen) Antikörper produzieren, die gegen die Erreger gerichtet sind. T-Lymphozyten (T-Helferzellen) sezernieren entweder Cytokine, welche eine koordinierte Immunreaktion auslösen oder sie wirken als T-Killerzellen, die in virusinfizierten Zellen und Tumorzellen den programmierten Zelltod auslösen (Ebnet, 1999). Die Immunantwort auf einen inflammatorischen Stimulus ist einerseits essentiell für das Überleben des Organismus, andererseits kann sie aber auch zu erheblichen Schädigungen des umgebenden Gewebes führen. Dies geschieht, wenn sie außer Kontrolle gerät oder gegen die körpereigenen Zellen gerichtet ist.

Die Entzündung ist eine Antwort der von Blutgefäßen durchzogenen Gewebe auf Verletzungen oder eingedrungene Pathogene mit dem Ziel, die ursprünglich herrschende Homöostase des Gewebes wieder herzustellen (Muller, 2002). Die Leukozyten, die normalerweise passiv im Blutgefäßsystem zirkulieren, müssen im Falle einer Infektion im Gewebe das Blutgefäß verlassen, um in das betroffene Gewebe einzuwandern. Diese Wanderung der verschiedenen Leukozyten muss sehr genau reguliert sein, da eine unkontrollierte Infiltration zu Autoimmunreaktionen oder chronischen Entzündungen führt. So wandern Monozyten und neutrophile Granulozyten direkt in die mit Krankheitserregern befallenen Gewebe ein. Die Antigen-spezifischen Lymphozyten verlassen die Blutgefäße zunächst nur in den lymphatischen Organen, wo sie nach dem Antigen suchen, für das sie den passenden Rezeptor tragen. Findet der Lymphozyt schließlich sein Antigen, das von einer Antigen-präsentierenden Zelle in den Lymphknoten transportiert wurde, wird er aktiviert und wandert dann in das Gewebe ein, in dem das Antigen von der Antigen-präsentierenden Zelle gefunden worden ist. Die auf diese Weise bei der Immunabwehr gebildeten Gedächtniszellen wandern von nun an immer in das gleiche Gewebe, um bei einer Infektion mit dem gleichen Erreger sofort anwesend zu sein. Die permanente Rezirkulation der Lymphozyten zwischen den Blutgefäßen und den sekundären lymphatischen Organen sowie jene der Gedächtniszellen in ehemals infizierte Gewebe stellen die `Immunüberwachung` des Organismus dar. Sie wird ausschließlich von den Lymphozyten durchgeführt.

Dagegen führt die massive Infiltration von Leukozyten in ein infiziertes Gewebe, die mit einer Freisetzung von Cytokinen und Chemokinen verbunden ist, zu einer `Entzündungsreaktion`, bei der sowohl Antigen-spezifische (Lymphozyten) als auch Antigen-unspezifische Zellen (Neutrophile, Monozyten) beteiligt sind. Die bei einer In-

fektion freigesetzten Entzündungsmediatoren führen zur Aktivierung der Endothelzellen, die als Reaktion auf diesen Stimulus sogenannte Adhäsionsmoleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Diese Oberflächenmoleküle dienen den Leukozyten als Erkennungsstrukturen, die ihnen zeigen, wo sie das Blutgefäß verlassen müssen um zum Infektionsherd zu gelangen. Die massive Infiltration von Leukozyten in Verbindung mit der Freisetzung von Entzündungsmediatoren führt zu einer verstärkten lokalen Durchblutung des betroffenen Gewebes und zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität, was die charakteristischen Symptome einer Entzündung (*tumor, rubor, calor* und *dolor*) verursacht (Ebnet, 1999).

1.2.1 Die Immunüberwachung des Zentralen Nervensystems

Vertebraten besitzen zwei körpereigene Systeme, die sowohl die Fähigkeit des Lernens als auch des Erinnerns besitzen: das Zentrale Nervensystem (ZNS) und das Immunsystem. Das Überleben eines Organismus ist abhängig vom Funktionieren beider genannter Systeme, die eng miteinander in Verbindung stehen. In diesem Kontext besteht die Funktion des Immunsystems darin, das ZNS vor Pathogenen und Neoplasmen zu schützen. Um diese Aufgabe zu bewerkstelligen, müssen die molekularen und zellulären Bestandteile des Immunsystems 'lernen', welche Elemente für das ZNS als gefährlich einzustufen sind, wie sie auf diese Elemente antworten müssen, wie sie sich Zutritt in das ZNS verschaffen (d. h. die Blut-Hirn-Schranke (BHS) überwinden) und wie sie schließlich die eingedrungenen Pathogene bekämpfen.

In den letzten Jahren ist die Beteiligung der BHS an der Immunüberwachung des ZNS und deren Veränderung unter pathologischen Bedingungen stark in den Fokus der Untersuchungen gerückt (Andjelkovic and Pachter, 1998; Hickey, 1999; Miller, 1999; Abbott, 2000).

Tight junctions, die feste Zell-Zell-Kontakte zwischen den benachbarten Endothelzellen bilden, verhindern einen ungehinderten molekularen und zellulären Austausch zwischen dem Blutkreislauf und dem Parenchym des ZNS. Allerdings schottet die BHS das Gehirn nicht vollständig vom Immunsystem ab. So exprimieren die cerebralen Kapillarendothelzellen unter normalen Bedingungen die zum Leukozyten-Eintritt in das ZNS notwendigen Adhäsionsmoleküle auf geringem Niveau (Bart et al., 2000). Trotz der effizienten endothelialen Barriere gelingt es somit den Lymphozyten in das ZNS zu gelangen, indem sie die minimal ausgeprägten Adhäsionsmoleküle der Endothelzell-Oberfläche nutzen. Auch Immunglobuline und andere Serumproteine können in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht zu einem geringen Anteil die BHS überqueren (Bart et al., 2000). So sind IgG's in der ZNS-Flüssigkeit und in der ZSF

(Zerebrospinalflüssigkeit) vertreten. Immunglobuline der Klassen IgA und IgM dagegen kommen in so geringer Konzentration vor, dass sie kaum nachweisbar sind.

Aus anatomischer Sicht gibt es im ZNS keine lymphatischen Organe. Dennoch erfolgt im Gehirn eine Lymph-Drainage der durch das Gehirn und die Virchow-Robins-Räume strömenden ZSF und ZNS-Flüssigkeit. Dazu strömen die Flüssigkeiten durch eine zu den Lymphgefäßen zählende Region unterhalb der cibriformen Platte und entlang der cranialen und spinalen Nervenwurzeln (Kida et al., 1995). Die Immunüberwachung des Gehirns, bei der die cervikalen Lymphknoten involviert sind, zeigt sich darin, dass durch zahlreiche Antigene, die aus dem Gehirn stammen, T_H2 und B-Lymphozyten aktiviert werden (Harling-Berg et al., 1999).

Trotz der Anwesenheit der BHS, die im aktivierten Zustand die Passage von Lymphozyten in das ZNS vermittelt, scheint das Gehirn selbst insofern aktiv an seiner Immunüberwachung Teil zu haben, als die aktivierten Parenchymzellen der Entzündung entgegenwirken und somit eine Immunüberwachung ohne die Auslösung inflammatorischer Prozesse im Gehirn ermöglichen. Besondere Bedeutung kommt dabei dem TGF- β (*transforming growth factor*- β) zu. TGF- β ist in relativ hoher Konzentration in der ZSF vertreten und wird im ZNS konstitutiv gebildet (Johnson et al., 1992). In der Konzentration, in der TGF- β normalerweise in der ZSF auftritt, ist es in der Lage, die Proliferation der im ZNS befindlichen T-Lymphozyten zu unterbinden (Taylor & Streilein, 1996) und die Produktion und Ausschüttung von Chemo- und Cytokinen durch Astrozyten zu hemmen (Weiss & Berman, 1998). *In vitro*-Studien von Fabry et al. (1995) und Kollegen zeigten, dass TGF- β die zur Leukozyten-Transmigration notwendige Expression der Adhäsionsmoleküle auf der Endothelzelloberfläche reduzierte, so dass die Immunzell-Extravasation ins ZNS deutlich vermindert wurde. TGF- β minimiert somit die Immunüberwachung durch die Lymphozyten des gesunden ZNS.

Die Ausschüttung von TNF- α (*tumor necrosis factor*- α) dagegen scheint die Immunüberwachung im Gehirn zu steigern (Hickey, 2001). TNF- α , ein pro-inflammatorisches Cytokin, findet sich normalerweise nicht im gesunden ZNS. TNF- α steigert die Permeabilität der cerebralen Kapillarendothelzellen *in vitro* drastisch und erhöht die Adhäsion sowie die transendotheliale Migration der Leukozyten (Fabry et al., 1995; Mark & Miller, 1999). *In vivo*-Studien zeigten, dass TNF- α zudem die Passage von Molekülen aus dem Gehirn und der ZSF in die Blutbahn vermittelt (Dickstein et al., 2000). Dies trägt insofern zur Immunüberwachung des ZNS bei, als sowohl wichtig ist, welche Antigene die Leukozyten im ZNS zur Erhaltung der Immunüberwachung des Gehirns vorfinden als auch die Frage, welche gelösten und Zell-gebundenen Moleküle aus dem ZNS in die Blutbahn gelangen (Hickey, 2001). So zeigten Cserr et al. (1992) und Cserr & Knopf (1997), dass Antigene, die aus dem Gehirn-Parenchym stammten, in großer Menge die Organe des Immunsystems zur Aufrechterhaltung

der Immunüberwachung des ZNS durchströmten. Die besondere Funktion der proinflammatorischen Cytokine zeigten Hickey et al. (1992), die TNF- α und IFN- γ in die Blutbahn von Ratten injizierten und eine Aktivierung der Zellen auf abluminaler Seite der intakten BHS nachwiesen. Auch die Applikation von LPS (*Lipopolysaccharid*) bewirkte eine derartige Aktivierung (Elmqvist et al., 1997). Durch das Auftreten aktivierender Cytokine im Blutstrom kommt es im Gehirn zur gesteigerten Expression von MHC (*Major Histocompatibility Complex*)-Molekülen und zur Synthese von Eicosinoiden (Elmqvist et al., 1997). Da die BHS den Durchtritt von Molekülen der Größe von Cytokinen und LPS ausschließt, ist die Aktivierung der Gehirnzellen bisher nicht erklärbar (Hickey, 2001).

T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten nehmen in der Immunüberwachung des gesunden ZNS eine zentrale Rolle ein, indem sie nach Überwindung der BHS im ZNS nach ihrem spezifischen Antigen suchen. Generell unterscheidet sich die Immunüberwachung des ZNS von derjenigen anderer Organe zum einen durch einen wesentlich geringfügigeren Einstrom der T-Lymphozyten ins Gehirn und zum anderen dadurch, dass der Leukozyten-Einstrom in den verschiedenen Regionen des ZNS nicht einheitlich ist. So wandern T-Lymphozyten vermehrt in das Rückenmark ein, wogegen sie ins Cerebrum in wesentlich geringerer Zahl eindringen (Yeager et al., 2000).

Im gesunden Organismus ist ihre Anzahl im Gehirn sehr gering (Hickey, 1999) wogegen ihre Anzahl im ZNS während einer peripheren Entzündung ansteigt, auch wenn das Gehirn selbst nicht von der Entzündung betroffen ist (Hickey & Kimura, 1987). Nur aktivierte T-Zellen dringen in das ZNS ein. Dabei ist ausschlaggebend, dass die Aktivierung erst kurz vor der Einwanderung in das ZNS erfolgte (Fritz et al., 2000).

Die aktivierten T-Lymphozyten, die in das ZNS gelangen, sind auf der Suche nach ihrem Antigen. Da auf diesen T-Lymphozyten bisher keine `homing`-Rezeptoren nachgewiesen werden konnten, ist allerdings fraglich, inwieweit sie ZNS-spezifisch sind. Die aktivierten T-Lymphozyten scheinen vielmehr nach dem Zufallsprinzip in das gesunde ZNS einzuwandern (Carrithers et al., 2000; Yeager et al., 2000) und sich dort anzureichern, um im Falle einer entstehenden Entzündungsreaktion in hoher Anzahl vertreten zu sein (Qing et al., 2000). Welche der Adhäsions-Moleküle, die auf der Zelloberfläche des nicht aktivierten cerebralen Kapillarendothels exprimiert werden, von den Lymphozyten während der Diapedese ins gesunde Gehirnparenchym genutzt werden, ist allerdings noch nicht aufgeklärt. Bisher wurde ausschließlich das Mitwirken des P-Selektins bei der T-Lymphozyten-Rekrutierung ins gesunde ZNS nachgewiesen (Hickey, 2001). Auch die Transmigrationsroute der Im-

munzellen in das gesunde ZNS, ob parazellulär oder transzellulär, ist nicht bekannt (Perry et al., 1997).

Die Einwanderung der T-Zellen in das intakte ZNS birgt generell einige Widersprüche, die bisher noch nicht aufgeklärt werden konnten. So stellt das gesunde Parenchym für die eingewanderten T-Zellen eine Umgebung dar, in der es durch einen apoptotischen Mechanismus relativ schnell zur Eliminierung der Lymphozyten kommt (Bauer et al., 1998). Dadurch bleibt unklar, ob die ins gesunde Gehirn eingewanderten T-Lymphozyten das ZNS je wieder verlassen (Hickey, 2001). Der Tod der T-Zellen kann weder mit der Antigen-Erkennung korreliert werden, noch betrifft er ausschließlich ZNS-spezifische Lymphozyten. Vielmehr wird er mit Fas/Fas-vermittelten Mechanismen in Verbindung gebracht (Flugel et al., 2000; Suvannavejh et al., 2000). Ein weiteres erstaunliches Phänomen der ins ZNS einwandernden T-Zellen ist ihre Fähigkeit, ungeachtet der feindlichen Umgebung den Reparaturmechanismus des Nervensystems zu fördern (Hohlfeld et al., 2000; Schwartz and Cohen, 2000). So produzieren aktivierte T-Lymphozyten, die ins ZNS vorgedrungen sind, neurotrophe Faktoren. Diese Fähigkeit der T-Zellen lässt vermuten, dass die Lymphozyten nicht nur die Aufgabe der Immunüberwachung des gesunden ZNS übernehmen, sondern auch für die Aufrechterhaltung einer gesunden Physiologie des Nervensystems mitverantwortlich sind (Hickey, 2001).

B-Lymphozyten

Die Funktion der B-Lymphozyten bei der Immunüberwachung des ZNS ist noch nicht genau bekannt. Sicher ist, dass sie unter entzündlichen Bedingungen die Blutbahn verlassen um über das aktivierte cerebrale Kapillarendothel in das Gehirn einzudringen. Unter pathologischen Bedingungen sezernieren sie ihre Antikörper direkt in die extrazelluläre Flüssigkeit des ZNS. Knopf et al. (1998) zeigten, dass die B-Zellen wie auch die T-Zellen auf der Suche nach ihrem Antigen in das ZNS eindringen und dort, nachdem sie ihr Antigen gefunden haben, oligoklonale IgG-Ketten produzieren. Dennoch ist ungeklärt, ob peripher aktivierte B-Lymphozyten im Rahmen der Immunüberwachung des gesunden ZNS eine Rolle spielen, indem sie ihr Antigen suchen (Hickey, 2001).

Monozyten

Auch Monozyten sind in die Immunüberwachung des gesunden ZNS involviert, wengleich ihre genaue Funktion dabei noch nicht bekannt ist. Aloisi et al. (2000) zeigten, dass Monozyten im ZNS die T-Zell-Immunantwort steuern. Eventuell wird

sogar die Fähigkeit der T-Zellen ins Parenchym einzuwandern von den Monozyten reguliert (Hickey, 2001).

1.2.2 Die Blut-Hirn-Schranke im Kontext der entzündlichen Reaktion

Im gesunden Zustand wird der Einstrom von Neutrophilen in das Gehirn-Parenchym ausgeschlossen (Perry et al., 1995). Die Schädigung der BHS, die mit einer Akkumulation von Neutrophilen im ZNS einhergeht, wird mit bestimmten Krankheitsbildern wie der cerebralen Ischämie, dem Trauma und der bakteriellen Enzephalitis in Verbindung gebracht (Tuomanen, 1994). Untersuchungen von Andersson et al. (1991) zeigten allerdings, dass akute Entzündungsreaktionen nicht zwingend den Einstrom von Leukozyten ins ZNS verursachen. Die Autoren zeigten, dass eine neuronale Degeneration, verursacht durch eine exzitotoxische Verletzung, nicht zu einer Rekrutierung von Leukozyten ins ZNS führte.

Bei der Auslösung entzündlicher Reaktionen im ZNS sind pro-inflammatorische Cytokine wie IL-1 β (Interleukin-1 β) und TNF- α involviert. Die nach der IL-1 β -Injektion ins ZNS nachgewiesene Permeabilitätserhöhung der BHS wird allerdings ausschließlich durch die Endothelzell-Neutrophilen-Interaktion bewirkt und nicht direkt durch das Cytokin (Anthony et al., 1997). Dabei ist der Effekt der pro-inflammatorischen Cytokine und der von LPS abhängig vom Alter des Organismus. So zeigten Perry et al. (1995), dass die Injektion von LPS in das ZNS-Parenchym einer eine Woche alten Maus eine entzündliche Reaktion auslöste, während dies im adulten Tier nicht der Fall war. Die gleiche Beobachtung machten Anthony et al. (1997) mit IL-1 β .

Die Frage, durch welchen Stimulus die Neutrophilen dazu veranlasst werden unter entzündlichen Bedingungen in das ZNS einzudringen, zeigten (Bell et al., 1996). Die Autoren konnten nachweisen, dass durch die Injektion eines C-X-C-Chemokins in das ZNS-Parenchym der Maus ein drastischer Neutrophilen-Einstrom erfolgte. Die Chemokine der C-X-C-Familie üben im Allgemeinen eine chemotaktische Wirkung auf Neutrophile aus (Miller & Krangel, 1992).

Im Unterschied zu den akuten Entzündungsreaktionen, bei denen vor allem Neutrophile in das ZNS einströmen, dringen bei chronischen ZNS-Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose (MS) hauptsächlich T-Zellen und Makrophagen in das Gehirn ein (Perry et al., 1997). Die MS wird mit einem Immunangriff gegen die körpereigenen Myelin-Proteine in Verbindung gebracht. Durch die Interaktion des T-Zell-Rezeptors der CD4⁺-Lymphozyten mit dessen Antigen, das durch das HLA (*human leucozyte antigen*) der Klasse II von Makrophagen, Mikroglia und/oder Astrozyten präsentiert wird, kommt es letztlich zur Zerstörung des Myelins. Die Interaktion der T-Zellen mit den Myelin-Antigenen führt zur Aktivierung der T-Helferzellen und zur Auslösung einer Entzündungskaskade, die eine Lymphozyten-Proliferation, eine B-Zell- und eine

Makrophagen-Aktivierung einschließt. Der Abbau des Myelins hat schließlich die charakteristischen neurologischen Schäden zur Folge (Sorensen & Ransohoff, 1998). Unklar bleibt, ob die Integrität der BHS erst durch die Invasion der Leukozyten geschädigt wird, oder ob ihre erhöhte Durchlässigkeit anderen molekularen Wirkmechanismen zugrunde liegt, sie also schon vorher permeabel war (Perry et al., 1997). Auch die Untersuchungen im EAE (*experimental allergic encephalomyelitis*)-Tiermodell der MS (Daniel et al., 1983) konnten nicht klären, durch welche molekularen Mechanismen die Permeabilität der BHS während der T-Zell- und Makrophagen-Rekrutierung gesteigert wird. Dagegen zeigten Kalara & Hedera (1995), dass das Endothel der BHS bei Patienten mit Alzheimerscher Erkrankung per se nicht normal ausgebildet ist und Endothelzellen zum Teil sogar fehlten (Perry et al., 1997). Neurodegenerative Erkrankungen wie beispielsweise die Alzheimersche, der Morbus Parkinson und durch Prionen verursachte ZNS-Erkrankungen besitzen wie die MS eine inflammatorische Komponente (Perry et al., 1995). Das beweisen die im Gehirn gestorbener Alzheimer-Patienten nachgewiesene aktivierte Mikroglia und Bestandteile der Komplement-Kaskade (McGeer & McGeer, 1996).

Für die Prionen-vermittelte Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, die zunächst nicht mit einer entzündlichen Reaktion in Verbindung gebracht werden konnte (Perry et al., 1997), zeigten Williams et al. (1995) und Betmouni et al. (1996), dass in der primären Phase dieser Erkrankung ein Influx von T-Zellen und Makrophagen in das Gehirn über eine intakte BHS erfolgt.

1.3 Die Endothelzell-Leukozyten-Interaktion

Sowohl bei der Immunüberwachung als auch bei der Entzündungsreaktion müssen die Leukozyten mit den Endothelzellen der Blutgefäße in Wechselwirkung treten, um in das umgebende Gewebe einwandern zu können. Die Endothelzellen bilden also einerseits eine zelluläre Barriere für die Leukozyten, andererseits informieren sie die Immunzellen anhand ihrer Oberflächen-Adhäsionsmoleküle darüber, wo sie das Blutgefäß verlassen müssen, um an den Ort der Infektion zu gelangen. So werden über eine Kaskade von molekularen Interaktionen verschiedene Leukozyten gezielt in diejenigen Kompartimente geleitet, in denen sie benötigt werden (Ebnet, 1999). Das Auswandern der Leukozyten aus dem Blutstrom in das betroffene Gewebe muss allerdings genau reguliert sein, so dass nur diejenigen Leukozyten das Gewebe infiltrieren, die dort benötigt werden. Anderenfalls kommt es zu einer unkontrollierten Einwanderung von Immunzellen, wie z. B. bei Autoimmunerkrankungen oder chronischen Entzündungen. Über eine Kaskade von Zell-Zell-Interaktionen, vermittelt durch Zelladhäsionsmoleküle, werden die richtigen Leukozyten am richtigen Ort festgehalten und dazu veranlasst in das Gewebe auszuwandern.

Sowohl bei der Immunüberwachung, die von Lymphozyten übernommen wird, als auch bei Entzündungsreaktionen, bei der aktivierte Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten involviert sind, verläuft die Endothelzell-Leukozyten-Interaktion in Form der sogenannten `Adhäsionskaskade`. Diese führt letztlich zur Extravasation der Immunzellen und stellt einen mehrstufigen Prozess dar (Springer, 1995; Butcher & Picker, 1996).

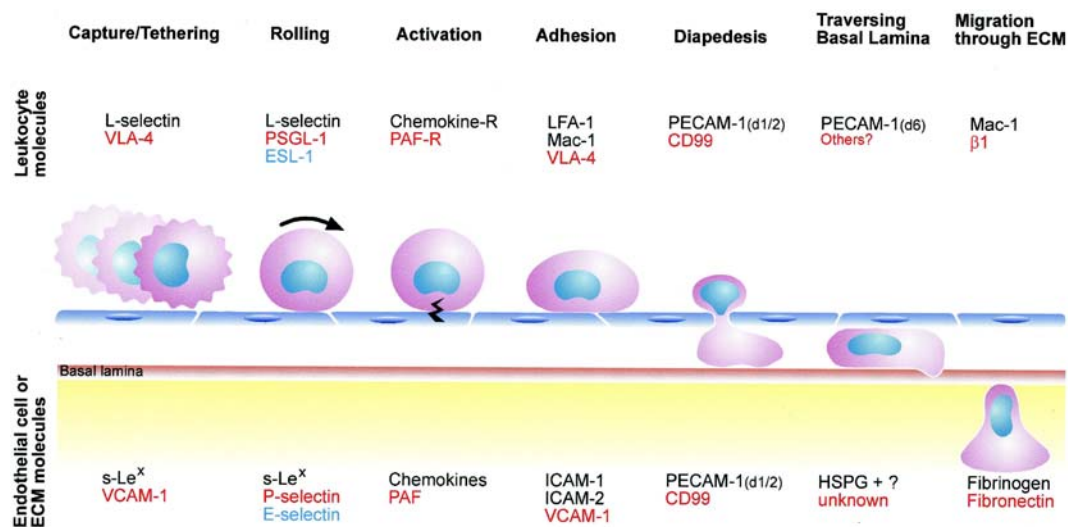
Die Adhäsionskaskade gewährleistet somit nicht nur das Einwandern der Leukozyten in das jeweilige Gewebe, sondern durch sie wird zudem die Infiltration mit verschiedenen Leukozytentypen reguliert. Das `Kaskadenprinzip` besagt, dass mehrere Schritte für ein erfolgreiches Auswandern des Leukozyten aus dem Blutgefäß notwendig sind und dass jeder Einzelschritt die Voraussetzung für den nächsten Schritt ist. Das `Kombinationsprinzip` sorgt dafür, dass verschiedene Leukozyten durch bestimmte Kombinationen molekularer Interaktionen an die jeweils `richtigen` Orte geleitet werden (Ebnet, 1999).

Die wichtigsten Abschnitte der Adhäsionskaskade sollen hier im einzelnen beschrieben werden.

1.3.1 Die Adhäsionskaskade

Um zum Entzündungsherd zu gelangen, muss der Leukozyt mit dem Endothel interagieren, da er ansonsten mit dem Blutstrom wieder fortgerissen werden würde. Diese Endothelzell-Leukozyten-Interaktion ist gekennzeichnet durch ein charakteristi-

schies Schema, dem unterschiedliche funktionelle Prozesse zugeordnet werden. Diese umfassen das `initiale Abfangen` der Leukozyten aus dem Blutstrom (`*tethering*`), wodurch das sogenannte `Rollen` eingeleitet wird, die `Aktivierung`, der die `feste Adhäsion` der Leukozyten auf der Endothelzell-Oberfläche folgt und schließlich die `Diapedese`. Diese einzelnen Abfolgeschritte werden in dem Begriff der `Adhäsionskaskade` vereint, die in Abbildung 1.1 zusammenfassend dargestellt ist. Jeder dieser Schritte wird durch charakteristische molekulare Interaktionspartner des Endothels und der Leukozyten vermittelt.



(nach Muller W.A, 2002)

Abb. 1.1:

Darstellung der Adhäsionskaskade und ihrer beteiligten molekularen Interaktionspartner.

Die einzelnen Schritte der Leukozyten-Einwanderung werden durch spezifische Adhäsionsmoleküle reguliert. Für jeden einzelnen Schritt der sogenannten `Adhäsionskaskade` sind die jeweiligen interagierenden Bindungspartner in der gleichen Farbe aufgeführt.

Die geriffelte Struktur des Leukozyten während des sog. `tetherings` symbolisiert die Mikrovilli, die das L-Selektin bzw. das VLA-4 exponieren. Während des `Aktivierungs-Schrittes` (`activation`) kommt es zu einer inside-out-Aktivierung des Leukozyten-Integrins, vermittelt durch das Endothel und die Endothelzell-Oberfläche via G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (s. Blitz). Die Basallamina (in rot dargestellt) ist separiert von der extrazellulären Matrix (ECM) (in gelb) dargestellt, da die Leukozyten-Migration durch die subendotheliale Basallamina höchstwahrscheinlich einen separat gesteuertes Migrations-Ereignis darstellt, das durch distinkte Moleküle vermittelt wird (Liao et al., 1995; Wakelin et al., 1996).

ESL (*E-selectin ligand*), HSPG (*heparan sulfate proteoglycan*), ICAM (*intercellular adhesion molecule*), LFA (*leukocyte function associated antigen*), PAF (*platelet activating factor*), PAF-R (PAF-receptor), PECAM-1 (*platelet/ endothelial cell adhesion molecule-1*), PECAM-1 (d1/2) (Immunglobulin-Domänen 1 und/oder 2 des PECAM-1), PECAM-1 (d6) (Immunglobulin-Domänen 6 des PECAM-1), PSGL (*P-selectin glycoprotein ligand*), s-Le^x (*sialyl-Lewis^x carbohydrate antigen*), VLA (*very late antigen*).

Trotz der grundsätzlichen Einheitlichkeit des Ablaufs der Adhäsionskaskade gibt es Unterschiede bei verschiedenen Organen. So weist jedes untersuchte Gewebe unterschiedlicher Organe sein spezifisches Adhäsionsprofil zur Leukozyten-Diapedese auf. Obwohl bisher relativ wenig über die spezielle Ausprägung des Adhäsionsprofils der cerebralen Kapillarendothelzellen bekannt ist, lässt sich dennoch ein Großteil der

bisher gewonnen Erkenntnisse der Adhäsionskaskade unter entzündlichen Bedingungen auf das ZNS übertragen (Kubes & Ward, 2000).

Im folgenden soll im Detail auf die einzelnen Schritte der Adhäsionskaskade mit besonderer Berücksichtigung der Endothelzell-Leukozyten-Interaktion im Gehirn eingegangen werden.

Initialer Kontakt (`tethering`) und `Rollen`

Während der initialen Phase einer entzündlichen Reaktion kommt es durch die entzündungsvermittelt erhöhte Permeabilität des Gefäßes an der betroffenen Stelle zu einer Verlangsamung des Blutstroms. Dies ist die Grundvoraussetzung für eine primäre funktionelle Interaktion der Leukozyten mit den Endothelzellen und damit für den ersten Schritt der Adhäsionskaskade, das sogenannte `tethering` (Muller, 2002). Das `tethering`, das den ersten Kontakt der Leukozyten mit den Endothelzellen darstellt, leitet den nächsten Schritt, das sogenannte `Rollen` der Leukozyten auf der Endothelzell-Oberfläche ein.

Sowohl das `tethering` als auch das `Rollen` wird durch Selektine vermittelt (Wakelin et al., 1996). Und ist zur Veranschaulichung in Abb. 1.2 dargestellt.

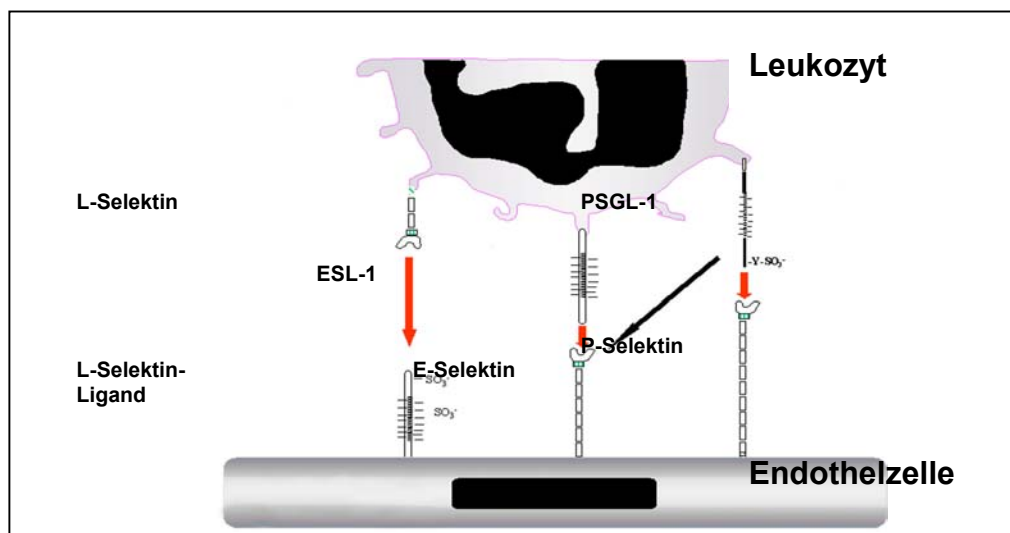


Abb.1.2:

Darstellung der Interaktionspartner des Leukozyten mit dem Endothel während des sog. `Rollens`.

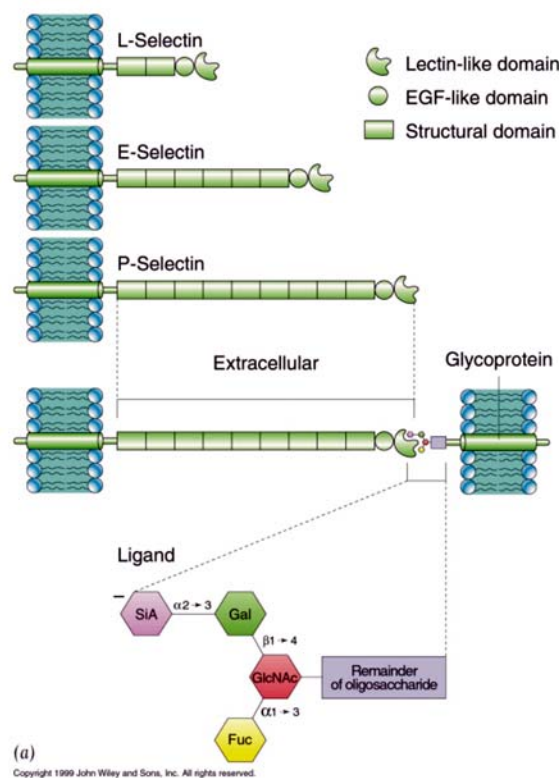
ESL-1 (*E-selectin ligand*), E-Selektin (*endothelial selectin*), PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand*), P-Selektin (*platelet-selectin*).

Die verschiedenen Selektine weisen einen ähnlichen molekularen Aufbau auf: Sie besitzen alle eine Amino-terminale Lektin-Domäne, die primär für die adhäsive Aktivität verantwortlich ist. Diese wird gefolgt von einem EGF (*epidermal growth factor*)-

Motiv, an das sich eine variable Zahl repetetiver, regulatorischer Komplement-Domänen anschließt.

Bisher sind drei Selektine bekannt: das L-Selektin, das konstitutiv auf nahezu allen Leukozyten-Typen exprimiert wird, das E-Selektin (Endothelzell-Selektin) und das P-Selektin (platelet-Selektin) (Ebnet, 1999). Sowohl das E- als auch das P-Selektin werden nur dann auf der Endothelzell-Oberfläche exponiert, wenn die Endothelzellen durch entzündungsfördernde Substanzen wie Cytokine, bakterielles Lipopolysaccharid, Histamin oder Thrombin aktiviert worden sind.

Der strukturelle Hauptunterschied zwischen den drei genannten Selektinen besteht in der Anzahl der repetetiven und regulatorischen Domänen. So besitzen das L-Selektin zwei, das E-Selektin sechs und das P-Selektin neun solcher Domänen. Die Selektine sind durch eine Transmembran-Domäne, an die sich eine zytoplasmatische Kette anschließt, in der Membran verankert (Muller, 2002). In Abbildung 1.3 sind die drei Selektine vergleichend dargestellt.



(aus John Wiley and Sons, 1999)

Abb. 1.3:

Darstellung des strukturellen Aufbaus der drei Selektine (L-, E- und P-Selektin), sowie ihrer Rezeptor-Bindung

Die Bindungspartner der Selektine sind alle stark glykosyliert, d.h. ihre Seitenketten sind mit Zuckerseitenketten versehen. Diese Zucker sind Tetrasaccharide und werden als Sialyl-Lewis^x und Sialyl-Lewis^a bezeichnet. Die Zuckerreste müssen zudem modifiziert werden, um mit den entsprechenden Selektinen überhaupt eine Bindung eingehen zu können. Dabei sind drei Modifikationen der Selektinliganden von Bedeutung: die Fukosylierung, die Sialylierung und die Sulfatierung (Ebnet, 1999). Für eine optimale P-Selektin-Bindung müssen beispielsweise die Tyrosin-Reste des Proteins, welches das Sialyl-Lewis^x trägt, sulfatiert werden (Pouyani & Seed, 1995; Sako et al., 1995; Vestweber & Blanks, 1999). Erst durch die Modifikation des Zuckers wird das Molekül also zum Selektin-Liganden.

Entsprechend der zeitlich unterschiedlichen Regulation des P- und des E-Selektins, stellt das P-Selektin den Interaktionspartner für den initialen Kontakt des Leukozyten auf der Endothelzell-Oberfläche dar und vermittelt das sich anschließende `schnelle Rollen` der Immunzellen auf den Endothelzellen (Kubes & Ward, 2000). Das E-Selektin dagegen vermittelt das `langsame Rollen`.

Das P-Selektin wird konstitutiv in zytoplasmatischen Vesikeln, den Weibel-Palade-*bodies* und in α -Granula der Blutplättchen gespeichert. Der entsprechende Ligand des P-Selektins ist das PSGL-1 (P-Selektin Glykoprotein Ligand-1), der ebenfalls an das E-Selektin bindet. PSGL-1 wird konstitutiv auf der Zelloberfläche von neutrophilen Granulozyten und T-Zellen exprimiert.

Durch einen gegebenen Reiz, wie z. B. durch Thrombin oder Histamin, wird das P-Selektin durch die Degranulation seiner Speicher-Kompartimente innerhalb weniger Minuten auf der Endothelzell-Oberfläche exprimiert (Muller et al., 2002). Dementsprechend wird das P-Selektin in Situationen wie z. B. bei Verletzungen induziert, in denen eine schnelle Rekrutierung von Leukozyten erforderlich ist. Während chronischer Entzündungsreaktionen kann das P-Selektin allerdings auch stabil auf der Zelloberfläche exprimiert werden (Yao et al., 1996; Pan et al., 1998). Die Expression des P-Selektins und dessen Mitwirkung bei der Leukozyten-Rekrutierung variiert allerdings in den unterschiedlichen Organen (Kubes & Ward, 2000). Besonders umstritten ist dessen Beteiligung während der Endothelzell-Leukozyten-Interaktion im Gehirn. So konnten Barkalow et al. (1996) P-Selektin nach einem applizierten Histamin-Stimulus auf der Zelloberfläche cerebraler Kapillarendothelzellen der Maus weder *in vitro* noch *in vivo* nachweisen. Auch Engelhardt et al. (1997) zeigten, dass der Durchtritt enzephalitogener T-Zellen und die Rekrutierung weiterer Entzündungszellen in das ZNS-Parenchym in Abwesenheit der Selektine stattfindet.

Das E-Selektin wird im Gegensatz zum P-Selektin nicht gespeichert, stattdessen erfolgt dessen Regulation auf transkriptioneller Ebene. Durch die Applikation von LPS, IL-1 oder TNF- α erfolgt eine *de novo*-Synthese des E-Selektins und es vergehen 2 bis 4 Stunden bis das Protein für ca. 4 bis 8 Stunden auf der Endothelzell-Oberfläche

exponiert wird (Bevilacqua et al., 1987; Abbassi et al., 1993). Im Vergleich zum P-Selektin dauert die Expression des E-Selektins deutlich länger an und ist somit u. a. bei chronischen Entzündungen von Relevanz (Ebnet, 1999). Das ESL-1 (E-Selektin-Ligand-1) ist der Bindungspartner des E-Selektins.

Die Rolle des E-Selektins ist je nach untersuchten Gewebe und auslösenden Stimulus umstritten. So ist es an der Leukozyten-Rekrutierung während der Cytokin-vermittelten Meningitis beteiligt (Tang et al., 1996), nicht aber während der cerebralen bakteriellen Infektion (Munoz et al., 1997) oder der EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*) (Engelhardt et al., 1997). Dies verdeutlicht, dass verschiedene Stimuli im gleichen Gewebe verschiedene Adhäsionsprofile auslösen (Kubes & Ward, 2000).

Ein weiteres Selektin, das allerdings konstitutiv auf der Zelloberfläche der Leukozyten exprimiert wird, ist das L-Selektin. Dieses befindet sich vornehmlich am Ende der Mikrovilli-Ausstülpungen der Leukozyten (Muller, 2002). Das L-Selektin ist unter entzündlichen Bedingungen in die Lymphozyten-Rezirkulation (Gallatin et al., 1983) und die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion involviert (Watson et al., 1991; Tang et al., 1996).

Für das L-Selektin sind drei Liganden bekannt: das GlyCAM-1 (*glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1*), das CD34 und das MAdCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule-1*) (Ebnet, 1999). Die Glykoprotein-Liganden des L-Selektins müssen die entsprechenden Zuckerreste aufweisen, um mit dem L-Selektin interagieren zu können (Muller, 2002). So wird durch einen inflammatorischen Stimulus beispielsweise die Fucosyl-Transferase aktiviert, die die zur L-Selektin-Interaktion notwendigen Zuckerreste an das CD34-Protein anhängt (Muller, 2002). Die Rolle des L-Selektins unter entzündlichen Bedingungen ist bis heute kaum untersucht (Kubes & Ward, 2000).

Abstoppen der Leukozyten und feste Adhäsion

Zahlreiche Immunzellen, die *in vivo* auf der Endothelzell-Oberfläche rollen, lösen sich wieder vom Endothel und werden mit dem Blutstrom fortgerissen (Muller, 2002). Die Prozesse des `tethering` und des `Rollens` der Leukozyten sind somit reversibel. Um das sogenannte `Rollen` zu beenden, muss die Affinität der Leukozyten zu den Endothelzellen ansteigen. Dazu müssen vom Endothel entweder intrinsische Moleküle auf der Zelloberfläche exponiert (Muller, 1999) oder aber Chemokine ausgeschüttet werden, die vom Entzündungsherd ausgehend an die Glykosaminoglykane der Endothelzell-Oberfläche binden und somit den Leukozyten präsentiert werden (Tanaka et al., 1993). Chemokine gehören zu den Heparin-bindenden `chemotaktischen

Cytokinen` und werden je nach Lokalisation ihrer intramolekularen Disulfidbrücke in 4 verschiedene Familien unterteilt.

Chemokine sind funktionell durch ihre chemotaktische Wirkung ausgezeichnet. Diese Funktion dient dazu, die Leukozyten, die bereits aus den Gefäßen ausgewandert sind, zum Entzündungsherd zu dirigieren (Ebnet, 1999). Sind die Leukozyten im Rahmen der Adhäsionskaskade auf der Endothelzell-Oberfläche bereits abgestoppt und fest adhärirt, ist diese Funktion der Chemokine allerdings zweitrangig. Während der festen Adhäsion haben die Chemokine die Aufgabe, an die Chemokin-Rezeptoren auf der Leukozyten-Oberfläche zu binden und diese zu aktivieren. Ohne diese Aktivierung würden sich die Leukozyten wieder von der Endothelzell-Oberfläche lösen und in den Blutkreislauf zurückkehren. Der Grund für die Verwendung von Chemokinen liegt also nicht vornehmlich in ihrer chemotaktischen Aktivität, sondern in der Art der Chemokin-Rezeptoren, die auf der Oberfläche des Leukozyten exprimiert werden. Es handelt sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, deren besondere Eigenschaft die Schnelligkeit ihrer Signalübertragung ist.

Die Chemokine binden an die Leukozyten via eines spezifischen heptahelikalen, Pertussistoxin-sensitiven und G-Protein-gekoppelten Rezeptors (Muller, 2002). Über das G-Protein wird die Information, dass ein Chemokin an den Rezeptor gebunden hat, über ein *second messenger*-Molekül ins Zellinnere des Leukozyten weitergeleitet. Der Reiz bewirkt eine Konformationsänderung des Integrins (z. B. das $\alpha_M\beta_2$ -Integrins, s. Abb. 1.4) auf der Leukozyten-Zelloberfläche, was das Protein von einem zuvor niedrig-affinen in einen hoch-affinen Zustand versetzt. Die Integrine sind heterodimere Rezeptoren, die jeweils eine α - und eine β -Kette besitzen. Durch diese schnelle Überführung des Moleküls in seinen hoch-affinen Zustand kann es innerhalb von Sekunden fest an seinen Liganden, z. B. ICAM-1 (s. Abb. 1.4) auf der Endothelzell-Oberfläche binden und der Leukozyt wird somit nicht mehr mit dem Blutstrom fortgetragen. In der Abbildung 1. 4 ist die molekulare Wechselwirkung der Integrine des Leukozyten mit ihren Rezeptoren, den Immunglobulinen auf der Endothelzell-Oberfläche während der Phase der festen Adhäsion dargestellt.

Charakteristisch für die Leukozyten sind die spezifischen β_2 -Integrine (auch bekannt als CD18). Die vier bekannten α -Ketten, die eine Bindung mit der β_2 -Kette eingehen, α_L (CD11a) und α_M (CD18b), spielen für die Leukozyten-Endothelzell-Bindung eine wichtige Rolle. Die Integrine, die eine $\alpha_L\beta_2$ -Kette (LFA-1; *leucocyte function antigen-1*) bzw. eine $\alpha_M\beta_2$ -Kette (Mac-1) bilden, werden von den verschiedenen Leukozyten-Typen unterschiedlich stark exprimiert. Ein weiteres Integrin, dass von zahlreichen Leukozyten exprimiert wird, ist das $\alpha_4\beta_1$ -Integrin (VLA-4; *very late antigen-4*) (Muller, 2002). Dieses Integrin spielt besonders bei der Leukozyten-Rekrutierung ins Gehirn eine große Rolle (Kubes & Ward, 2000), insbesondere im EAE-Modell (Meng et al., 1995).

Die Liganden der Integrine sind die zu den Immunglobulinen zählenden Moleküle ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 und MAdCAM-1. Sie unterscheiden sich durch die unterschiedliche Anzahl ihrer Immunglobulin-Domänen voneinander. Diese von den Endothelzellen exprimierten Zelladhäsionsmoleküle werden allerdings trotz ihrer ähnlichen Struktur unterschiedlich reguliert (Ebnet, 1999). So werden ICAM-1 und VCAM-1 in nur sehr geringem Maße von nicht aktivierten Endothelzellen exprimiert. Erst durch entzündungsinduzierende Cytokine kommt es zu einem rasanten Anstieg der Expression dieser Proteine auf der Endothelzell-Oberfläche (Pober et al., 1986). ICAM-2 und MAdCAM-1 werden dagegen konstitutiv von den Endothelzellen exprimiert.

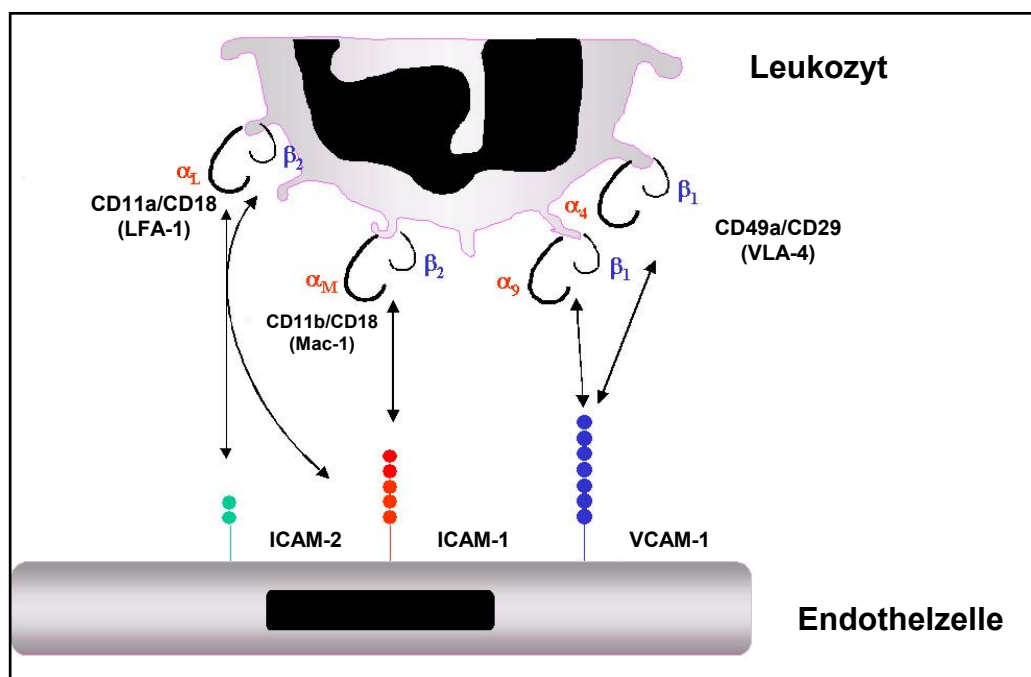


Abb. 1.4:

Die Interaktion der Leukozyten-Integrine mit ihren entsprechenden Rezeptoren auf der Endothelzell-Oberfläche während der festen Adhäsion.

ICAM-1, -2 (*intercellular adhesion molecule-1, -2*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), LFA-1 (*leukocyte function antigen-1*), VLA-4 (*very late antigen-4*).

Der durch die Wechselwirkung der Leukozyten-Integrine mit den entsprechenden Bindungspartnern auf der Endothelzell-Oberfläche vermittelte feste Adhäsion, folgt die Abflachung des Leukozyten, der daraufhin beginnt zu der Stelle zu wandern, an der er die Endothelzellschicht durchqueren wird. Charakteristischerweise nimmt der Leukozyt dem Chemokin-Stimulus folgend eine bipolare Zellform an (Smith et al., 1989), bei der es an der sogenannten `leading edge` zur Ausbildung eines Lamellipodiums und an der `trailing edge` zur Ausformung des sogenannten Uropodiums kommt. Die Zytoskelett-vermittelte Veränderung der Zellform ermöglicht dem Leukozyten sich fortzubewegen (Sanchez-Madrid & del Pozo, 1999). Die Zellformverän-

derung wird ausgelöst, indem das filamentöse F-Aktin, das zuvor im Leukozyten radial verteilt vorlag, verlagert wird. Auf diese Weise wird die Überführung von der sphärischen in eine polarisierte Zellform bewirkt (Coates et al., 1992). Als Konsequenz der F-Aktin-Verlagerung im Leukozyten bilden sich zunächst Membranausstülpungen in Form von Lamellipodien und Filipodien aus (Lauffenburger & Horwitz, 1996). Hat der Leukozyt schließlich die Stelle gefunden, an der er die Endothelzell-Barriere überqueren wird, wird der nächste Schritt der Adhäsionskaskade eingeleitet, die sogenannte Diapedese. Die molekularen Mechanismen, die der Diapedese zugrunde liegen, sind bisher noch nicht bekannt. Im Gehirn ist selbst die Transmigrationsroute unbekannt, d. h. ob die Leukozyten die Endothelzellschicht parazellulär (zwischen benachbarten Endothelzellen) oder transzellulär (durch die Endothelzelle hindurch) überwinden (Perry et al., 1997).

Da in der vorliegenden Arbeit die Analyse der Leukozyten-Diapedese im Fokus der Untersuchungen stand, werden die aktuellsten Erkenntnisse zur Transmigration sowohl am Endothel peripherer Gefäße als auch am Zelltyp cerebraler Kapillarendothelzellen im Folgenden in einem gesonderten Kapitel aufgeführt.

1.3.2 Die Leukozyten-Diapedese

Häufig wird der Begriff der `Transmigration` als Beschreibung der gesamten Adhäsionskaskade in der Literatur verwendet, wobei die `Diapedese` den eigentlichen Leukozyten-Durchtritt beschreibt. In anderen Fällen wiederum bezeichnet die Transmigration oder transendotheliale Migration den Leukozyten-Durchtritt (Muller, 2001). Die Verwendung des Terminus `Transmigration` wird in der vorliegenden Arbeit synonym zu den Termini `Diapedese` und `Extravasation` verwendet. Die Begriffe bezeichnen den Leukozyten-Durchtritt durch den Endothelzell-Monolayer als strikt abgegrenztes Ereignis der Adhäsionskaskade. Die Verwendung des Ausdrucks `Leukozyten-Endothelzell-Interaktion` umfasst dagegen alle der zur Adhäsionskaskade gehörigen Interaktions-Schritte.

Die Leukozyten-Diapedese stellt den letzten Schritt in der Adhäsionskaskade dar und ist im Vergleich zu den vorhergehenden Schritten bisher am wenigsten erforscht. Im Gegensatz zu den Schritten der Adhäsionskaskade, die das `Roller` und die Adhäsion umfassen, ist die Leukozyten-Diapedese nicht reversibel, d. h. in dem Moment, in dem ein Leukozyt in dieses Stadium eingetreten ist, kann er sich nicht mehr vom Endothel lösen und in den Blutstrom gelangen (Muller, 2002). Während der Diapedese durchläuft der Leukozyt eine enorme Zellformveränderung, die eine drastische Umbildung seines Zytoskeletts erfordert. Die Diapedese verändert zudem die Physiologie der Immunzellen. So erhalten Neutrophile, die normalerweise nur einige Stunden im Blutstrom zirkulieren und dann von der Milz entfernt werden würden, durch

die entzündungsaktivierten Endothelzellen einen anti-apoptotischen Stimulus, so dass sie am Wirkort ihre Funktion erfüllen können (Coxon et al., 1999). Monozyten, die durch einen Entzündungsstimulus aktiviert wurden, differenzieren sich entweder zu Makrophagen oder zu dendritischen Zellen (Randolph et al., 1998; Randolph et al., 1999), die dann als Effektorzellen bzw. Antigen-präsentierende Zellen agieren können.

Noch heute ist unklar, ob der Leukozyt die Endothelzell-Barriere *parazellulär* (durch die interendotheliale Kontaktzone) oder aber *transzellulär* (durch die Endothelzelle hindurch) überwindet. Diese Fragestellung wird besonders in Bezug auf das barrierebildende cerebrale Kapillarendothel der BHS, das keine Fenestrierungen aufweist, kontrovers diskutiert. Zumeist wird der parazelluläre Transmigrationsweg der Leukozyten favorisiert (Muller, 2001) obwohl die transzelluläre Transmigration von Feng et al. (1998) am unfenestrierten Endothelzelltyp elektronenmikroskopisch nachgewiesen wurde.

Im folgenden Abschnitt sollen die neuesten Erkenntnisse der Leukozyten-Diapedese sowohl am Endothel peripherer Gefäße als auch am Kapillarendothel des Gehirns dargestellt werden. Die meisten Studien wurden am Endothel peripherer Gefäße oder aber im HUVEC (*H*uman *u*mbilical *v*ein *e*ndothelial *c*ell)-Modell durchgeführt. Über den Transmigrations-Mechanismus der Leukozyten im Gehirn ist bisher nur sehr wenig bekannt.

1.3.2.1 Die parazelluläre Transmigration

Während jene Schritte der Adhäsionskaskade, die die initiale Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (*tethering*), das 'Rollen', die Adhäsion und die Fortbewegung des Leukozyten auf der Endothelzell-Oberfläche umfassen, durch heterophile molekulare Wechselwirkungen vermittelt werden, sind die bisher bekannten Molekül-Interaktionen während der Diapedese homophil. Diese homophilen Molekül-Interaktionen umfassen zum einen die PECAM-1-PECAM-1-Wechselwirkung und zum anderen die CD99-CD99-Interaktion (Muller, 2002). Die aktuellsten Erkenntnisse, die im Folgenden aufgeführt werden sind in Abbildung 1.5 zusammenfassend dargestellt.

PECAM-1

PECAM-1 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*) wird sowohl von verschiedenen Leukozyten und von Thrombozyten als auch von Endothelzellen exprimiert (Newman, 1997). PECAM-1 zählt zu den Membran-Proteinen der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) (Newman et al., 1990) und wird von den Endothelzellen an deren lateraler Seite konzentriert exprimiert (Muller et al., 1989). Es interagiert mit seiner A-

mino-terminalen Domäne homophil mit dem PECAM-1 benachbarter Endothelzellen (Sun et al., 1996a; Sun et al., 1996b), was für die stabile Lokalisation des PECAM-1 an den Endothelzellgrenzen verantwortlich gemacht wird (Albelda et al., 1991). PECAM-1 wird ebenfalls von Leukozyten exprimiert.

Trotz der Unklarheit der molekularen Mechanismen, die der Leukozyten-Transmigration zugrunde liegen, gibt es für PECAM-1 Hinweise, die für dessen Beteiligung am Transmigrationsprozess sprechen. Zum einen ist es möglich, durch den Einsatz blockierender Antikörper gegen PECAM-1 die Diapedese von Leukozyten in das entzündete Gewebe einzuschränken und zum anderen ist PECAM-1 in hoher Konzentration in der Kontaktzone der Endothelzellen lokalisiert, welche von zahlreichen Autoren als Leukozyten-Transmigrationsroute beschrieben wird. Die homophile Interaktion zwischen den Ig-Domänen 1 und 2 des PECAM-1 der Endothelzellen und jener des PECAM-1 der Leukozyten ist für die Diapedese essentiell. Diese homophile PECAM-1-PECAM-1-Wechselwirkung zwischen Endothelzellen und Leukozyten ist in die Transmigration von Monozyten, Neutrophilen und Killerzellen involviert (Muller, 2001). Dies verdeutlichen auch die Studien von Sun et al. (1996a) und Sun et al. (1998). Die Autoren zeigten, dass die Zugabe von Fab-Fragmenten monoklonaler Antikörper gegen PECAM-1 die Leukozyten-Transmigration um bis zu 90% minderte. Auch die Blockierungsstudien von (Liao et al., 1995), die einen Domänen-spezifischen monoklonalen Antikörper gegen PECAM-1 einsetzten, zeigten eine Inhibierung der Transmigration *in vitro* und *in vivo* (Bogen et al., 1994). Die Blockierung des PECAM-1 sowohl der Leukozyten als auch der Endothelzellen hatte dabei jeweils den gleichen Effekt (Muller et al., 1993).

Trotz der nachgewiesenen Involvierung des PECAM-1 bei der Transmigration ist die exakte molekulare Funktionsweise der PECAM-1-PECAM-1-Interaktion noch nicht aufgeklärt. So wird vermutet, dass PECAM-1, das in der interendothelialen Kontaktzone angereichert ist, mit dem PECAM-1 der Leukozyten in Wechselwirkung tritt, während diese die Zell-Zell-Kontaktzone passieren. Die PECAM-1-PECAM-1-Interaktion der Leukozyten mit den Endothelzellen während der Transmigration generiert ein *inside-out*-Signal, das die Integrine der Immunzellen aktiviert. Diese Aktivierung wurde von Tanaka et al. (1993) für das Integrin der β_1 -Familie von T-Zellen nachgewiesen und von Berman & Muller (1995), Berman et al. (1996) und Piali et al. (1993) für das Integrin der β_2 -Familie von Neutrophilen, Monozyten, Killerzellen und T-Zellen. (Tanaka et al., 1993) konnten zeigen, dass das *cross-linking* von PECAM-1 ausreichte, um die LFA-1- bzw. VLA-4-vermittelte Adhäsion mit ICAM-1 bzw. VCAM-1 zu aktivieren. Da auch Chemokine die Leukozyten-Integrine zu aktivieren vermögen, ist allerdings fraglich, ob dazu die PECAM-1-PECAM-1-Wechselwirkung zwischen Leukozyten und Endothelzellen notwendig ist (Muller, 2001). Wenn es während der Diapedese tatsächlich zu einer homophilen PECAM-1-Bindung zwischen den Endothel-

zellen und den Leukozyten käme, stellte sich zudem die Frage, wie sich zuvor die endotheliale PECAM-1-PECAM-1-Bindung voneinander löst, damit das endotheliale PECAM-1 mit dem PECAM-1 des Leukozyten interagieren kann. Die einzige Möglichkeit des Leukozyten, eine homophile Interaktion seines PECAM-1 mit dem endothelialen PECAM-1 einzugehen, wäre die Anreicherung des PECAM-1 in seinem voranschreitenden Pseudopodium, was allerdings bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte (Muller, 2001).

Trotz der nachgewiesenen PECAM-1-vermittelten Beeinflussung des zellulären Aktin-Zytoskeletts, das bekanntermaßen den `Motor` der Transmigration darstellt (Poggi et al., 1996), konnte bisher die direkte Beteiligung des PECAM-1 an der Leukozyten-Diapedese nicht belegt werden (Aurrand-Lions et al., 2002). So zeigten Duncan et al. (1999), dass durch die Applikation von Thioglykolat, IL-1 β und Formalin-inaktivierter *S. aureus* in PECAM-1-defekten *knock-out*-Mäusen die Transmigration von Monozyten und Lymphozyten nicht beeinträchtigt wurde. Bisher konnte in PECAM-1-defekten *knock-out*-Mäusen ausschließlich beobachtet werden, dass es als Antwort auf den entzündungs-induzierenden Stimulus IL-1 β zur Anreicherung polymorphnukleärer Zellen (PMN) in der Basalmembran postkapillärer Venen im Mesenterium der Tiere kam (Duncan et al., 1999). Dementsprechend wird PECAM-1 eher eine Funktion bei der Migration der PMN's durch die Basalmembran zugesprochen (Johnson-Leger et al., 2000).

JAM und VE-Cadherin

Die Beteiligung der junctionalen Adhäsionsmoleküle JAM-1 (*junctional adhesion molecule-1*) und VE-Cadherin der *tight junctions* bzw. der *adherens junctions* während der Transmigration wird diskutiert (Muller, 2001).

JAM, wie auch PECAM-1, gehört zu der Ig-Superfamilie und wurde von Martin-Padura et al. (1998) identifiziert. JAM interagiert homophil und tritt konzentriert in der apikalen Region der Zell-Zell-Kontaktzone im Bereich der *tight junctions* auf (s. Abb. 1.5). Mit der Endothelzelle interagierende Leukozyten, die durch die interendotheliale Kontaktzone transmigrieren, treten auf diese Weise mit JAM in Kontakt (Johnson-Leger et al., 2000). Martin-Padura et al. (1998) zeigten, dass durch den Einsatz eines monoklonalen Antikörpers (BV11) gegen JAM die Infiltration von Monozyten *in vitro* und im Haut-Entzündungsmodell der Maus inhibiert werden konnte. Del Maschio et al. (1999) konnten zudem nachweisen, dass der Einsatz des BV11-Antikörper gegen JAM den Leukozyten-Influx während einer induzierten Meningitis im Maus-Modell inhibierte. Die Lokalisation von JAM in der endothelialen Zell-Zell-Kontaktzone und die Fähigkeit blockierender Anti-JAM-Antikörper die Diapedese zu unterbinden, spre-

chen für eine Beteiligung des Proteins bei der transendothelialen Migration (Muller, 2001).

Interessante Ergebnisse erzielten zudem Ostermann et al. (2002), die in Blockierungsstudien einen polyklonalen Antikörper einsetzten und zeigten, dass LFA-1 von T-Zellen und Neutrophilen heterophil mit der Membran-proximalen Domäne des JAM-1 interagiert. Trotz der erfolgreichen Inhibierungsstudien ist die Funktion des JAM während der Leukozyten-Diapedese noch umstritten.

Die kooperative Interaktion von JAM und PECAM-1 während der Transmigration wird von Johnson-Leger et al. (2000) vorgeschlagen, indem sowohl das PECAM-1 (Ayalon et al., 1994) als auch das JAM den Leukozyten quasi durch die Zell-Zell-Kontaktzone hindurch dirigieren.

Die Beteiligung des VE-Cadherins während der Leukozyten-Transmigration wird kontrovers diskutiert. Blockierungsstudien des VE-Cadherins während einer im Maus-Modell induzierten Peritonitis, verursachte einen erhöhten Neutrophilen-Einstrom (Gotsch et al., 1997), wodurch gezeigt wurde, dass die Integrität der *adherens junctions* eine Barriere der Neutrophilen-Diapedese darstellt. Dagegen zeigten *in vitro*-Studien unter Flussbedingungen von Allport et al. (2000) und Shaw et al. (2001), dass VE-Cadherin während der Leukozyten-Diapedese transient von den *junctions* verschwindet. Das widerspricht der Funktion, die Gotsch et al. (1997) dem VE-Cadherin während der Leukozyten-Diapedese zugesprochen haben.

CD 99

CD 99 ist ein 32-kDa O-glykosyliertes Molekül, dass auf der Oberfläche der meisten Leukozyten exprimiert wird (Muller, 2002). Schenkel et al. (2002) konnten das Molekül an den Zellgrenzen von Endothelzellen nachweisen. CD 99 wurde bisher als Co-Stimulator von T-Zellen beschrieben. Erst jüngst wurde seine Rolle während der transendothelialen Migration von Monozyten von Schenkel et al. (2002) entdeckt. Wie auch PECAM-1, interagiert es während der Transmigration homophil.

Monozyten, deren CD 99-Rezeptor blockiert wurde, blieben in der interendothelialen Zell-Kontaktzone stecken, wobei sich die *leading edge* des Leukozyten schon unterhalb der Endothelzellen befand. Damit unterscheidet sich die Funktion von CD 99 eindeutig von der des PECAM-1, das für den initialen Prozess bei der Diapedese verantwortlich ist (Muller, 2002). Die Funktion von CD 99 wurde bisher nur während der Monozyten-Transmigration untersucht, nicht aber während der Neutrophilen- und Lymphozyten-Diapedese. Auch ist die Rolle von CD 99 in den verschiedenen *in vitro*-Entzündungsmodellen noch nicht bekannt (Muller, 2002).

An der finalen Phase der Leukozyten-Diapedese ist CD 99 direkt beteiligt. Das Molekül wird von allen Leukozyten-Typen und Erythrozyten exprimiert. Schenkel et al. (2002) zeigten, dass auch die Endothelzellen CD 99 konstitutiv in der interendothelialen Kontaktzone exprimieren. Im Gegensatz zu Anti-PECAM-1 verursacht der Einsatz eines Anti-CD 99-Antikörpers die Blockierung des Leukozyten erst, wenn er schon tief in die interendotheliale Zell-Kontaktzone vorgedrungen ist, also kurz vor Abschluss der Diapedese (Aurrand-Lions et al., 2002).

Noch ist allerdings ungeklärt, ob die Blockierung des Uropoden des Leukozyten, in welchem die Adhäsionsproteine besonders konzentriert auftreten, den Grund für den Stillstand der Transmigration darstellt. Auch ist noch nicht bekannt, ob CD 99 speziell in der Region des Leukozyten-Uropoden exprimiert wird. Hahn et al. (1997) konnte allerdings zeigen, dass CD 99 über einen bisher noch unbekanntem Signaltransduktionsweg die LFA-1-Expression und -Affinität reguliert. So ist CD 99 möglicherweise indirekt in die Diapedese involviert, indem es die Integrin-Funktion im Uropoden während der Transmigration reguliert.

Die Rolle von CD 99 während der Leukozyten-Diapedese wurde bisher ausschließlich für die Transmigration von Monozyten untersucht. Inwiefern CD 99 während der Transmigration unterschiedlicher Immunzelltypen, wie der Lymphozyten oder der Neutrophilen und verschiedener Endothelzelltypen ebenfalls eine essentielle Funktion übernimmt, ist in zukünftigen Studien zu überprüfen (Muller, 2002).

PECAM-1/JAM-1/CD 99: der `Multistep-Mechanismus` der Diapedese

Jüngst konnte gezeigt werden, dass nicht ein einzelnes Molekül für die Leukozyten-Diapedese verantwortlich ist, sondern dass vielmehr das Zusammenspiel mehrerer Moleküle für die transendotheliale Migration essentiell ist (s. Abb. 1.5). Diese aktuellen Erkenntnisse über die Zusammenhänge der Beteiligung von JAM-1, CD 99 und PECAM-1 an der Leukozyten-Diapedese erklären vielleicht, warum die Blutgefäße während der Diapedese des Leukozyten nicht permeabel werden (Muller, 2002).

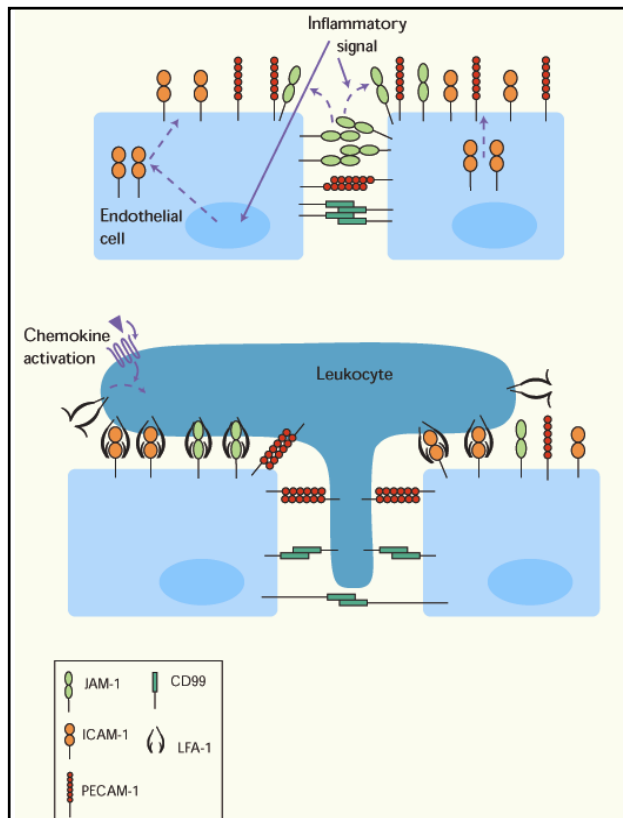
Bisher wurde ausschließlich PECAM-1 direkt mit der Leukozyten-Diapedese in Verbindung gebracht (Aurrand-Lions et al., 2002). Muller (2002) konnten nun allerdings ein weiteres Molekül, das CD 99 identifizieren, das für die Monozyten-Diapedese essentiell ist und in der interendothelialen Kontaktzone exponiert wird. Die Autoren zeigten in Antikörper-Blockierungsstudien, dass transmigrierende Monozyten zunächst homophil mit dem endothelialen PECAM-1 interagierten und luminal fest adhärten um die Diapedese einzuleiten. Die ebenfalls homophile CD 99-Interaktion zwischen den Endothelzellen und den Leukozyten bewirkte darauf folgend, dass der in die interendotheliale Kontaktzone eingedrungene Leukozyt, durch den endothelialen Spalt transmigriert. Dieser Mechanismus ereignet sich höchstwahrscheinlich so-

wohl unter nicht-entzündlichen als auch unter entzündlichen Bedingungen, da weder CD 99 noch PECAM-1 durch einen inflammatorischen Stimulus beeinflusst werden (Aurrand-Lions et al., 2002).

Bisher stützten sich die Erkenntnisse auf die von (Martin-Padura et al., 1998) durchgeführten Studien, die zeigten, dass monoklonale Antikörper gegen JAM-1 die Transmigration von Monozyten *in vivo* inhibieren. Da die Monozyten der Maus JAM-1 nicht exprimieren, wurde von den Autoren postuliert, dass der eingesetzte Anti-JAM-1-Antikörper während der Transmigration entweder die interendothelialen *junctions* umstrukturiert, oder dass zusätzliche JAM-1-Liganden auf dem transmigrierenden Leukozyten existieren.

Ostermann et al. (2002) deckten kürzlich diese Unklarheit auf, indem sie die LFA-1-JAM-1-Bindung identifizierten. Die Autoren zeigten, dass die JAM-1-LFA-1-Interaktion, je nach dem ob JAM-1 auf der Endothelzell-Oberfläche oder in den *junctions* exprimiert wird, entweder in die feste Adhäsion oder in die Transmigration involviert ist. Ostermann et al. (2002) identifizierten JAM-1 als Liganden für das Leukozyten-Integrin LFA-1. Die zur Membran proximale Ig-Domäne des JAM-1 interagiert mit LFA-1, während die von der Membran distale Ig-Domäne des JAM-1-Moleküls für die homophile Dimerisation in den interendothelialen *junctions* verantwortlich ist (Kostrewa et al., 2001). Dieser strukturelle Dualismus ermöglicht die simultane Interaktion zwischen dem Leukozyten und der Endothelzelle (LFA-1-JAM-1) und zwischen benachbarten Endothelzellen (JAM-1-JAM-1). Die LFA-1-JAM-1-Bindung zwischen Leukozyt und der luminalen Endothelzelle verursacht die feste Adhäsion des Leukozyten. Diese feste Bindung wurde bisher nur durch die ICAM-1-LFA-1-Wechselwirkung beschrieben (Imhof & Dunon, 1995). Die von Ostermann et al. (2002) nachgewiesene duale Funktion des LFA-1-Moleküls, das sowohl in die feste Adhäsion als auch in die Transmigration involviert ist, ist zur Aufklärung der transendothelialen Migration essentiell. Unklar ist jedoch, ob die Transmigration durch die PECAM-1-PECAM-1- oder durch die LFA-1-JAM-1-Interaktion eingeleitet wird und ob diese Interaktionen eventuell zeitgleich ablaufen (Aurrand-Lions et al., 2002).

Im Gegensatz zu PECAM-1 oder CD 99 wird JAM-1 ausschließlich im nicht-entzündlichen Zustand der Endothelzellen innerhalb des junctionalen Komplexes exprimiert. Das entzündungsaktivierte Endothel dagegen exponiert JAM-1 apikal auf seiner Zelloberfläche (Ozaki et al., 1999). Das JAM-1-Molekül ist über zytoplasmatische Adapterproteine mit den Claudinen der *tight junctions* assoziiert. Inflammatorische Signale können insofern für die Re-Lokalisation des JAM-1 sorgen, als das sie die Verbindung des Proteins zu seinen Adapterproteinen beeinflussen (Aurrand-Lions et al., 2002). Diese Beobachtung erhärtet die Hypothese, dass die Endothelzellen aktiv die Transmigration steuern, indem sie die Struktur der interzellulären *junctions* regulieren (Aurrand-Lions et al., 2002).



aus: nature immunology, Aurrand-Lions et al. (2002)

Abb. 1.5:

Darstellung der aktuellen Erkenntnisse der molekularen Mechanismen der transendothelialen Leukozyten-Migration (Stand Februar 2002).

A: Ein inflammatorischer Stimulus führt auf der luminalen Seite der Endothelzell-Oberfläche zur Expression von ICAM-1. Dasselbe Signal verursacht, dass JAM-1 in den interendothelialen Spalt verlagert wird, wohingegen die Lokalisation von PECAM-1 und CD 99 nicht beeinflusst wird.

B: Nach dem 'tethering' dem 'Roller' und der 'festen Adhäsion', transmigriert der Leukozyt mit Hilfe von JAM-1, PECAM-1 und CD 99. Chemokine aktivieren die Leukozyten-Integrine, was zur Interaktion des LFA-1 mit dem endothelialen ICAM-1 und JAM-1 führt. Die sequentielle Interaktion von PECAM-1 und CD 99 vermittelt schließlich die transendotheliale, parazelluläre Migration des Leukozyten (Aurrand-Lions et al., 2002).

Die Beteiligung von Enzymen

Die Frage, inwieweit endogene Leukozyten-Proteasen aktiv an der Diapedese beteiligt sind, indem sie die junctionalen Moleküle während der parazellulären Neutrophilen-Diapedese degradieren, wird kontrovers diskutiert.

Zahlreiche der durchgeführten Studien zur Neutrophilen-Transmigration zeigten, dass die Neutrophilen die Endothelzell-Barriere parazellulär überwinden (Kishimoto and Anderson, 1992; Granger et al., 1995; Burns et al., 1997; Panes & Granger, 1998). Carden et al. (1998) und Moll et al. (1998) konnten nachweisen, dass bei der Überwindung der interendothelialen Zell-Zell-Kontakte die *junctions* durch die Neutrophilen-Proteasen proteolytisch zersetzt werden. Die Elastase nimmt dabei eine zentrale Rolle ein, wie die Untersuchungen von Cepinskas et al. (1999) und Carden et

al. (1998) zeigten. So konnten Carden und Mitarbeiter nachweisen, dass der Neutrophilen-verursachte Abbau des VE-Cadherins durch einen Elastase-Inhibitor verhindert werden konnte, was eindeutig die proteolytische Wirkung dieses Enzyms auf die Protein-Komplexe der *junctions* während der Neutrophilen-Transmigration belegt. Auch Yoshida et al. (1995) zeigten, dass die Neutrophilen-Transmigration durch den Einsatz eines blockierenden Antikörpers gegen Elastase inhibiert wird. Ebenso konnten die Autoren nachweisen, dass der Elastase-Antikörper die durch aktivierte Neutrophile verursachte Retraktion der HUVEC's verhindert.

Die Frage, ob die Neutrophilen die Elastase während der Diapedese in das extrazelluläre Milieu sezernieren oder ob das Enzym in der Membran des Neutrophilen gebunden bleibt, konnten Cepinskas et al. (1999) beantworten. Die Autoren zeigten, dass sich die Membran-gebundene Elastase während der Adhäsion des Neutrophilen in dessen apikalen Membran-Bereich befindet, wogegen sie während der Transmigration in die Neutrophilen-Pseudopodien verlagert wird, die in die Endothelzellen eindringen. Auf diese Weise wird der Endothelzell-Monolayer lediglich an der Stelle proteolysiert, an der der Neutrophile transmigriert. Somit kommt es während der Transmigration nicht zur Interferenz der Neutrophilen-Elastase mit anderen im Extrazellularraum zirkulierenden Proteasen. Während der beginnenden Diapedese wird die Elastase in diejenigen Membranbereiche des Neutrophilen und der Endothelzellen verlagert, die während der Transmigration miteinander interagieren. Unklar ist dabei allerdings, wie die Membran-gebundene Elastase der Neutrophilen auf die Endothelzell-Membran übertragen wird und ob die Endothelzell-gebundene Elastase in aktiver Form vorliegt und somit die Retraktion der Endothelzellen und damit verbunden ein Öffnen Zell-Zell-Kontakte bewirkt um dem Neutrophilen die parazelluläre Transmigration zu ermöglichen (Cepinskas et al., 1999).

1.3.2.2 Die transzelluläre Transmigration

In den 60-er Jahren des letzten Jahrhunderts erforschte man erstmals ultrastrukturell die Interaktion von Leukozyten und Endothelzellen. So untersuchten u. a. Marchesi & Florey (1960) elektronenmikroskopisch die Adhäsion von Leukozyten auf der entzündungsaktivierten Endothelzell-Oberfläche. Zu dieser Zeit wurde zudem erstmals die Diapedese der Leukozyten im Detail untersucht. Sämtliche der ersten elektronenmikroskopischen Studien, die sich mit dieser Fragestellung beschäftigten, zeigten, dass die Neutrophilen mit Pseudopodien-ähnlichen Fortsätzen in die Endothelzellen eindringen (Marchesi & Florey, 1960). Neuere Untersuchungen von Migliorisi et al. (1987) zeigten zudem, dass sowohl Neutrophile als auch Monozyten mit ihren Pseudopodien in die apikale Membran der Endothelzellen und nur selten in die interendotheliale Zone eindrangen. Williamson & Grisham (1961) konnten elektronenmikro-

skopisch nachweisen, dass die Leukozyten, umschlossen von großen Endothelzell-Vakuolen, in deutlicher Entfernung zu den *tight junctions* transmigrierten. Diese Beobachtung ließ vermuten, dass die Leukozyten von den Endothelzellen phagozytiert wurden und nicht die interendotheliale Zell-Kontaktzone durchwanderten. Obwohl diese morphologischen Befunde der transendothelialen Leukozyten-Diapedese sehr eindeutig erscheinen, sind sie dennoch mit Vorsicht zu interpretieren, da die elektronenmikroskopischen Untersuchungen dieser frühen Studien keine vollständigen sequentiellen Bilderreihen umfassten (Feng et al., 1998).

Feng et al. (1998) konnten erstmals mit Hilfe sequentieller elektronenmikroskopischer Aufnahmen, die Computer-unterstützt dreidimensional ausgewertet wurden zeigen, dass Neutrophile nach der Applikation von FMLP (*formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine*) die Endothelzell-Barriere der Hautvenen im Meerschweinchen-Modell transzellulär überwinden, ohne dabei die junctionale Zell-Zell-Kontaktzone zu beeinträchtigen. Diese Befunde zeigten erstmals, dass die Neutrophilen-Transmigration nicht zwingend parazellulär erfolgt, wie bisher postuliert wurde, sondern dass Leukozyten generell transzellulär extravasieren können (Feng et al., 1998). Auch Greenwood et al. (1994) konnten die transzelluläre Transmigrationsroute ohne gleichzeitigen Verlust der junctionalen Integrität an Endothelzellen der Blut-Retina-Schranke nachweisen.

Die bisherigen Untersuchungen der Diapedese ergaben generell, dass die Leukozyten-Transmigration in Abhängigkeit von der Tierart, des Gewebetyps und des inflammatorischen Stimulus, sowohl parazellulär als auch transzellulär möglich zu sein scheint, so dass diesbezüglich verallgemeinernde Aussagen kaum zu treffen sind.

1.3.3 Die BHS im Kontext der Leukozyten-Transmigration

Die Hauptfunktion der BHS liegt neben der Erhaltung der ionischen Homoöstate im Gehirn darin, den Eintritt von Zellen aus dem Blut zu regulieren. Der Zusammenbruch der Barrierefunktion der BHS in Verbindung mit der Infiltration von Leukozyten ist ein charakteristisches Erscheinungsbild von ZNS-Erkrankungen wie z. B. der Multiplen Sklerose (Kwon & Prineas, 1994) oder dem Schlaganfall (Dietrich et al., 1993). Die Mechanismen, die der BHS-Schädigung während der Leukozyten-Rekrutierung zugrunde liegen, sind bisher nicht bekannt. Auch ist nicht klar, ob die Leukozyten die cerebrale Endothelzell-Barriere parazellulär, also durch Zell-Zell-Kontakte hindurch, oder transzellulär passieren (Greenwood et al., 1994; Bolton et al., 1998). Möglicherweise existieren beide Transmigrationsrouten (Bolton et al., 1998). Ebenfalls unklar ist, inwiefern sich der Transmigrations-Mechanismus unter gesunden von dem unter entzündlichen Bedingungen unterscheidet (Perry et al., 1997).

Bolton et al. (1998) konnte erstmals *in vivo* zeigen, dass die durch die Injektion von IL-1 β induzierte Entzündungsreaktion im ZNS der Ratte eine Erhöhung der Phosphotyrosin-Konzentration verursachte, die mit einem Verlust von ZO-1 und Occludin der *tight junctions* verbunden war. Die ultrastrukturellen Untersuchungen dieser Studie zeigten zudem, dass die junctionalen Komplexe, die in die Neutrophilen-Migration involviert waren, morphologische Veränderungen aufwiesen. Zwar konnten die Autoren die Neutrophilen-Transmigration morphologisch nicht direkt dokumentieren, dennoch war deutlich erkennbar, dass dort, wo sich die Neutrophilen noch in unmittelbarer Nähe der Zell-Zell-Kontakte auf der abluminalen Endothelzelleseite befanden, keine *tight junctions* mehr zu erkennen waren. Dies deutete auf die Zerstörung bzw. ihre Öffnung während der Neutrophilen-Transmigration hin (Bolton et al., 1998). Dabei lässt die genannte Arbeit unbeantwortet, ob die Neutrophilen den Verlust der *tight junction*-Integrität induzierten, um daraufhin durch die interendotheliale Zell-Zell-Kontaktzone transmigrieren zu können, oder ob der junctionale Integritätsverlust eine Konsequenz der transzellulären Neutrophilen-Diapedese war.

Wie die *in vivo*-Studie der Leukozyten-Transmigration von Bolton et al. (1998) verdeutlicht, bleibt weiterhin unklar, ob die Leukozyten die BHS unter gesunden und unter pathologischen Bedingungen parazellulär oder transzellulär überwinden. Ob dabei Unterschiede verschiedener Immunzelltypen bzw. bei cerebralen Kapillarendothelzellen unterschiedlicher ZNS-Regionen bestehen, ist ebenfalls noch nicht bekannt.

Einige wichtige Aspekte des Regulationsmechanismus der transendothelialen Leukozyten-Migration, insbesondere am Endothelzelltyp der Blut-Hirn-Schranke, können unter *in vivo*-Bedingungen nicht untersucht werden. So ist *in vivo* eine detaillierte Analyse der durch die Entzündungsaktivierung bzw. die Leukozyten-Interaktion verursachten Funktionsstörung der BHS nicht möglich, da die hierzu notwendigen biophysikalischen Methoden am lebenden Organismus nicht durchführbar sind. Auch die Lokalisation des Transmigrationsweges und die Untersuchung der Funktion der *tight junction*-assoziierten Proteine während der Leukozyten-Diapedese sind *in vivo* nur bedingt möglich, da *in situ* lediglich Immuno-`labelling`-Analysen durchgeführt werden können und nicht die zur Charakterisierung des komplexen Transmigrations-Mechanismus nötigen immunzytochemischen Analysen.

Die Aufklärung des Mechanismus der transendothelialen Leukozyten-Migration bedarf einer detaillierten Analyse mit Hilfe eines umfangreichen Methodenspektrums und macht somit ein *in vitro*-Modell der BHS erforderlich. Dieses setzt allerdings eine sehr hohe *in vivo*-Kompatibilität voraus, da sich die typischen Endothelzell-Kulturartefakte speziell bei der Bearbeitung dieser Fragestellung gravierend auf die Ergebnisse auswirken würden.

Das Hauptproblem der meisten bisher etablierten *in vitro*-BHS-Modelle ist die im Vergleich zur *in vivo*-Situation schwach entwickelte Barrierefunktion, die sich in einem niedrigen transendothelialen Widerstand widerspiegelt und verdeutlicht, dass die *tight junctions* entsprechend schwach ausgeprägt sind. Inflammatorische Stimuli, die zur Entzündungsaktivierung eingesetzt werden, verursachen zudem Aufweitungen an den Schwachstellen des Endothelzell-Monolayers (den interendothelialen Zell-Zell-Kontakten), so dass die parazelluläre Leukozyten-Transmigration kulturbedingt per se gefördert wird (Kvietys & Sandig, 2001). Die fehlende Komplexität der interzellulären *tight junctions* und die schwach entwickelte Region in ihrer unmittelbaren Nähe machen die meisten *in vitro*-Endothelzell-Modelle für Untersuchungen, die Zell-Zell-Kontakte mit hoher *in vivo*-Kompatibilität erfordern, ungeeignet. Die BHS-charakteristische komplexe Ausprägung der *tight junctions* ist jedoch speziell für die Charakterisierung der Transmigrationsroute von ausschlaggebender Bedeutung.

Aufgrund der komplexen Eigenschaften der cerebralen Kapillarendothelzellen und ihrer barrierebildenden *tight junctions* ist bisher kein adäquates *in vitro*-Modell der BHS etabliert worden, das durch eine hohe *in vivo*-Übereinstimmung der Untersuchung und Aufklärung des Regulationsmechanismus der Leukozyten-Diapedese gerecht werden konnte. Das Fehlen von geeigneten *in vitro*-BHS-Modellen resultiert daher in mangelnden Erkenntnissen über den Regulationsmechanismus der Leukozyten-Transmigration durch die cerebrale Endothelzellschicht.

In dieser Arbeit wurde die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, insbesondere die Transmigration, erstmals unter chemisch definierten, serumfreien Kulturbedingungen in einem *in vitro*-Modell der BHS untersucht, das in der Ausprägung seiner *tight junctions* und damit in seiner Barriereeigenschaft eine sehr hohe *in vivo*-Kompatibilität aufweist. Somit eröffnete sich in dieser Studie erstmals die Möglichkeit, mit Hilfe eines breit gefächerten Methodenspektrums die Auswirkung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion auf die Barrierefunktion der BHS sowie die Leukozyten-Diapedese im Detail unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen zu beleuchten. Um die Grundlage für die Untersuchung des Transmigrations-Prozesses unter entzündlichen Bedingungen zu schaffen, wurde zunächst durch eine kombinierte immunzytochemische, biophysikalische, zellbiologische und morphologische Analyse die entzündungsabhängige Veränderung der Blut-Hirn-Schranke charakterisiert.

Die Anwendung einer neuen nicht-invasiven biophysikalischen Methode, der sogenannten ECIS (*electrical cell-substrate impedance sensing*)-Technik, lieferte bei der Untersuchung der Leukozyten-Endothelzell-Wechselwirkung auf die BHS-Funktion erste Informationen über die quantitative Veränderung der Zell-Zell-Kontakte, des Zell-Substrat-Kontakts und der Membrankapazität. Durch die Korrelation dieser die Barrierefunktion quantitativ beschreibenden biophysikalischen Methode mit der im-

munzytochemischen Analyse der *tight junction*-assoziierten Proteine und den elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Endothelzellgrenzen wurde sowohl auf molekularer als auch auf morphologischer Ebene eine umfassende Analyse des Einflusses der Leukozyten-Interaktion auf die Barrierefunktion der BHS ermöglicht. Die Analyse des Leukozyten-Transmigrationsmechanismus, insbesondere die bis heute noch nicht aufgeklärte Lokalisation der Transmigration durch das barrierebildende Endothel der BHS, wurde durch elektronenmikroskopische Detail-Analysen beleuchtet.

Die Aufklärung des Regulationsmechanismus der Transmigration verschiedener Immunzelltypen durch die BHS ist von größtem klinischem Interesse, da erst dadurch die Möglichkeit geschaffen wird Therapien zu entwickeln, die den für zahlreiche ZNS-Erkrankungen charakteristischen Leukozyten-Einstrom ins Gehirn unterbinden.

2. Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Cerebrale Kapillarendothelzellen aus dem Schweinehirn

2.1.1.1 Präparation

Die hier eingesetzte Präparationsmethode der cerebralen Kapillarendothelzellen aus dem Schweinehirn (PBCEC) adulter Tiere erfolgte nach der Methode von (Tewes et al., 1997). Prinzipiell basiert die Präparationsmethode auf zwei enzymatischen Abbauschritten, durch die die Kapillarendothelzellen aus dem Gehirn-Parenchym isoliert werden. Im ersten Schritt erfolgt die enzymatische Freisetzung der cerebralen Kapillaren aus dem Parenchym durch den Einsatz einer neutralen Protease, woraufhin die Isolierung der Endothelzellen aus den Kapillarbruchstücken mit Hilfe eines enzymatischen Abbaus durch ein Collagenase/Dispase-Gemisch folgt. Im Einzelnen wurde die Präparation, folgendermaßen durchgeführt:

Zunächst wurden die Gehirne direkt nach Entnahme aus dem Schädel der frisch geschlachteten Schweine in eisgekühlten 70 %-igen Ethanol gegeben. Zum Transport wurde der Alkohol durch Phosphatpuffer (PBS--) mit Zusatz von 200 U/ml Penicillin und 200 µg/ml Streptomycin ausgetauscht. Kurz vor der Präparation wurde der Phosphatpuffer nochmals durch 4°C gekühltes PBS ersetzt. Die zu präparierende Gehirnhälfte wurde auf ein Tablett gelegt und von beiden Seiten kurz abgeflammt. Die Hirnhaut mit den dazugehörigen Gefäßen, der Hippocampus, der Hypothalamus, die Hypophyse sowie der Plexus choroideus wurden sorgfältig entfernt um zu gewährleisten, dass ausschließlich die Endothelzellen der Gehirnkapillaren isoliert wurden. Die Gehirnhälften wurden daran anschließend mit Skalpell und mit einem Kräuterschneider fein zerkleinert und in 37°C warmem Präparationsmedium suspendiert (100 ml/ Gehirn).

Die Freisetzung der Kapillaren erfolgte durch eine zweistündigen enzymatischen Abbau mit 1,3 % [w/v] Dispase II unter ständiger Durchmischung bei 37°C. Anschließend wurden jeweils 100 ml der Gehirnsuspension mit 150 ml einer 4°C kalten Dextranlösung der Dichte 1,061 g/cm³ durchmischt. Durch die anschließende 10-minütige Dichtezentrifugation bei 7100 x g und 4°C erfolgte die Trennung des fetthaltigen Myelins von den Kapillarbruchstücken, die sich als Pellet absetzten. Nach dem Dekantieren des Überstands und Entfernung des Myelins aus dem Zentrifugenbecher wurden die pelletierten Kapillarbruchstücke in 37°C warmen Aussaatmedium resuspendiert (9 ml/Hirn). Zur Abtrennung größerer Kapillarbruchstücke wurde die Suspension durch ein Nylonsieb mit einer Maschengröße von 180 µm gegeben und die

Kapillaren durch Scherkräfte mechanisch zerkleinert, indem die Suspension fünfmal mit Aussaatmedium auf einer Petrischale trituriert wurde.

Durch die Zerkleinerung der Kapillaren wurden optimale Ausgangsbedingungen für den zweiten enzymatischen Abbau geschaffen, der der Freisetzung der Endothelzellen aus der sie umgebenden collagenhaltigen Basalmembran der Kapillare diente. Um diese abzubauen wurde ein Collagenase/Dispase II-Gemisch (0,1 % [w/v]) gelöst in Aussaatmedium mit einem Endvolumen von 10 ml/Gehirn eingesetzt. Die Inkubationszeit bei 37°C betrug je nach Enzymcharge 30 bis 45 Minuten. Diese Zellsuspension wurde in einem speziellen Rührgefäß mit freihängendem Rührstab mit dem Enzym gemischt, so dass die Endothelzellen mechanisch nicht geschädigt wurden. Der Verlauf des enzymatischen Abbaus wurde mikroskopisch kontrolliert um eine enzymatische Schädigung der Endothelzellen durch eine zu lange Inkubationszeit zu verhindern. Nach Abschluss des zweiten enzymatischen Abbaus wurde die Zellsuspension 10 Minuten bei 140 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und das resultierende Pellet in Aussaatmedium resuspendiert. Da die Endothelzellen durch Erythrozyten und Myelinreste noch verunreinigt waren, wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation mit einem diskontinuierlichen Percoll-Gradienten angeschlossen. Hierzu wurden jeweils 15 ml einer Percoll-Lösung der Dichte 1,07 g/cm³ in ein 50 ml Röhrchen vorgelegt und mit 20 ml einer Percoll-Lösung der Dichte 1,03 g/cm³ überschichtet (8 Hirne=Percoll-Gradient). Die Gradienten wurden mit jeweils 10 ml der Zellsuspension überschichtet. Nach einer Zentrifugation von 10 Minuten bei 1380 x g und 4°C befanden sich die Endothelzellen in der Grenzzone der beiden Percoll-Lösungen, die Zellfragmente sowie die Myelinreste in der oberen Zone und die Erythrozyten im Pellet. Die Endothelzellen wurden anschließend vorsichtig entnommen und unter Zusatz von 10 ml Aussaatmedium bei Raumtemperatur 10 Minuten bei 140 x g nochmals zentrifugiert. Das die aufgereinigten Endothelzellen enthaltende Pellet wurde in 6 ml Aussaatmedium/Hirn resuspendiert und auf sechs Collagen G-beschichtete 75 cm²-Flaschen/Hirn ausgesät.

Dextranlösung, $\rho = 1,061 \text{ g/cm}^3$

Earle's Salzlösung (10x) mit Phenolrot	10 % [v/v]
NaHCO ₃	25,5 mM
Dextran, Ø MW: 162.000	180 g/l
bidest. H ₂ O (1 l) auffüllen	

Percoll-Lösung , $\rho = 1,03 \text{ g/cm}^3$

PBS ⁻	80 % [v/v]
Percoll	18 % [v/v]
Medium M 199 (10x) mit Phenolrot	2 % [v/v]

Percoll-Lösung , $\rho = 1,07 \text{ g/cm}^3$

PBS ⁻	40 % [v/v]
Percoll	54 % [v/v]
Medium M 199 (10x) mit Phenolrot	6 % [v/v]

PBS⁻

NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	8 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
in bidest. H ₂ O	

PBS⁺⁺

NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	8 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
MgCl ₂	0,5 mM
CaCl ₂	0,9 mM
in bidest. H ₂ O	

Präparationsmedium

Medium M199 Earle (1x) mit Phenolrot	
NaHCO ₃	2,2 g/l
L-Glutamin	0,7 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Gentamycin	100 µg/ml

Aussaatmedium

Medium M199 Earle (1x) mit Phenolrot

NaHCO ₃	2,2 g/l
L-Glutamin	0,7 mM
Penicillin	100 U/ml
Gentamycin	100 µg/ml
Ochsen Serum	10% [v/v]

Kulturmedium

Medium M199 Earle (1x) mit Phenolrot

NaHCO ₃	2,2 g/l
L-Glutamin	0,7 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Ochsen Serum	10% [v/v]

2.1.1.2 Subkultivierung der PBCEC

Die Kultivierung der cerebralen Kapillarendothelzellen erfolgte bei 37°C und 5 Vol.-% Kohlendioxid in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre in Kulturflaschen aus Polystyrol mit einer Wachstumsfläche von 75 bzw. 190 cm².

Zur Entfernung abgestorbener Zellen und restlicher Erythrozyten wurden die Endothelzellen am zweiten Kulturtag (2. DIV) zunächst zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend mit 10 ml (75 cm²) bzw. 20 ml (190 cm²) Kulturmedium je Kulturflasche inkubiert. Nach der Passage der PBCEC am dritten Kulturtag (3. DIV) und deren Aussaat in Aussaatmedium, erfolgte am vierten Tag (4. DIV) die Umstellung der serumhaltigen auf serumfreie chemisch definierte Zellkulturbedingungen.

Die frisch präparierten PBCEC enthielten stets eine geringe Menge Fremdzellen, insbesondere Perizyten. Um deren Menge zu minimieren, erfolgte eine fraktionierte Trypsinierung, die sogenannte `Passage` der Endothelzell-Kulturen. Dadurch, dass sich die PBCEC leichter unter dem Einfluss des Trypsins vom Substrat lösen als die Fremdzellen, ist eine Trennung und somit eine Reinkultur der Kapillarendothelzellen möglich. Die `Passage` wurde durchgeführt, nachdem die Endothelzellen ca. 70 % der Fläche der Kulturflaschen bedeckten (üblicherweise am 3. DIV). Vor der Inkubation der PBCEC mit dem Trypsin, wurden sie zunächst zweimal mit PBS⁻ gewaschen um Reste des Kulturmediums und divalente Kationen zu entfernen, die den nachfolgenden enzymatischen Abbau der Endothelzell-Adhäsionsproteine und damit das Ablösen der Endothelzellen vom Substrat durch das Trypsin verhindern würden. Je-

weils 4 ml der Trypsin-Lösung (0,05 % in PBS⁻) wurde auf eine 75 cm²-Kulturflasche bzw. 8 ml auf eine 190 cm²-Kulturflasche zu den Endothelzellen gegeben.

Eine enzymatische Schädigung der Endothelzellen wurde durch die Verwendung einer geringen Trypsin-Konzentration in Kombination mit einer zügigen Vorgehensweise, die zudem mikroskopisch kontrolliert wurde, verhindert. Das Ablösen der Zellen wurde nach einer wenige Minuten andauernden Einwirkzeit des Enzyms bei Raumtemperatur durch saches Klopfen der Kulturflaschen erreicht. Um ein Ablösen der Fremdzellen zu verhindern, wurden ca. 10 % der Zellen auf dem Kulturflaschen-Substrat belassen und der Vorgang beendet, indem die Flaschen senkrecht aufgestellt wurden. Die Enzym/Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur bei 140 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in Aussaatmedium aufgenommen und die Zellsuspension in ein Glasgefäß überführt. Da die Aussaatdichte der PBCEC von ausschlaggebender Bedeutung zur Erzielung eines hohen transendothelialen elektrischen Widerstands war, wurde vor der Aussaat der Endothelzellen auf die entsprechenden Kulturgefäße die Zellzahl in einer Bürker-Kammer bestimmt. Die unterschiedlichen Kulturgefäße, deren Beschichtung und die jeweils eingesetzte Aussaatdichte der PBCEC sind in Tabelle 2.1 dargestellt.

2.1.1.3 Beschichtung der Kulturgefäße

Zur Beschichtung der 75/190 cm²-Kulturflaschen wurden 1 ml bzw. 2,5 ml einer mit H₂O bidest 1:30 verdünnten Collagen G-Stammlösung gleichmäßig auf dem Flaschenboden verteilt und bei 37°C im Wärmeschrank eingetrocknet. Die Petrischalen eines Durchmessers von 10 cm² beziehungsweise 28 cm² wurden mit 100 bzw. 300 µl der Collagen G-Lösung beschichtet. Bei der Beschichtung der Transwell[®]-Filtereinsätze wurde selbstpräpariertes Rattenschwanzcollagen (s. u.) verwendet, von dem je Filtereinsatz 100 µl in einer Verdünnung von 1:21 mit bidest. H₂O gleichmäßig verteilt wurde. Nach einer 24-stündigen Inkubation im Wärmeschrank bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre wurden die Filterplatten vorsichtig bewegt, um die Collagenlösung erneut zu verteilen. Anschließend wurden diese geöffnet in die Sterilbank gestellt bis die Beschichtung vollständig auf den Filtermembranen eingetrocknet war.

Die Goldelektroden wurden mit jeweils 2 ml einer 0,5 %-igen Gelatine-Lösung für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung vorsichtig abgenommen und die zurückbleibende Gelatine durch eine 20-minütige Inkubation mit einer 2,5 %-igen Glutardialdehyd-Lösung quervernetzt. Durch eine darauffolgende 30-minütige Beschichtung mit 70%-igem Ethanol wurden die Goldelektroden sterilisiert. Zur Entfernung der Rückstände des Glutardialdehyds aus

der Beschichtung folgten abschließend 4-5 Waschschritte und eine 24-stündige Inkubation mit bidest. H₂O.

Collagen G-Stammlösung

90% Collagen Typ I, 10% Collagen Typ II
in 12 mM HCl (3 mg/ml Collagen G)

Rattenschwanzcollagen

vorwiegend Collagen Typ I
in 0,1%iger Essigsäure (0,54 mg/ml)

2.1.1.4 Präparation des Rattenschwanzcollagens

Zur Isolierung des Rattenschwanzcollagens wurden abgeschnittene Rattenschwänze gründlichst mit Seife gewaschen, die Endstücke abgeschnitten und eine Arterienklemme in einem Abstand von 1 cm vom Ende des Schwanzes angeklemt. Das Verdrillen des Schwanzes verursachte ein Aufbrechen der äußeren Hautschichten, so dass die Collagenfasern aus den aufgebrochenen Stellen herausgezogen werden konnten. Durch eine 24-stündige Inkubation in 50 ml einer 0,1%igen [w/v] Essigsäure-Lösung wurde das Collagen nur teilweise in Lösung gebracht. Zur Abtrennung des nicht gelösten Collagens wurde deshalb eine 3-stündige Zentrifugation bei 4°C und 5.000 x g durchgeführt und der das restliche Collagen enthaltende Überstand entnommen. Der Gesamtproteingehalt wurde mit Hilfe des Bicinchoninsäure-Tests bestimmt.

Tabelle 2.1:

Beschichtung der verschiedenen Kulturgefäße und Aussaatdichte der PBCEC.

Kulturgefäß	Beschichtung	Aussaatdichte	Experiment
Kulturflasche (75/190 cm ²)	Collagen G (1:30)	1x10 ⁴ Zellen/cm ² 2,2x10 ⁴ Zellen/cm ²	Immunoblot
Petrischale (10/28 cm ²)	Collagen G (1:30)	2,5x10 ⁴ Zellen/cm ² 5x10 ⁵ Zellen/cm ²	Apoptose-Bestimmung
Transwell [®] -Filter (1,33 cm ² /0,4 Poren Ø)	Rattenschwanzcollagen (1:21)	1,5x10 ⁵ Zellen/cm ²	TER, ICC TEM, REM,
Goldelektroden (5,3 cm ²)	Gelatine (0,5%)	3x10 ⁵ Zellen/cm ²	ECIS

TER: Transendothelialer (Resistance) Widerstand; ICC: Immunozytochemie; TEM: Transmissionselektronenmikroskopie; REM: Rasterelektronenmikroskopie

2.1.1.5 Mediumwechsel

Nachdem die Endothelzellen einen konfluenten Zellmonolayer ausgebildet hatten, erfolgte die Umstellung der serumhaltigen auf serumfreie Kulturbedingungen. Diese Medienumstellung erfolgte stets am 4. DIV. Da die PBCEC sehr empfindlich auf den Medienwechsel reagierten, was sich in einer Beeinträchtigung des transendothelialen Widerstands (TER) äußerte, war es sehr wichtig extrem vorsichtig vorzugehen. Den Transwell®-Filtersystemen wurde das Medium zunächst aus der basolateralen Kammer vollständig entnommen und erst danach vorsichtig jenes aus der apikalen Kammer. Um die Barrierefunktion der PBCEC nicht zu beeinträchtigen, durfte die Zellschicht während des Mediumwechsels zu keinem Zeitpunkt trocken fallen.

DMEM/Ham's F12 mit Supplementen (CDM)

DMEM/Ham's F12 mit Phenolrot

NaHCO ₃	1,2 g/l
L-Glutamin	6,5 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Hydrocortison	55 nM

2.1.1.6 Gewinnung konditionierter Medien der PBCEC

Die Gewinnung der von den PBCEC konditionierten Medien erfolgte am 7. DIV, nachdem der transendothelialen Widerstand bestimmt wurde. Um den polaren Effekt der entzündungsstimulierenden Substanzen oder der Leukozyten auf die PBCEC zymographisch zu analysieren, wurde das konditionierte Medium den Transwell®-Filtern aus der apikalen (50 µl) oder basolateralen (150 µl) Filterkammer entnommen und entweder direkt in der zymographischen Analyse unterzogen, oder aber bei – 20°C eingefroren. Auch den mit PBCEC bewachsenen Goldelektroden (100 µl) und den Zellkulturflaschen (1 ml) wurde konditioniertes Medium entnommen.

2.1.2 Die Leukozyten-Isolierung

Die Isolierung der Leukozyten erfolgte aus dem Vollblut (neutrophile Granulozyten) beziehungsweise den cervikalen Lymphknoten (CD4⁺ T-Helferzellen) des Schweins. Beide Zelltypen wurden noch am gleichen Tag ihrer Präparation experimentell eingesetzt.

2.1.2.1 Neutrophile Granulozyten

Die Isolierung der neutrophilen Granulozyten erfolgte aus dem Vollblut des Schweins. Zur Vermeidung der Blutgerinnung wurde das Blut noch am Schlachthof mit einer 4 %-igen Natriumcitratlösung versehen, so dass eine Endkonzentration von 0,4 % [w/v] resultierte. Der Transport erfolgte bei Raumtemperatur in 50 ml Plastikröhrchen.

Der erste Schritt der Isolierung der Neutrophilen bestand in einer Trennung der Erythrozyten von den übrigen Bestandteilen des Blutes u. a. der übrigen Immunzelltypen. Durch die Erhöhung der Dichte des Blutes erfolgte eine Sedimentierung der roten Blutkörperchen, während die übrigen Bestandteile des Blutes, u. a. die Leukozyten im Überstand verblieben. Zur Sedimentation wurde das Blut in einen 250 ml-Glasmeßzylinder gefüllt und mit 10 Vol.-% einer 6 %-igen Dextranlösung gut durchmischt. Nach einer 60-minütigen Sedimentation der Erythrozyten bei Raumtemperatur, wurde der die Leukozyten enthaltende Überstand abgenommen und bei 350 x g 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das resultierende Pellet enthielt neben den Leukozyten noch einen Restanteil an Erythrozyten. Diese wurden entfernt, indem das Pellet in 2 ml kalten Reinstwasser maximal 20 Sekunden resuspendiert wurde. Da die Erythrozyten keine ausgleichenden Ionenpumpen besitzen, platzten sie aufgrund der veränderten Osmolarität. Die Leukozyten dagegen können für diesen geringen Zeitraum durch ihre Ionenpumpen ihr inneres Milieu aufrecht erhalten. Der Prozess wurde gestoppt, indem die Zellen mit 40 ml 4°C kalter gepufferter Hank's Salzlösung (HBSS) durchmischt wurden und bei 350 x g für 7 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert wurden. Je nach Rotfärbung des Pellets durch die verbliebenen Erythrozyten wurde der Vorgang wiederholt, bis es schließlich eine weiße Farbe aufwies. Das ausschließlich Leukozyten enthaltende Pellet wurde in 6 ml HBSS resuspendiert.

Zur Aufreinigung der Neutrophilen aus dieser Zellsuspension war es notwendig, die Lymphozyten und Monozyten abzutrennen. Dies wurde mittels einer Dichtezentrifugation erreicht, indem jeweils 6 ml Histopaque 83[®] (Lösung definierter Dichte) in ein 15 ml Polypropylen-Röhrchen vorgelegt und mit 3 ml der Leukozytensuspension überschichtet wurde. Nach der anschließenden 30-minütigen Zentrifugation bei Raumtemperatur und 350 x g befand sich die Monozyten-/Lymphozyten-Fraktion über der Histopaque 1083[®]-Lösung und die schwereren Neutrophilen im Pellet. Der Überstand wurde abgenommen und die Neutrophilen zweimal mit jeweils 10 ml HBSS gewaschen (7 min Zentrifugation bei Raumtemperatur und 350 x g). Abschließend wurden die Neutrophilen in 3 ml auf Raumtemperatur erwärmtes CDM aufgenommen und in einem Polypropylen-Röhrchen in den 37°C warmen, wasserdampfgesättigten Brutschrank mit 5 Vol.-% CO₂ gestellt. Sehr wichtig während der Präparation war die

Vermeidung von Temperatur-Schwankungen, die zu einer Aktivierung und Vernetzung der Leukozyten untereinander geführt hätten.

Kurz vor der Applikation der neutrophilen Granulozyten zu den PBCEC wurde ein Vitalitätstest durchgeführt um sicherzustellen, dass die Neutrophilen zum Zeitpunkt des Experiments vital waren.

2.1.2.2 T-Helferzellen

Die Lymphozyten wurden aus dem cervikalen Lymphknoten des Schweins isoliert. Im Speziellen wurde die Zellpopulation der CD4⁺-T-Helferzellen gewonnen.

Zu diesem Zweck wurden Lymphknoten aus dem Halsbereich frisch geschlachteter Schweine entnommen und in eisgekühltes PBS⁻ gelegt. Im Gegensatz zur Präparation der Neutrophilen, war es bei der Isolation der T-Helferzellen wichtig unter eisgekühlten Bedingungen zu arbeiten. Zunächst wurde die die Lymphknoten umschließende Bindegewebskapsel und das Fettgewebe entfernt und der gereinigte Lymphknoten mit eiskaltem HBSS abgespült. Mit Hilfe eines Skalpell wurde der Lymphknoten angeschnitten und die Lymphozyten mit eiskaltem HBSS mit einer Spritze mit aufgesetzter Kanüle herausgespült. Die Zellsuspension wurde in einem 50 ml Polystyrol-Röhrchen aufgefangen und 10 Minuten bei 350 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde anschließend in 5 ml eiskalten HBSS mit 0,5 % BSA resuspendiert.

Zur Isolation der CD4⁺-T-Helferzellen wurde das *CELLlection™ Pan Mouse IgG Kit* der Firma Dynal verwendet. Dieses Zell-Isolations-Kit enthält sogenannte *Dynalbeads®*, superparamagnetische Kügelchen aus Polystyrol, die mit humanen Anti-Maus IgG4 Antikörpern beschichtet sind und an alle Maus IgG Subklassen binden. Indem die zu isolierenden Zellen mit einem entsprechenden Antikörper markiert werden, der gegen jede Tierart, außer gegen Maus gerichtet sein darf, ist es möglich diese Zielzellen durch die Bindung an die *Dynalbeads®*, die wiederum an den Erstantikörper der Zielzellen kreuzreagieren zu binden und mit Hilfe eines Magneten aus dem Zellgemisch herauszuziehen. Der Pan Maus IgG Antikörper ist durch einen DNA-Linker an die *Dynalbeads®* gebunden. Durch eine im sogenannten `Releasing` Puffer enthaltene DNase wird der Linker gelöst und die zu isolierenden Zellen von den *Dynalbeads®* entkoppelt. Die abgetrennten Metallkügelchen können dann abschließend durch einen Magneten aus dem Zellgemisch herausgefischt werden.

Zur Markierung der CD4⁺-T-Helferzellen wurde die Zellsuspension zunächst mit einem Anti-Schwein-CD4 Antikörper in einer Konzentration von 1:500 in gepufferter HBSS mit 0,5 % BSA (*bovine serum albumin*) 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Zell-Antikörper-Gemisch in 30 ml HBSS aufgenommen und jeweils dreimal bei 350 x g für jeweils 7 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Nach dem

letzten Waschschrift wurde das Pellet in 4 ml HBSS aufgenommen und die Zellzahl auf $10\text{-}40 \times 10^6$ Zellen/ ml eingestellt.

Vor Einsatz der *Dynalbeads*[®], mussten diese zunächst gewaschen werden, da in dem Puffer, in dem sie gelagert wurden Natriumazid zur Konservierung enthalten war. Die gewünschte Menge wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt, dieses in den Magnethalter gestellt und der Überstand abgenommen. Danach wurde das Röhrchen aus dem Halter genommen, die *Dynalbeads*[®] in 1 ml HBSS suspendiert und erneut in den Magnethalter gestellt. Der Überstand wurde wiederum entnommen und die *Dynalbeads*[®] nach Entnahme aus der Halterung erneut in Puffer aufgenommen. Der Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Die Inkubation der *Dynalbeads*[®] mit der Zellsuspension erfolgte für 15 Minuten bei 4°C unter leichter Rotation. Das *Dynalbeads*[®]/Zielzell-Ratio sollte 5:1 betragen, was 1×10^7 *Dynalbeads*[®]/ml Zellsuspension entsprach. Die Inkubation erfolgte in 5 ml-Polystyrol-Röhrchen. Nach der Inkubationsphase wurde das Röhrchen für eine Minute in den Magnethalter gestellt. Dadurch dass die *Dynalbeads*[®] mit den gebundenen Zielzellen durch den Magneten an der Röhrchen-Innenwand gehalten wurde, konnte der Überstand problemlos entnommen werden. Anschließend wurde das Röhrchen aus der Magnethalterung genommen und die *Dynalbeads*[®] mit den gebundenen Zellen in 500 µl CDM suspendiert und in einen 1,5 ml- Eppendorf-Gefäß überführt. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt und die *Dynalbeads*[®] schließlich in 200 µl vorgewärmtes (37°C) CDM aufgenommen. Bei einem Einsatz von mehr als 5×10^7 *Dynalbeads*[®] musste das CDM-Volumen entsprechend erhöht werden.

Um die *Dynalbeads*[®] von den Zielzellen abzutrennen, wurden 4 µl des sogenannten `Releasing-Puffers` / 10^8 *Dynalbeads*[®] zum Zell-*Dynalbeads*[®]-Gemisch hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte 15 Minuten bei Raumtemperatur unter leichter Rotation. Anschließend wurde das Eppendorf-Gefäß in den Magnethalter gestellt, der die abgelösten Zielzellen enthaltene Überstand abgenommen und in ein neues Gefäß mit vorgelegten 200 µl CDM überführt. Um die restlichen Zielzellen zu erhalten, wurde der Vorgang nochmals wiederholt. Abschließend wurde die Zellzahl der CD4⁺-T-Helferzellen bestimmt.

Um die Lebensfähigkeit der CD4⁺-T-Helferzellen vor dem Einsatz im Experiment sicherzustellen, wurde der sogenannte BrdU-Proliferations-Assay und eine Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau (s. Kapitel 2.1.2.3) durchgeführt.

CELLlection™ Pan Mouse IgG Dynbeads

PBS	2 ml
BSA	0,1 %
NaNH ₃	0,02 %

`Releasing` Puffer

DNase	15.000–20.000 U in
PBS	320 µl

2.1.2.3 Vitalitätsbestimmung der Leukozyten

Trypanblaufärbung

Zur Vitalitätsbestimmung wurden die Leukozyten 30 Minuten nach ihrer Isolation und nochmals kurz vor ihrem Einsatz in dem jeweiligen Experiment mit einer Trypanblau-Lösung gefärbt. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit einer 0,5 % Trypanblau-Lösung versetzt, 2 bis 5 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend die Zahl der gefärbten und ungefärbten Zellen in einer Bürker-Zählkammer ermittelt. Tote Zellen, deren Membranen nicht mehr intakt sind, wurden mit Trypanblau gefärbt. Vitale oder tote Zellen, deren Membranen aber noch intakt sind (!) sind ungefärbt.

Der Prozentsatz der vitalen Zellen errechnet sich nach folgendem Schema:

$$\% \text{ lebende Zellen: } \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen}}$$

BrdU Proliferations-Assay (T-Helferzellen)

Die Proliferation von T-Lymphozyten wird durch Mitogene induziert und kann als ein Maß für die Vitalität der Zellen herangezogen werden. Deshalb wurde die Vitalität der dargestellten T-Lymphozyten mittels eines BrdU-Assays bestimmt. Das Pyrimidin-Analogon BrdU (5-Bromo 2-desoxyuridin) wird dabei an Stelle des Thymidins in die DNA eingebaut und kann anschließend immunzytochemisch detektiert und quantifiziert werden.

Da die T-Helferzellen zur Durchführung des BrdU-Assays 2 Tage aktiviert wurden, war es notwendig sie während dieses Zeitraums in serumhaltigem Medium zu kultivieren (RPMI + 5 % FCS). 1 x 10⁶ Zellen wurden zunächst mit 5 µg/ml Concanava-

linA (ConA) über einen Zeitraum von 48 Stunden stimuliert. Nach dieser Zeitspanne hatten sich am Boden der 24-well-Platte adhärenz zahlreiche Klone gebildet, die in Form von Zellhaufen lichtmikroskopisch deutlich erkennbar waren. Nach der Aktivierung wurde das serumhaltige Medium gewechselt und durch serumfreies CDM ersetzt, bevor 100 µl BrdU-Lösung (100 µM BrdU)/ml Medium zu den T-Helferzellen appliziert und 8 Stunden bei 37°C inkubiert wurde. Während dieses Zeitraums wurde das BrdU von den Zellen inkorporiert und in die DNA der proliferierenden Zellen eingebaut. Anschließend wurden die Zellen resuspendiert und 10 Minuten bei 300 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und die 24-well-Platte mit den am Boden haftenden T-Helferzellen eine Stunde bei 60°C getrocknet. Darauf folgend wurden die Zellen 30 Minuten mit *FixDenat* überschichtet um die DNA zu denaturieren und das BrdU für den Antikörper besser zugänglich zu machen. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, die Platte erneut bei 300 x g 10 Minuten zentrifugiert und der restliche Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden danach 90 Minuten bei Raumtemperatur mit Anti-BrdU-POD (1:100) inkubiert und der Überstand erneut entnommen, indem die Platte 10 Minuten bei 300 x g zentrifugiert wurde. Es folgten drei weitere Waschschritte mit dem Waschpuffer bei Raumtemperatur und 300 x g. Zur Detektion des an das BrdU gebundenen Anti-BrdU-PODs, wurde ein H₂O₂-haltiges Substrat appliziert, das durch die an das BrdU gebundenen Peroxidase (POD) zu einem Farbkomplex umgesetzt wurde. Die Zellen wurden mit 300 µl/well der Substratlösung überschichtet und bei Raumtemperatur 5-30 Minuten inkubiert und die enzymatische Farbreaktion durch 1 M H₂SO₄ gestoppt. Die Detektion des entstandenen blauen Farbkomplexes erfolgte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Bestimmung der Superoxid Produktion (neutrophile Granulozyten)

Die O₂⁻-generierende NADPH-Oxidase ist ein Multi-Enzymkomplex, der in hoher Kopienzahl in Phagozyten und hier insbesondere in Neutrophilen vorkommt. Er besteht aus dem Membran-gebundenem Heterodimer Flavocytochrom b und den zytosolischen Proteinen p47phox (phox steht für „*phagocyte oxidase*“), p67phox, p40phox und einem niedermolekularem G-Protein (entweder Rac1 oder Rac2). In ruhenden Zellen liegen die Untereinheiten des Multi-Enzymkomplexes separat vor; nach Aktivierung translozieren die zytosolischen Faktoren zur Membran und binden dort an Flavocytochrom b. *In vitro* kann die Superoxid-Produktion durch den Phorbol-ester TPA (PMA) (TPA = PMA = Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) induziert werden.

Die Superoxid-Produktion kann zur Vitalitätsbestimmung neutrophiler Granulozyten benutzt werden. Dabei werden die Zellen mit TPA stimuliert und die Menge der frei-

gesetzten reaktiven Sauerstoffspezies durch Reduktion von Cytochrom c in Gegenwart und Abwesenheit der Superoxiddismutase (SOD) photometrisch bestimmt. Zur Bestimmung der Superoxid-Produktion wurden die neutrophilen Granulozyten (5×10^6 Zellen/ml) in 1 ml HBSS mit 5 mM Glucose und 80 μ M Cytochrom c als Zusätze suspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 100 nM TPA für 30 Minuten bei 37°C stimuliert und die Reaktion durch Zentrifugation (1500 x g für 10 Minuten) gestoppt. Die O²-Generation wurde durch die Reduktion von Cytochrom c photometrisch bei 550 nm bestimmt. Die spontane O₂-Generation wurde in einem Parallelansatz durch Zugabe von Superoxiddismutase (50 μ g/ml) bestimmt und von allen Werten substrahiert.

Tabelle 2.2:

Neutrophilen-Aktivitäts-Messung:

	Neutrophile (aktiv.)	Neutrophile (nicht aktiviert)
Zellzahl	5 x 10 ⁶ / 200 μ l HBSS	5 x 10 ⁶ / 200 μ l HBSS
TPA	100nM TPA/ ml HBSS	100 μ l HBSS
Cytochrom c	80 μ M	80 μ M
SOD	50 μ g/ml	50 μ g/ml

Neutrophilen-Aktivitäts-Messung: (jeweils 3-fach-Bestimmung), Referenzmessung: (jeweils 1-fach-Messung)

HBSS = Hanks` buffered salt solution mit Zusatz von 5 mM Glucose, SOD = Superoxiddismutase, TPA = PMA = Phorbol-12-Myristat-13-Acetat.

2.1.2.4 Gewinnung konditionierter Medien der Leukozyten

Nach der Isolierung und Zellzahl-Bestimmung der Neutrophilen beziehungsweise der T-Helferzellen, wurden die Immunzellen zunächst für einige Stunden im Wärmeschrank bei 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre (5 Vol.-% CO₂ + 95% Luftgemisch) in CDM inkubiert. Zur Gewinnung des Leukozyten-konditionierten Mediums wurde nach gutem Durchmischen der Zellsuspension jeweils 1 ml bei 350 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und bei -20°C eingefroren oder aber direkt experimentell eingesetzt. Das Zellpellet wurde wiederum in 1 ml frischem CDM resuspendiert und die Zellen im Wärmeschrank inkubiert. Die Medien wurden in einer Zeitspanne von 4 Minuten bis 16 Stunden von den Leukozyten konditioniert und zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen.

2.2 Elektronenmikroskopie

2.2.1. Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) dient der Oberflächenabbildung von Präparaten. Das Prinzip beruht auf der Detektion von Sekundärelektronen, die durch einen Elektronenstrahl aus der Probe herausgeschleudert werden. Zur Bereitstellung dieser Sekundärelektronen muss die Oberfläche der Probe mit Gold beschichtet werden, bevor sie in das Mikroskop eingeschleust wird. Im Mikroskop wird daraufhin ein Hochvakuum erzeugt, damit sich der von der Kathode ausgehende Elektronenstrahl geradlinig ausbreiten kann. Der Elektronenstrahl *scann*t die Oberfläche der Probe, ein Detektor registriert die dabei entstehenden unterschiedlich streuenden Sekundärelektronen, die in ein elektronisches Signalmuster und schließlich in ein für das menschliche Auge wahrnehmbares Bild umgewandelt werden.

Um den Anforderungen der Elektronenmikroskopie zu entsprechen, müssen die Proben fixiert und getrocknet werden. Da es bei einer Lufttrocknung zu Trocknungsartefakten kommen würde, die sich in einer starken Veränderung der Oberflächenstruktur der Probe äußert, ist es notwendig, das Gewebe, nachdem es fixiert wurde, in einer aufwendigen Prozedur, der sogenannten *„Kritisch-Punkt-Trocknung“* (KPT) zu trocknen. Bei der KPT der Präparate wird das Ethanol in den Zellen gegen flüssiges CO₂ vorsichtig ausgetauscht, welches dann in einem geschlossenen System durch eine Temperaturerhöhung und dem damit verbundenen Druckanstieg über den *„Kritischen Punkt“* (KP) in den gasförmigen Zustand überführt wird. Zum Zeitpunkt des KP, der für CO₂ bei 31°C und einem Druck von 73,8 bar vorliegt, geht die Flüssigkeit ohne Phasengrenze vom flüssigen in den gasförmigen Zustand über. Die Probe wird somit ohne die für die Lufttrocknung charakteristischen Artefakte wie z. B. Schrumpfungen, Risse und Brüche getrocknet.

Die Fixierung soll die Gestalt der Zellen stabilisieren und die Strukturen gegenüber Entwässerung, Trocknung und dem Vakuum im Mikroskop unempfindlich zu machen. Durch die Fixierung werden saure Hydrolasen in Plasma und Kern unwirksam, die normalerweise nach Stillstand der Stoffwechselforgänge die Autolyse der Zellen verursachen würden. Je nach Probentyp, wie zum Beispiel vollständiger Organismen mit oder ohne Cuticula, Gewebestücke oder aber Zell-Monolayer, wird das Fixierungsprocedere stark variiert. Dabei werden sowohl unterschiedliche Fixantien, Waschpuffer und Inkubationszeiten eingesetzt.

In dieser Arbeit wurden PBCEC, Plexusepithelzellen und Aortagewebe rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die cerebralen Kapillarendothelzellen und die Plexusepithelzellen wurden zu diesem Zweck auf den Transwell®-Filtersystemen kultiviert, so dass eine TER-Bestimmung vor ihrer Fixierung möglich war.

Zunächst wurde den Filtern das Medium der basolateralen Filterkammer komplett entnommen. Die Fixierung der Zellen erfolgte ausschließlich in der apikalen Filterkammer. Dabei war es sehr wichtig, dass bei den Fixierungs- und Waschschriften die Zellschicht mit der jeweiligen Flüssigkeit bedeckt blieb und nicht trocken fiel. Nachdem das Medium aus der apikalen Kammer des Filtersystems vorsichtig entfernt wurde, wurden die Zellen zunächst mit 300 µl 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4) je apikaler Filterkammer gewaschen. Danach folgte die Fixierung der PBCEC durch Überschichtung der Endothelzellen mit 2 % Glutaraldehyd-Lösung in 0,1 M Cacodylatpuffer für maximal 10 Minuten bei 4°C. Nachdem das Fixans entfernt wurde, wurden die Zellen dreimal mit Waschpuffer (0,1 M Cacodylatpuffer mit 0,2 M Saccharose, pH 7,4) gewaschen. Zur Durchführung der KPT, die aus verfahrenstechnischen Gründen in Ethanol durchgeführt werden musste, war es notwendig das wässrige Milieu der Zellen graduell gegen Ethanol auszutauschen. Zu diesem Zweck wurden die fixierten PBCEC einer Ethanol-Entwässerungsreihe unterzogen, die bei Raumtemperatur schrittweise in folgenden Konzentrationen für jeweils 10 Minuten erfolgte: 30 %, 50 %, 70 %, 85%, 96 % (2 x) und 100 % (2 x). Verwendet wurde reinster Ethanol, welcher mit H₂O bidest. entsprechend verdünnt wurde. In dem 100 %-igen Ethanol war es möglich die Zellen bei 4°C einige Tage aufzubewahren. Die Fixierung und Entwässerung der Plexusepithelzellen erfolgte gleichermaßen wie bei den PBCEC.

Das Aortagewebe wurde direkt nach der Entnahme aus dem Schwein in eiskaltem PBS⁻ Puffer transportiert und zunächst in CDM gelegt und noch am gleichen Tag fixiert. Zur REM-Präparation des Aortagewebes wurde lediglich die Fixierungszeit um 5 Minuten verlängert.

Zur Vorbereitung für die KPT wurden die Filtermembranen mit den Endothelzellen vorsichtig aus dem Filtereinsatz ausgeschnitten und in ein spezielles Probengefäß des KPT-Gerätes überführt. In der Druckkammer der KPT Apparatur erfolgte der Austausch des Ethanols gegen CO₂. Das eingeleitete CO₂ verursachte bei einer eingestellten Temperatur von 10°C in der Probenkammer einen Druckanstieg auf 50 bar und war unter diesen Bedingungen flüssig. Das Ethanol/CO₂-Gemischs wurde 7-8 mal gegen reines CO₂ ausgetauscht bis kein Ethanol mehr zu detektieren war. Daraufhin wurde die Temperatur in der Kammer langsam bis zum KP und darüber hinaus bis auf ca. 40°C erhöht, was zu einer Druckerhöhung von 90 bar und zur Überführung des flüssigen Zustands des CO₂ in den gasförmigen Zustand führte. Durch die Überhöhung der Temperatur über den KP hinaus wurde vermieden, dass beim darauffolgenden langsamen Ablassen des CO₂-Gases einen Rekondensation erfolgte. Anschließend wurden die PBCEC bewachsenen Filtermembranen der Kammer entnommen und für die Goldbedampfung vorbereitet.

Die Filtermembranen wurden zunächst auf spezielle, elektronenleitende Klebestreifen (*Leit-Tabs*) aufgebracht, die zuvor auf 8 x 12 mm² große Alubleche geklebt wur-

den. Danach wurden die Proben mit Gold bedampft und waren für die Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop bereit. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte an einem Hitachi S-530 Rasterelektronenmikroskop mit einer installierten Großbildkamera der Firma Mamiya. Als Filmmaterial dienten schwarz/weiß-APX-100-Rollfilme der Firma Agfa.

2.2.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ermöglicht die Betrachtung zellulärer Strukturen in einer Auflösung, welche die Lichtmikroskopie durch den begrenzenden Parameter der Wellenlänge des sichtbaren Lichts von 400 bis 700 nm nicht erreichen könnte. Elektronen erreichen bei einer entsprechenden Beschleunigung Wellenlängenbereiche von 0,005 nm, was einer ca. 100.000-fach kleineren Wellenlänge als der des sichtbaren Lichts entspricht. In der Praxis werden letztendlich Auflösungen von 1 nm erzielt. Da das Durchdringvermögen der Elektronen sehr gering ist, müssen ultradünne Schnitte (< 100 nm) der Proben erstellt werden. Zu diesem Zweck ist es notwendig, mit dem Ultramikrotom Ultradünnschnitte des jeweiligen Gewebes, beziehungsweise der Zellkulturen anzufertigen, die zudem nach deren Fixierung in ein Kunstharzgemisch eingebettet werden müssen. Die Schnitte müssen zur Betrachtung im Elektronenmikroskop mit elektronendichten Substanzen, wie z. B. Osmiumtetroxid und Uranylacetat kontrastiert werden, da ansonsten keine Struktur erkennbar wäre. Das für das Auge wahrnehmbare Bild ergibt sich aus der Detektion und Verrechnung der Kontrastunterschiede der Probe im Elektronenmikroskop.

Für die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, wurden die auf den Filtersystemen kultivierten PBCEC verwendet. Zur Fixierung der PBCEC wurde zunächst das Medium aus der basolateralen Kammer vollständig entfernt. Das Medium der apikalen Kammer wurde soweit entnommen, dass die Zellschicht mit Medium bedeckt blieb. Prinzipiell wurde stets darauf geachtet, dass die Zellschicht nicht trocken fiel. Nach dem Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen mit 0,1 M Cacodylatpuffer wurden die Zellen 15 Minuten mit 2 % Glutardialdehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer bei 4 °C fixiert und anschließend zweimal mit Waschpuffer (0,1 M Cacodylatpuffer und 0,2 M Saccharose) gewaschen. Eine anschließende einstündige Fixierung mit 1%-iger Osmiumtetroxid (OsO_4)-Lösung bei 4°C, führte zur optimalen Stabilität der zellulären Strukturelemente und somit zum Schutz der Zellen vor der chemisch-physikalischen Einwirkung während der Einbettung der Proben in Kunstharz. Gleichzeitig bewirkte die Fixierung der Zellen mit der elektronendichten OsO_4 -Lösung eine Vor-Kontrastierung der Proben, da OsO_4 besonders gut an die ungesättigten Fettsäuren der Zellmembranen bindet. Auf

diese Weise werden die Zellstrukturen bei deren Betrachtung im Elektronenmikroskop sichtbar.

Um die Zellen mit dem Ultramikrotom schneiden zu können, war es notwendig die Proben zuvor in Kunstharz einzubetten. Da sich das Einbettungsmittel nicht mit dem wässrigen Milieu in der Zelle vermischt, muss der Imprägnierung der Zellen mit dem Einbettungsmittel eine Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe vorangehen. Demzufolge wurden die PBCEC wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben in Ethanol mit aufsteigender Konzentration entwässert und anschließend die zellbewachsenen Filtermembranen aus der Filterhalterung ausgeschnitten. Da sich das in den Zellen befindliche Ethanol ebenfalls nicht mit dem Kunstharz mischt, wurden die Zellen in Propylenoxid inkubiert, das als `Vermittler` des Ethanols mit dem Kunstharz fungiert. Die Proben wurden zunächst 10 Minuten in ein 1:1 Propylenoxid-Ethanol-Gemisch überführt. Daraufhin wurden sie zweimal jeweils für 5 Minuten in reinem Propylenoxid inkubiert. Die Infiltration der Zellen mit Kunstharz erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur in einem 3:1 Propylen-Kunstharz-Gemisch. Durch ein nicht vollständiges Abdecken der Gefäße verdampfte ein Großteil des leicht flüchtigen Propylenoxids, so dass die Zellen am darauffolgenden Tag in reinem Kunstharz vorlagen und in die mit dem Harz gefüllten Einbettförmchen überführt werden konnten. Vor der Überführung der Proben in die Einbettformen wurde ein Tropfen Kunstharz auf einen gereinigten Objektträger gegeben, in den jeweils eine Filtermembran gelegt und 5 Minuten bei 60°C inkubiert wurde. Nach zweimaliger Wiederholung dieses Vorgangs wurden die einzelnen Proben abschließend in die Einbettformen mit vorgelegtem Kunstharz übertragen. Die Polymerisation des Harzes erfolgte 24-72 Stunden bei 60°C.

Nach der Aushärtung wurden die in Kunstharzblöckchen eingebetteten Proben aus ihrer Form entfernt und mit Hilfe einer sogenannten Trimmvorrichtung der Firma Zeiss des Typs 475057, in der eine Rasierklinge installiert war, eine trapezförmige Fläche herausgearbeitet, die für die Erstellung der Ultradünnschnitte nicht größer als 1 mm² sein sollte. Die vorbereiteten Blöckchen konnten danach in das Ultramikrotom des Typs *Ultracut E* (FA. Reichert Jung) eingeschraubt werden. Zunächst wurden mit selbst angefertigten Glasmessern Semidünnschnitte (1 µm) von der eingebetteten Probe hergestellt. Die zuvor mit einer Rasierklinge trapezförmig geschnittene Kunstharzoberfläche wurde auf diese Weise für die sich anschließenden Ultradünnschnitte, die mit dem Diamantmesser angefertigt wurden, geglättet. Die Semidünnschnitte wurden in dem mit Wasser gefüllten Trog, der sich direkt hinter der Schneidefläche befindet, aufgefangen und konnten mit Hilfe einer kleinen Drahtschlinge dem Trog entnommen werden. Danach wurden sie in einen Wassertropfen überführt, der zuvor auf einen mit Gelatine beschichteten Glasobjektträger gegeben wurde. Dieser wurde auf eine 70 °C warme Heizplatte gelegt, so dass die Schnitte langsam eintrockneten. Durch eine 2-minütige Inkubation der Schnitte mit Toluidinblau-Lösung auf der Heiz-

platte wurden die Zellen angefärbt, so dass die Semidünnschnitte im Lichtmikroskop betrachtet werden konnten, bevor die zeitaufwendigen Ultradünnschnitte der Präparate für die Analyse im Elektronenmikroskop angefertigt wurden.

Die Ultradünnschnitte (75 nm) wurden ebenfalls auf der Wasseroberfläche des hinter dem Diamantmesser befindlichen Trogs aufgefangen und auf selbsthergestellten mit Pioloform beschichteten Kupfernetzchen von der Wasseroberfläche gefischt. Die Schnitte auf den Kupfernetzchen wurden danach mit Uranylacetat in einem Kontrastiergerät der Firma Leica des Typs *EM Stain* nachkontrastiert.

Die Dokumentation erfolgte an einem Elektronenmikroskop des Typs EM109 (Fa. Zeiss) mit eingebauter Kamera (Fa. Leica). Als Filmmaterial dienten schwarz/weiß Großformatfilme der Firma Agfa des Typs *APX 100*.

Waschpuffer (pH 7,4)

Cacodylat	0,1 M
Saccharose	0,2 M

Kunstharzgemisch

Mischung A:

Epon 812 (Glyceridether 100):	31,0 ml
DDSA (Dodecenylnbern):	50,0 ml

Mischung B:

Epon 812 (Glycerid Ether 100)	50,0 ml
MNA (Methylololnadicnanhydrid)	42,5 ml

Mischung A und B (1: 1) + 1,5 Vol. % DMP 30

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)

Als Elektrophorese wird die Bewegung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld bezeichnet. Sie dient der Auftrennung von Molekülen aufgrund deren Ladung und Größe. Zur Auftrennung von Proteinen werden fast ausschließlich Polyacrylamid-Gele verwendet, die aus einem Polyacrylamid-Netz bestehen, das wiederum durch die radikalische Polymerisation von Acrylamid- und N, N'-Methylenbisacrylamid-Molekülen entsteht. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes werden die Proteine im Gel aufgetrennt. Dabei beeinflusst die angelegte Spannung, der Vernetzungsgrad des Gels, sowie der pH-Wert und die Ionenstärke des Mediums als auch die Moleküleigenschaften selbst (Ladung, Masse und Konformation), die Mobilität der Proteine im Gel.

Das bei der SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) zugesetzte anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein amphiphiles Molekül, das hydrophobe Wechselwirkungen sowie elektrostatische Bindungen zerstört, so dass die Proteine in denaturierter Form vorliegen. SDS überdeckt zudem die Eigenladung der Proteine, so dass deren Auftrennung im Gel ausschließlich aufgrund ihres Molekulargewichts erfolgt und nicht basierend auf den unterschiedlichen Ladungen der Proteine. Die Grundlage dieser Molekulargewichtsauftrennung basiert darauf, dass die meisten Polypeptide eine identische Menge an SDS pro Gramm Protein binden und deshalb dasselbe Ladung-zur-Masse-Verhältnis entsteht.

Die Proteinauftrennung erfolgte über eine SDS-PAGE nach Laemmli (1970) in einer Minigel-Apparatur der Firma Sigma Aldrich. Das diskontinuierliche Gelsystem der Größe 10 cm x 10 cm x 0.5 mm bestand aus einem 4%-igem (0.101% N,N'-methylbis(acrylamid)) Sammelgel (Breite: 3 cm) und einem 6-8%-igem (0.266% N,N'-methylbis(acrylamid)) Trenngel (Breite: 7 cm). Das maximale Füllvolumen der Probenaschen betrug 15 µl. Die in Probenpuffer suspendierten Zell-Lysate wurden durch Anlegen einer Spannung von 70 V (ca. 10 mA) im Sammelgel konzentriert und bei Erreichen des Trenngels mit 150 V (ca. 20 mA) aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte durch eine Lösung mit 25 mM Tris/192 mM Glycin (pH 8.3) und 0.1 % SDS als Laufpuffer.

Tabelle 2.3:

Pipettierschema der SDS-Gele

	10*10 cm ² Gele				20*20 cm ² Gele			
	Sammel- gel 4%	Trenngel			Sammel- gel 4,3%	Trenngel		
		6%	8%	10%		6,5%	8%	10%
H₂O (bidest.)	1,85	3,3	2,9	2,5	6,5	16	14,5	12,5
Sammelgel- puffer	0,75	-	-	-	2,5	-	-	-
Trenngel- puffer	-	1,5			-	7,5		
Polyacrylamid/ Bisacrylamid (30:0,8)	0,5	1,2	1,6	2	1,5	6,5	8,0	10
APS (10%ig)	20 µl				100 µl	300 µl		
TEMED	12 µl				12 µl			

APS: Ammoniumperoxodisulfat in bidest. H₂O; TEMED: Tetramethylethylendiamin.
(Angaben wenn nicht anders angegeben in ml).

Sammelgelpuffer (pH = 6,8)

TRIS/HCl	0,5 M
SDS	0,4% [w/v]

Trenngelpuffer (pH = 8,8)

TRIS/HCl	1,5 M
SDS	0,4% [w/v]

Acrylamid-Lösung

Polyacrylamid/ Bisacrylamid	(30:0,8)
-----------------------------	----------

Laufpuffer

TRIS	0,1 M
Glycin	0,1 M
SDS	0,1% [w/v]

Laemmli-Puffer (2x)

Sammelgelpuffer	5 ml
SDS	10% [w/v]
Glycerin	10% [v/v]
Bromphenolblau	0,005% [w/v]
Dithiothreitol	150 mM

Als Molmassenreferenz diente der *'biotinylated SDS molecular weight standard'* und der *'prestained SDS molecular weight marker'* von der Firma Sigma Aldrich, der verschiedene vorgefärbte Proteine enthält und durch deren Auftrennung der Verlauf der Elektrophorese sichtbar gemacht wurde.

'prestained SDS molecular weight marker'

α_2 -Macroglobulin	180 kDa
β -Galactosidase	116 kDa
Fructose-6-Phosphat Kinase	84 kDa
Pyruvate Kinase	58 kDa
Fumarase	48,5 kDa
Lactat Dehydrogenase	36,5 kDa
Triosephosphat Isomerase	26,6 kDa

biotinylated SDS molecular weight standard

α_2 -Macroglobulin	180 kDa
β -Galactosidase	116 kDa
Phosphorylase B	97,4 kDa
Phosphorylase B	97,4 kDa
Katalase	58,1 kDa
Alkohol Dehydrogenase	39,8 kDa
Carbon Anhydrase	29 kDa
Trypsin-Inhibitor	20,1 kDa
Lysozym	14,3 kDa
Aprotinin	6,5 kDa

2.3.1.1 Probenaufbereitung

Je nach Proteintyp und deren Lokalisation in der Zelle wird die Probenaufbereitung zur jeweiligen Analyse im Immunoblot unterschiedlich durchgeführt.

Zur Untersuchung der *tight junction*-assoziierten Proteine der PBCEC wurde wie folgt vorgegangen. Zunächst wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen entfernt und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS⁻ gewaschen. Anschließend wurde 1 ml des Protease-Inhibitor-Cocktails der Firma Boehringer Mannheim, gelöst in SPBS-Puffer (1 Tablette in 10 ml SPBS) in jeweils eine 75 cm² Kulturflasche gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber von ihrem Substrat gekratzt. Das Zellgemisch wurde 10 Minuten bei 400 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in 200 µl Protein-Inhibitor-Cocktail/ SPBS (s.o.) resuspendiert. Zum Aufschluss der Zellen wurde die Zellsuspension mit Hilfe eines *Potters* homogenisiert und zusätzlich mehrmals durch eine 26-gauge-Kanüle (Ø 45 x 25 mm) gepresst um die Zellen durch die Scherkräfte aufzuschließen. Zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts des Zell-Lysats wurde der Bradford-Assay (s. Kapitel 2.3.1.2) der Firma Biorad durchgeführt. Anschließend wurden die Proben in gleichem Volumenanteil in doppelt konzentriertem *Laemmli*-SDS-Probenpuffer (2 x SDS) aufgenommen. Um die DNA die dazu führt, dass die Proteine miteinander verkleben zu zerstören, wurden die Proben 3 Minuten bei 80°C erhitzt und mehrmals durch eine 26-gauge-Kanüle (Ø 45 x 25 mm) gepresst. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei -20 °C.

SPBS-Puffer

NaPi (pH 7,4)	50 mM
NaCl	0,32 M
Na-EDTA	1 mM

Na Pi (pH 7,4)

200 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	7,1196 g
mit H ₂ O bidest. auf 200 ml auffüllen	
200 mM NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	6,2404 g
mit H ₂ O bidest. auf 200 ml auffüllen	

beide Lösungen zusammengeben

2.3.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Da der Western-Blot dem quantitativen Vergleich eines ausgewählten Proteins dient, ist es zwingend notwendig in jede der Probenaschen die gleiche Menge an Gesamtprotein aufzutragen. Zu diesem Zweck wird vor der Suspension der Probe in SDS-Probenpuffer grundsätzlich eine Gesamtprotein-Bestimmung durchgeführt. Zur Bestim-

mung der Gesamtproteinmenge des Zell-Lysats der PBCEC erfolgte wurde der Bradford-Assay durchgeführt.

Zur Kalibrierung wurde Rinderserumalbumin in Konzentrationen zwischen 10 µg und 100 µg/ml eingesetzt. Jeweils 200 µl der Proteinlösung gelöst in H₂O bidest., wurden mit 800 µl des Proteinreagenz der Firma Biorad 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Extinktion der Proben bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Je 2, 4 und 6 µl der PBCEC-Proben mit unbekannter Proteinkonzentration wurden in 200 µl H₂O bidest. gegeben und mit 800 µl Proteinreagenz (Fa. Biorad) gemischt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei 595 nm gemessen. Als Kontrollwert diente ein proteinfreier Probenansatz, dessen Extinktion von dem Messwert der Proteinprobe subtrahiert wurde.

2.3.1.3 Proteinbestimmung nach (Lowry et al., 1951)

100 µl der Probenlösung (mit unbekanntem Proteingehalt) wurden mit 200 µl 20%-iger TCA-Lösung (*Trichloroacetic acid*, TCA) versetzt, geschüttelt und 5 Minuten auf Eis inkubiert, um die Proteine vollständig zu fällen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur und 14.000 x g wurde das Protein-Pellet in 100 µl NaOH (0,1 M) resuspendiert. Zu dieser Suspension wurde 1 ml der `Lösung C` (s. u) gegeben und nach mehrmaligem Schütteln 10 Minuten inkubiert. Darauf folgte die Zugabe von 100 µl der `Lösung D` (s. u). Nach Beendigung der Farbreaktion nach ca. 30 Minuten wurde die Absorption bei 560 nm vermessen. Zur Kalibration wurde Rinderserumalbumin in den Konzentrationen 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml und 0,5 mg/ml als Standard eingesetzt.

Lösung A: 2 % Na₂CO₃ [w/v]
 0,1 M NaOH

Lösung B: 1 % K-Na-Tartrat [w/v]
 0,5% CuSO₄ x 5H₂O [w/v]

Lösung C: Mischung von Lösung B + Lösung A
 im Verhältnis 1:50 bei Versuchsbeginn herstellen

Lösung D: Folin-Ciocalteus-Reagenz + H₂O (1:1)

2.3.2 Immunoblot

2.3.2.1 Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulose (Western Blot)

Der elektrophoretische Transfer der SDS-PAGE-separierten Proteine auf Nitrocellulose (0.45 µm) (*westernblotting*) wurde in einer *semidry-blotting*-Kammer der Firma Sigma Aldrich durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zunächst 15 Minuten in Transferpuffer inkubiert. In der *blotting*-Kammer wurde das Gel auf die der Größe des Gels entsprechende Nitrocellulosemembran gelegt und von oben und unten in jeweils drei Lagen *Whatman*-Papier eingebettet. Zuvor wurde sowohl das *Whatman*-Papier, als auch die Membran mit Transferpuffer getränkt (*semidry*-Verfahren) und durch vorsichtiges Andrücken mit einem Glasstab von Luftblasen befreit. Durch das Anlegen einer Stromstärke von 0,5 mA/cm² erfolgte der Proteintransfer aus dem Gel von der Kathodenseite auf die Nitrocellulosemembran der Anodenseite über Nacht bei Raumtemperatur. Der Transfer wurde durch eine reversible Proteinfärbung (Ponceau-S: 2 g/l in 3 % TCA) überprüft. Zu diesem Zweck wurde die Membran 10 Minuten in der Ponceau-S-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Der überschüssige Farbstoff wurde durch H₂O dest. entfernt und blieb nur an den Proteinbanden haften. Da Ponceau-S mit den hydrophoben Bereichen der Proteine in Wechselwirkung tritt, ist es zur Anfärbung nahezu aller Proteine geeignet. Nach der Detektion der Proteinbanden wurde der Farbstoff durch weiteres Spülen mit H₂O dest. vollständig von der Membran entfernt.

Transfer-Puffer (pH = 8,3)

TRIS	20 mM
Glycin	150 mM
SDS	0,1% [w/v]
Methanol	20% [w/v]

Ponceau-S-Lösung

Ponceau-S	2 g/l
Trichloressigsäure	3 %

2.3.2.2 Western Blot

Die Quantifizierung der Expressionsrate der *tight junction*-assoziierten Proteine ZO-1, Occludin und Claudin-5 der PBCEC unter verschiedenen Bedingungen erfolgte mit Hilfe des Western-Blot Verfahrens.

Zunächst wurden die Proteine, wie in Kapitel 2.3.2.1 beschrieben, von dem Polyacrylamidgel durch Elektroblothing auf die Nitrocellulose übertragen. Auf diese Weise wurden sie zur Detektion durch die spezifischen Antikörper zugänglich. Vor der Inkubation der Membran in der Antikörper-Lösung wurde die Nitrocellulosemembran zur Absättigung ihrer positiven Ladungen und der unspezifischen Bindungsstellen der Proteine mit einer 5 %-igen Milchpulverlösung in TBST-Puffer 30 Minuten inkubiert. Darauf folgte eine 1,5-stündige Inkubation bei Raumtemperatur in der jeweiligen Erst-Antikörper-Lösung in 0,5 % Milchpulver-TBS-Puffer (Antikörper-Konzentrationen: s. u.). Nach anschließendem dreimaligen Waschen mit 5 % Milchpulver-TBST-Puffer für jeweils 10 Minuten wurden die Nitrocelluloseblots mit einem Anti-Rabbit IgG-Peroxidase (bei Einsatz des Erst-Antikörpers Anti-Claudin-5 und Anti-Occludin) oder einem Anti-Rat IgG-Peroxidase (bei Verwendung des Erst-Antikörpers Anti-ZO-1) gekoppelten Zweit-Antikörper (Konzentration s. u.) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daran anschließend wurde die Membran erneut jeweils dreimal 10 Minuten mit 0,5 % Milchpulver-TBST-Puffer gewaschen. Zur Entfernung des Milchpulvers wurde die Membran zweimal 10 Minuten mit TBST-Puffer gespült, bevor die Nachweisreaktion des jeweiligen Proteins erfolgte.

Nachdem die *tight junction*-assoziierten Proteine nachgewiesen wurden (s. u.: Nachweis der Antikörperreaktion), wurden die Antikörper durch eine einstündige Inkubation in *stripping*-Puffer bei Raumtemperatur unter leichter Rotation von der Membran gewaschen und ein Vimentin-Nachweis angeschlossen. Vimentin ist ein Protein der extrazellulären Matrix, das unter verschiedenen Kulturbedingungen der PBCEC auf gleichem Niveau exprimiert wird, so dass dadurch ein sichtbarer Vergleich der Auftragsmenge des Gesamtproteingehalts in die Geltaschen als zusätzliche Kontrolle zur Gesamtproteinbestimmung ermöglicht wurde.

Die Vorgehensweise des Vimentin-Nachweis war identisch mit derjenigen des Nachwises der *tight junction*-assoziierten Proteine. Die Antikörper-Konzentrationen sind im Anhang angegeben.

Nachweis der Antikörperreaktion:

Als Nachweissystem der Antikörperreaktion diente das *ECLTM (enhanced chemiluminescence)-`Western Blotting Detection System`* der Firma Amersham. Dieses Reagenz enthält Luminol und Wasserstoffperoxid. Die an den Zweit-Antikörper gebundene Peroxidase reduziert das Wasserstoffperoxid und oxidiert dabei das Luminol. Kurz nach der Oxidation befindet sich das Luminol im angeregten Zustand und emittiert beim Übergang in den Grundzustand das Licht, welches auf einem *`ECL High Performance Luminescence Detection[®]`*-Film visualisiert wird.

Der mit dem Erst- und jeweiligen Peroxidase-gekoppelten Zweit-Antikörper behandelte Nitrocelluloseblot wurde eine Minute mit 1 ml Nachweisreagenz (500 µl Komponente I + 500 µl Komponente II) gespült und auf einer Glasplatte mit transparenter Folie überzogen, die nach ca. 5-minütiger Einwirkzeit zur Visualisierung der Proteinbanden auf den *ECL High Performance Luminescence Detection* Film gelegt wurde

Nachweis des Molekulargewicht-Standards:

Der biotinylierte Molekulargewichtsstandard wurde zusammen mit den PBCEC-Proben in einer Konzentration von 0,1 µg/Geltasche auf das Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch zusammen mit den Proben aufgetrennt. Nachdem die Nachweisreaktion der jeweiligen spezifischen Proteine abgeschlossen war, wurde die Membran 10 Minuten in TBST-Puffer gespült und erneut zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen dreimal für jeweils 10 Minuten mit einem 5 %-igen Milchpulver-TBST-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die 30-minütige Markierung des biotinylierten Standards mit einer Streptavidin-gekoppelten Peroxidase (Stocklösung: 0.5 µg/µl) in einer Verdünnung von 1:20000 bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden die Blots erneut dreimal 10 Minuten mit einem 0.5 %-igen Milchpulver-TBST-Puffer gewaschen und zur Entfernung des Milchpulvers zweimal 10 Minuten mit einem TBST-Puffer gespült. Die Visualisierung der Antikörper-markierten Proteine erfolgte, wie bereits beschrieben, durch das *ECLTM-Western Blotting Detection System*.

TBST-Puffer

TRIS/HCL (pH 8,0)	10 mM
NaCl	150 mM
<i>Tween 20</i>	0,05 %

`Strippen` der Nitrocellulose-Membran

Durch das sogenannte `strippen` der Nitrocellulose-Membran werden die Antikörper von der Membran gespült, ohne gleichzeitig die Proteine mit zu entfernen. Auf diese Weise ist es möglich, die Nitrocellulose-Membran nochmals einer Antikörper-Detektion zu unterziehen.

Zur Entfernung der Antikörper wurde die Membran 90 Minuten bei Raumtemperatur in `stripping`-Puffer inkubiert und anschließend 3 mal mit TBS (ohne *Tween 20*) jeweils 10 Minuten gewaschen, bevor die Membran für den folgenden Antikörper-Nachweis verwendet werden konnte.

Stripping-Puffer

Glycin	2 M, Ph 2,2
SDS	0,1 % [w/v]
Tween 20	1 % [v/v]

2.3.3 Immunzytochemische Methoden

Zur immunzytochemischen Analyse der Proteine ZO-1, Occludin und Claudin-5 sowie des E-Selektins wurden die cerebralen Kapillarendothelzellen auf Transwell®-Filtersystemen (\varnothing 1,13 cm²) kultiviert. Der immunzytochemische Nachweis der jeweiligen Proteine der PBCEC erfolgte grundsätzlich nach der Bestimmung des TERs (transendothelialer Widerstand) am 7. DIV. Zunächst wurden die Zellen durch zweimaliges Waschen mit je 500 μ l PBS⁻ von ihrem Kulturmedium befreit, worauf die Fixierung und/oder Permeabilisierung der Zellen folgte, die für den jeweils verwendeten Antikörper individuell optimiert wurde. Folgende Fixierungen beziehungsweise Permeabilisierung der PBCEC wurden durchgeführt:

ZO-1, Occludin und Claudin-5:

Die Fixierung und Permeabilisierung durch eine 5-minütige Inkubation mit Ethanol/Eisessig (97:3) bei -20°C wurde gleichzeitig durchgeführt.

Nach der Fixierung bzw. Permeabilisierung wurden die Zellen fünfmal mit jeweils 500 μ l PBS⁻ /Filter gewaschen und anschließend dreimal mit je 300 μ l/Filter 3 %-igem Ziegen Serum in PBS⁻ zur Absättigung der unspezifischer Bindungsstellen gespült. Darauf erfolgte eine 30-minütige Inkubation der PBCEC bei 37°C mit je 200 μ l 3 %-igem Ziegen Serum in PBS⁻ mit Zusatz von 0,1 % Triton-X-100 je Filter, was ebenfalls der Absättigung der unspezifischer Bindungsstellen diente und gleichzeitig eine Permeabilisierung der Zellmembran verursachte. Anschließend wurden die PBCEC zweimal mit PBS⁻ gewaschen und mit dem jeweiligem Erst-Antikörper-Gemisch aus 0,5 % Ziegen Serum in PBS⁻ überschichtet (120 μ l/Filter). Im Anschluss daran wurden die Kulturen jeweils dreimal 10 Minuten bei Raumtemperatur mit je 200 μ l/Filter mit 3 %-igem Ziegen Serum in PBS⁻ mit Zusatz von 0,1 % Triton-X-100 gewaschen. Vor der 30-minütigen Inkubation bei 37°C mit dem Fluoreszenz-markierten Zweit-Antikörper (s. u. und Tabelle A 2) erfolgte eine weitere Absättigung mit 3 %-igem Ziegen Serum in PBS⁻ (20 Minuten bei 37°C).

E-Selektin:

Die Fixierung der PBCEC in 4 %-iger Paraformaldehyd/PBS⁻-Lösung bei Raumtemperatur erfolgte erst nach der 5-minütigen Inkubation der PBCEC mit dem E-Selektin-Antikörper. Allerdings wurden die Endothelzellen vor der Inkubation mit dem E-Selektin mit eiskaltem PBS⁻ gewaschen, was einer geringfügigen Fixierung entsprach. Eine Permeabilisierung der PBCEC war nicht nötig, da sich das Epitop des E-Selektins auf der Zelloberfläche befindet.

Die Inkubation des Erst-Antikörpers (120 µl/Filter) erfolgte über Nacht bei 4°C in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre in 0,5 % Ziegen Serum/PBS⁻ (Antikörper-Konzentration: s. u. und Anhang), nachdem die unspezifischen Bindungsstellen durch eine 30-minütige Inkubation mit 3 %-igem Ziegen Serum (200 µl/Filter) in PBS⁻ ohne Zusatz von Triton-X-100 abgesättigt wurden. Nach 24 Stunden wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS⁻ durch 4 % Paraformaldehyd in PBS⁻ 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und erneut 5 mal gewaschen. Vor der 30-minütigen Inkubation bei 37°C mit dem Fluoreszenz-markierten Zweit-Antikörper erfolgte eine weitere Absättigung mit 3 %-igem Ziegen Serum in PBS⁻ (20 Minuten bei 37°C). Die verschiedenen Zweit-Antikörper wurden in 0,5 %-igem Ziegen Serum/ PBS⁻ verdünnt. Die eingesetzten Endkonzentrationen ist unten aufgeführt und in der Antikörper-Tabelle (s. Anhang) ersichtlich.

Die Kontrollexperimente sowohl der *tight junction*-assoziierten Proteine als auch des E-Selektins, die dem Nachweis unspezifischer Fluoreszenzfärbung des sekundären Antikörper dienten, wurden in Abwesenheit des jeweiligen primären Antikörpers durchgeführt.

Eingesetzte Erst-Antikörper:

Anti-ZO-1 (monoclonal aus Ratte):	2 µg/ml
Anti-Occludin: (polyclonal aus Kaninchen)	µg/ml
Anti-Claudin-5: (monoclonal aus Kaninchen)	5 µg/ml
Anti-E-Selektin: (monoclonal aus Maus)	1 µg/ml

Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte je nach Erst-Antikörper durch folgende Fluoreszenzmarkierte Zweit-Antikörper:

Eingesetzte Zweit-Antikörper:-

Ziege-Anti-Ratte-IgG (Alexa-Fluor [®] 488 (rot) oder 568 (grün))	2 µg/ml
Ziege-Anti-Maus-IgG (Alexa-Fluor [®] 488 (rot) oder 568 (grün))	2 µg/ml
Ziege-Anti-Kaninchen-IgG (Alexa-Fluor [®] 568 (grün))	2 µg/ml

Nach der Inkubation mit dem jeweiligen Zweit-Antikörper wurden die PBCEC dreimal mit je 500 µl PBS⁻/Filter gewaschen, die einzelnen Filtermembranen mit Hilfe eines Skalpellens aus der Filterhalterung herausgetrennt, auf einem Glasobjektträger mit einem speziell für die Fluoreszenzmikroskopie entwickelten Einbettmedium (*H₂O-Poly/Mount*, Fa. Polysciences) eingebettet und durch Auflegen eines Deckglases versiegelt. Vor der Untersuchung mit dem Laserscanning-Mikroskop (LSM), war es notwendig das Einbettmedium mit den Proben über Nacht bei Raumtemperatur aushärten zu lassen.

Die Analyse der Immunfluoreszenzen erfolgte am LSM des Typs TCM (Fa. Leica in Kombination mit den für die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe entsprechenden Anregungsfiltren. Die Bilderstellung erfolgte digital mit der entsprechenden Software der Firma Leica.

2.3.4 Enzymbiochemische Methoden

2.3.4.1 Bestimmung der Caspase-3-Aktivität

Zur Messung der Enzymaktivität der Caspase-3 wurde das *CaspACETM Assay System `Fluorometric`* der Firma Promega verwendet. Hierbei wurde dem nach der Lyse erhaltenen Zellextrakt das Substrat Ac-DEVD-AMC zugesetzt. Dieses besteht aus der für Caspase-3 spezifischen Spaltungssequenz DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) und dem Fluorochrom AMC (7-Amino-4-Methylcoumarin). Das Substrat erzeugt unter Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 360 nm eine blaue Fluoreszenz. Die Caspase-3 setzt AMC durch Spaltung frei, welches unter den gleichen Bedingungen gelb-grün fluoresziert. Diese gelb-grüne Fluoreszenz ist proportional zur der Caspase-3-Aktivität im Zellextrakt und wird bei einer Emissionswellenlänge von 460 nm gemessen. Um die ausschließliche Bestimmung der Caspase-3-Aktivität zu gewährleisten, wurde als Negativkontrolle der Zellextrakt vor Zusatz des Substrates mit Ac-DEVD-CHO inkubiert. Ac-DEVD-CHO ist ein kompetitiver Inhibitor der Caspase-3, der gebunden wird, aber aufgrund seiner Aldehydfunktion nicht gespalten werden kann.

Vor der Durchführung des Assays wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Zell-Lysis-Puffer versetzt. Die eigentliche Lyse der Zellen erfolgte durch viermaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen bei 37°C. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 14000 x g und 5°C wurden die Überstände der Probe abgenommen. 100 µl dieses Überstandes wurden für die Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) (s. Kapitel 2.3.1.2) eingesetzt, die restliche Lösung wurde bei der Durchführung des *CaspACETM Assay Systems* verwendet. Das Pipettierschema ist in Tabelle 2.4 dargestellt.

Die Proben wurden anschließend eine Stunde bei 37°C mit dem Substrat inkubiert. Bei der Negativkontrolle erfolgte eine Vorinkubation mit dem Inhibitor für 30 Minuten bei 37°C. Die Fluoreszenz der Proben wurde bei einer Excitationswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm gemessen. Bei den gesamten Proben wurde die Fluoreszenz dreifach bestimmt. Für jede Kulturbedingung wurden außerdem mindestens zwei Zellextrakte vermessen.

Tabelle 2.4:

Pipettierschema für die bei dem CaspACE™ Assay System eingesetzten Lösungen.

Lösung	Volumen [µl]	Volumen [µl]	Volumen [µl]
	(Probe)	(Negativkontrolle)	(blank)
Assay-Puffer	37	37	37
100mM DTT	10	10	10
Zell-Lyse-Puffer	/	/	54
Zellextrakt	54	54	/
2,5mM Inhibitor	/	2	/
2,5mM Substrat	2	2	2

DT = Dithiothreitol

Zell-Lysis-Puffer

HEPES (pH 7,5)	25 mM
MgCl ₂ x 6H ₂ O	5 mM
EDTA	5 mM
DTT	5mM
Protease-Inhibitor-Cocktail (<i>complete</i> ® -Tablette)	

Die Berechnung der Caspase-3-Aktivität erfolgte aus den gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI) anhand der folgenden Formel:

$$\text{Aktivität (Caspase - 3)} = \frac{\overline{RFI}_{(Probe)} - \overline{RFI}_{(blank)}}{\text{Inkubationszeit} \cdot m_{\text{Protein}} \cdot X \cdot \text{Vol}_{\text{Probe}}} \left[\frac{\text{pmol}}{\mu\text{g} \cdot \text{min}} \right]$$

Dabei ist

$\overline{RFI}_{(Probe)}$: der Mittelwert der RFI der Probe (n = 3)

$\overline{RFI}_{(blank)}$: der Mittelwert der RFI des blanks (n = 3)

Inkubationszeit: die Zeit zwischen Zugabe des Substrates und der Messung in min.

m_{Protein} : die Masse an Protein in der Probe in μg

X: Steigung der Kalibrationsgeraden der AMC-Fluoreszenz in nM^{-1} (siehe Abbildung 2.1).

$\text{Vol}_{(Probe)}$: Volumen der eingesetzten Probenlösung (54 μl)

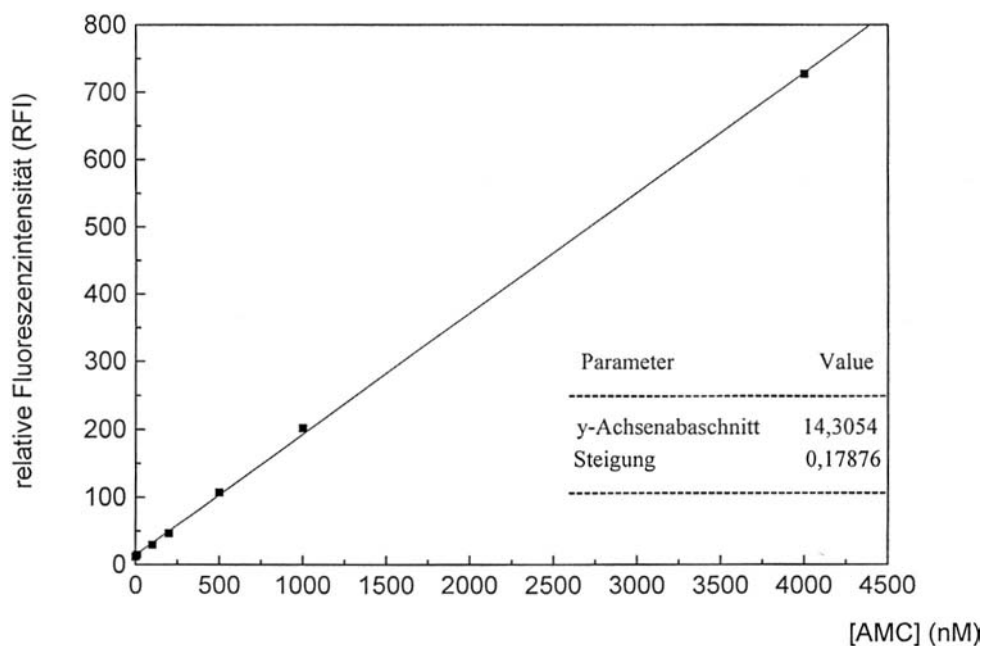


Abb. 2.1:

RFI als Funktion der AMC-Konzentration. Kalibration zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität (Mittelwerte, n=3)

2.3.4.2 Bestimmung der Matrixmetalloproteasen (Zymographie)

Zum Nachweis der Matrixmetalloproteasen (MMPs) wurde eine sogenannte Zymographie durchgeführt. Wie schon bei der SDS-Page beschrieben (s. Kapitel 2.3.1), werden die Proben zur Durchführung der Zymographie ebenso auf ein Gel aufgetragen und die Proteine in einem angelegten Spannungsfeld aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülgröße aufgetrennt.

Im Unterschied zum Immunoblot mit vorangehender Elektrophorese wird bei der Zymographie nicht die Quantität eines speziellen Proteins bestimmt, sondern die Aktivität eines Enzyms. Da jedoch in jede Geltasche die gleiche Probenmenge gegeben wird, ist je nach Ausprägung der nachgewiesenen Bande im Gel ein semiquantitativer Vergleich der Proben untereinander möglich. Die Grundlage der Zymographie ist der enzymatische Abbau der im Trenngel enthaltenen Gelatine durch die unterschiedlichen Matrixmetalloproteasen, die je nach Molekülgröße mit entsprechender Laufstrecke durch Renaturierung, Entwicklung, Färbung und Entfärbung des Gels durch helle Banden auf blauem Hintergrund sichtbar gemacht wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Matrixmetalloproteasen der unter entzündlichen Bedingungen konditionierten Medien der PBCEC, bzw. nach deren Interaktion mit den neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen konditionierten Medien der Endothelzellen und Neutrophilen direkt in die Probenaschen des Gels aufgetragen. Im Einzelnen wurde die Zymographie folgendermaßen durchgeführt:

Zunächst wurde ein 10 %-iges Trenngel, in welches 0,1 % Gelatine co-polymerisiert wurde, mit einem 4 %-igem Sammelgel innerhalb einer Glasplatten-Apparatur überschichtet und in einer Minigel-Apparatur der Firma Sigma Aldrich installiert. Die Proben wurden im Verhältnis von 1:1 mit nicht reduzierendem zweifach konzentriertem Probenpuffer gemischt und jeweils 10 µl in jede Geltasche gefüllt. Als Molekulargewichtsmarker wurde ein HMW-Marker der Firma Amersham und ein vorgefärbter Marker (7B) der Firma Sigma Aldrich verwendet, der im Gel als dunkelblaue Banden deutlich erkennbar war. Weiterhin wurde eine MMP-Positivkontrolle (Fa. Sigma Aldrich) aufgetragen, die die zu erwartenden Matrixmetalloproteasen enthielt und zur Kontrolle der nachgewiesenen MMPs der konditionierten Medien diente.

Die das Gel enthaltenen Glasplatten wurden in der mit Laufpuffer gefüllten Apparatur installiert und eine Spannung angelegt. Die angelegte Spannung betrug für das Sammelgel 60 V und wurde, nachdem die Proben das Trenngel erreichten, auf 120 V erhöht. Nachdem der Gel-Lauf beendet war, wurde das Gel zweimal jeweils 30 Minuten in 50 ml Renaturierungspuffer unter leichter Rotation inkubiert. Das im Renaturierungspuffer enthaltene nichtionische Detergenz Triton-X 100 entfernt das SDS aus dem Gel, so dass die MMPs renaturieren und ihre aktive Struktur zurückerlangen. Die sich anschließende Entwicklung erfolgte über Nacht bei 37°C in 75 ml Entwick-

lungspuffer. Dieser enthält u. a. Calcium-Ionen, die die MMPs als Co-Faktoren zum Abbau der im Gel vorhandenen co-polymerisierten Gelatine benötigen. Durch eine anschließende Fixierung in einer Methanol/Eisessig-Lösung wurden die Proteine denaturiert und somit im Gel fixiert. Darauf folgend wurde das Gel in einer *Coomassie Brilliant Blue*-Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Da das Gel durch die enthaltene Gelatine nach der Färbung gleichmäßig blau gefärbt war, wurde es in zwei Schritten vorsichtig mit einer Methanol/Eisessig-Lösung entfärbt, bis die Enzymbanden durchsichtig-farblos erschienen und der blaue Kontrast des Hintergrunds weiterhin erhalten blieb. Das Gel mit den nachgewiesenen MMPs wurde abschließend zur Dokumentation konserviert, indem es für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einem Methanol/Glycerin-Gemisch inkubiert und schließlich zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet wurde.

Die zymographische Detektion der MMPs wurde freundlicherweise von Frau C. Lohmann, Institut für Biochemie (WWU-Muenster) durchgeführt.

Trenngel 10% / 0,1% Gelatine

Acrylamid 30%	2,0 ml
Trenngelpuffer	1,76 ml
Gelatine 1% in MilliQ (aus Schweinehaut)	0,6 ml
H ₂ O bidest	1,64 ml
TEMED und APS (10%)	15 µl

Sammelgel (4%) ohne Gelatine

Acrylamid 30%	400 µl
Sammelgelpuffer	780 µl
H ₂ O bidest	1,82 ml
TEMED und APS (10%)	15 µl

Sammelgelpuffer (pH = 6,8)

TRIS/HCl	0,5 M
SDS	0,4 % [w/v]

Trenngelpuffer (pH = 8,8)

TRIS/HCl	1,5 M
SDS	0,4 % [w/v]

Acrylamid-Lösung 30 %

Polyacrylamid / Bisacrylamid (30 : 0,8)

Laufpuffer (1x)

TRIS 25 mM
Glycin 192 mM
SDS 0,1% [w/v]
H₂O bidest. ad 1000 ml

Probenpuffer (2x) , pH 6,8

TRIS-HCL 126 mM
Glycerol 20% [w/v]
SDS 4 % [w/v]
EDTA 2 mM
Bromphenolblau 4-5 Körner
H₂O bidest. ad 10ml

Renaturierungspuffer (1x)

Triton-X 100 2,7 g
H₂O bidest ad 100g

Entwicklungspuffer (1x) pH 7,5

TRIS/HCL 50 mM
NaCl 200 mM
CaCl₂ x 2 H₂O 5 mM
Brij 35 0,02 % [v/w]
H₂O bidest. ad 50 ml

Vorfixierer

Methanol 50 % [v/w]
Eisessig 10 % [v/w]
H₂O bidest. 40 % [v/w]

Färbelösung

Isopropanol		25 % [v/w]
Eisessig		10 % [v/w]
Coomassie BB		0,25% [v/w]
H ₂ O bidest.	500 ml	

Entfärber 1 und 2

Methanol		50 % [v/w]/10 % [v/w]
Eisessig		10 % [v/w] / 10 % [v/w]
H ₂ O bidest		40 % [v/w]/ 80 % [v/w]

GelDry Solution

Methanol		20 %
Glycerin		2 %
H ₂ O bidest.		78 %

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 `DNA-Ladder`

2.4.1.1 Isolierung der DNA

Die Isolierung der DNA aus den cerebralen Kapillarendothelzellen des Schweins erfolgte nach einer modifizierten Methode von Herrmann et al. (1994). Der Vorteil dieser modifizierten Methode lag vor allem in der Vermeidung giftiger organischer Lösungsmittel.

Zunächst wurden die Zellen mit PBS⁻ gewaschen und mit Hilfe eines Zellschabers in 1 ml PBS⁻ von der Petrischale abgelöst. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 200 x g wurde das Zellpellet in 90 µl Lysispuffer resuspendiert. Nach einer weiteren 5-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 1600 x g wurde der Überstand gesammelt und die Extraktion mit dem identischen Volumen des Lysispuffers wiederholt. Die vereinigten Überstände, sowie die in 180 µl PBS⁻ resuspendierten Pellets wurden mit 20 µl einer 10 %-igen [w/v] SDS-Lösung versetzt. Zur Beseitigung der RNA, wurden die Suspensionen mit RNase A (Endkonzentration 5 µg/µl) versetzt und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Darauf folgte ein zweistündiger enzymatischer Abbau der Proteine mit Proteinase K (Endkonzentration 2,5 µg/µl) bei 56°C. Die Fällung der DNA wurde durch Zusatz von 150 µl 10 M Ammoniumacetat und 1,25 ml 100 %-igem, eiskalten Ethanol und 30-minütiger Inkubation bei -70°C erreicht. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 12.000 x g wurde das DNA-Pellet mit 1 ml 80 %-igem, eiskalten Ethanol gewaschen und erneut 15 Minuten bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet und in 10 µl 0,5 x TAE-Puffer (Tris-acetat-EDTA-Puffer) resuspendiert. Die Proben wurden daraufhin einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen.

Lysis-Puffer

Tris/HCl (pH 7,5)	50 mM
EDTA	20 mM
NP-40	
H ₂ O bidest.	

2.4.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese werden Nucleinsäuren aufgrund ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Zu diesem Zweck wurde ein Gel aus 1 %-iger Agarose-Lösung mit 0,5 x TAE-Puffer (50 µl) und 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hergestellt

und in eine Gelkammer gegossen. Die vorbereiteten Proben (s. Kapitel 2.4.1) wurden mit 2 µl Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 5 V/cm². Die DNA-Fragmente wurden nach der Interkalierung des Ethidiumbromids durch UV-Licht-Bestrahlung der Wellenlänge von 302 nm visualisiert.

Ladepuffer

Xylencyanol	0,25 % [w/v]
Bromphenolblau	0,25 % [w/v]
Ficoll	15 % [w/v]
TAE-Puffer	

2.4.1.3 Detektion der DNA-Fragmente

Zur Detektion der DNA-Fragmente wurde der *Cell Death Detection ELISA^{Plus}* der Firma Roche verwendet.

Die Zellen wurden zunächst auf 10 cm² Petrischalen zweimal mit PBS⁻ gewaschen und in 1 ml PBS⁻ abgeschabt. Von dieser Zellsuspension wurden zweimal 165 µl (ca. 5 x 10⁴ Zellen) entnommen und jeweils mit 835 µl Lysispuffer 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 10°C und 200 x g. Jeweils 20 µl des Überstands wurden entnommen und in eine mit Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte überführt und mit 80 µl/well Immunoreagenz (Gemisch aus Anti-Histon-Biotin- und Anti-DNA-POD-Antikörpern) zwei Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Anti-Histon-Biotin-Antikörper bindet gleichzeitig an die Mikrotiterplatte und die Histon-Komponente der Nucleosomen, wohingegen der Anti-DNA-POD-Antikörper mit der DNA-Komponente der Nucleosomen kreuzreagiert. Nach der Inkubation mit dem Immunoreagenz wurde jedes well der Mikrotiterplatte jeweils dreimal gewaschen. Durch dreimaliges Waschen mit 200 µl/well Inkubationspuffer wurden die überschüssigen Antikörper entfernt und die Proben mit 100 µl/well einer POD-Substrat-Lösung (2,2-Acinobis[3-ethylbenzthiazoline-sulfonic acid], ABTS) 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm (Referenz = 492nm) mit dem ELISA-Reader vermessen. Als Positivkontrolle diente eine vom Hersteller mitgelieferte DNA-Histon-Komplex-Lösung.

2.5 Biophysikalische Methoden

2.5.1 Grundlagen der Impedanzspektroskopie

2.5.1.1 Der transendotheliale elektrische Widerstand

Der elektrische Widerstand einer Endothelzellschicht stellt eine empfindliche und gut zugängliche Messgröße für die Barriereigenschaften des Endothels dar. Der transendotheliale elektrische Widerstand (TER) korreliert dabei nach (Schneeberger and Lynch, 1992) reziprok mit der Permeabilität der Endothelzellschicht gegenüber anorganischen Ionen. Die Zusammenhänge zwischen dem elektrischen Widerstand einer Zellschicht und ihrer Barrierefunktion können anschaulicher für eine Gleichstrommessung dargestellt werden. Zur Interpretation der verschiedenen Mess-Parameter dient ein Ersatzschaltbild nach (Powell, 1981), welches die Endothelzellschicht als eine Anordnung Ohmscher Widerstände beschreibt (s. Abb. 2.2). Dabei setzt sich der Gesamtwiderstand (TER) aus einem transzellulären Widerstand R_{trans} , der den Widerstand der apikalen Plasmamembran (R_a), des Zytoplasmas (R_{cyt}) und der basolateralen Plasmamembran (R_b) beinhaltet, sowie aus einem parazellulären Widerstand R_{para} , der den Widerstand der *tight junctions* (R_{tj}) und des Interzellulärspaltes (R_{ics}) beschreibt, zusammen.

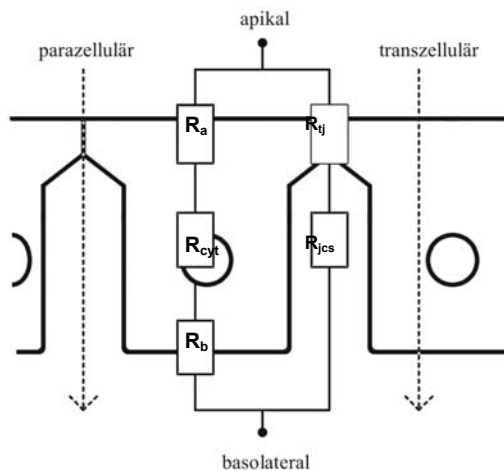


Abb. 2.2:

Ersatzschaltbild einer Endothelzellschicht nach Powell (1981).

R_a = Widerstand der apikalen Zellmembran, R_{cyt} = Widerstand des Cytoplasmas, R_b = Widerstand der basolateralen Zellmembran, R_{tj} = Widerstand der *tight junctions*, R_{ics} = Widerstand des Interzellulärspalts.

Für den transzellulären Widerstand gilt: $R_{trans} = R_a + R_{cyt} + R_b$.

Für den parazellulären Widerstand gilt: $R_{para} = R_{tj} + R_{ics}$.

Für den transendothelialen elektrischen Widerstand gilt:

$$\frac{1}{TER} = \frac{1}{R_{trans}} + \frac{1}{R_{para}}$$

Bei dichten Zellschichten mit sehr hohem TER setzt sich dieser aus einem transzellulären und einem parazellulären Widerstand zusammen. Ein niedrigerer TER wird dagegen maßgeblich durch den parazellulären Widerstand, d. h. durch eine erhöhte parazelluläre Leckpermeabilität (Leitfähigkeit) bestimmt (Fromter & Diamond, 1972).

2.5.1.2 Physikalische Grundlagen

Der Einsatz der Impedanzspektroskopie zur Messung des TERs bietet gegenüber einer Gleichstrommessung den Vorteil einer hohen Messgenauigkeit und Reproduzierbarkeit unabhängig vom Widerstand des apikalen und basolateralen Mediums. Durch die Verwendung von Wechselspannungen kleiner Amplitude ist die transendotheliale Widerstandsmessung für die Zellen nicht invasiv und beeinflusst ihren elektrischen Zustand kaum. Weiterhin lassen sich durch dieses Verfahren auch oberflächenspezifische Parameter, wie etwa die Kapazität einer Zellschicht bestimmen.

Die Impedanzspektroskopie basiert auf der Bestimmung des elektrischen Widerstands als Funktion der Frequenz einer als Erregersignal dienenden sinusförmigen Wechselspannung kleiner Amplitude und definierter Frequenz. Die Frequenz wird dabei von 1 Hz - 10^6 Hz kontinuierlich variiert (*continuous wave*-Verfahren). Die entsprechenden Impedanzen werden bei jeder Frequenz separat bestimmt und in einem Impedanzspektrum zusammengetragen.

Der Wechselstromwiderstand, der auch als Impedanz $Z(\omega)$ bezeichnet wird, ist charakterisiert durch seinen Betrag $|Z|$ und der Phasenverschiebung φ zwischen Spannung und Strom. Zur Vereinfachung von Rechenoperationen lässt sich die Impedanz als komplexe Größe in Abhängigkeit von der Wechselspannung und vom Wechselstrom darstellen (Gleichungen 2.1 bis 2.3):

Für die Wechselspannung $U(t)$ gilt bei einer Frequenz ω :

$$U(t) = U_0 e^{i\omega t} \quad \text{(Gl. 2.1)}$$

$U(t)$ = Momentanwert der Spannung

U_0 = Spannungsamplitude

ω = Kreisfrequenz ($2\pi f$)

t = Zeit

$i = \sqrt{-1}$

Für den Wechselstrom $I(t)$ gilt:

$$I(t) = I_0 e^{i(\omega t - \varphi)} \quad (\text{Gl. 2.2})$$

$I(t)$ = Momentanwert der Stromstärke

I_0 = Stromamplitude

φ = Phasenverschiebung zwischen Spannung $U(t)$ und Stromstärke $I(t)$

Die Impedanz $Z(\omega)$ lässt sich mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes wie folgt berechnen:

$$Z(\omega) = \frac{U(t)}{I(t)} = \frac{U_0}{I_0} e^{i\varphi} = |Z| e^{i\varphi} \quad (\text{Gl. 2.3})$$

Als messbare Parameter der Impedanz $Z(\omega)$ wird der Betrag der Impedanz $|Z|$ sowie die Phasenverschiebung φ bestimmt.

Komplexe Größen lassen sich am besten als Vektor in einer Gausschen Zahlenebene darstellen, in welcher der Realteil auf der Abszisse und der Imaginärteil auf der Ordinate aufgetragen wird. Dabei entspricht der Betrag der Impedanz $|Z|$ der Länge des Vektors, während sich die Phasenverschiebung φ in dem Winkel zwischen Vektor und realer Achse widerspiegelt (Abb. 2.3).

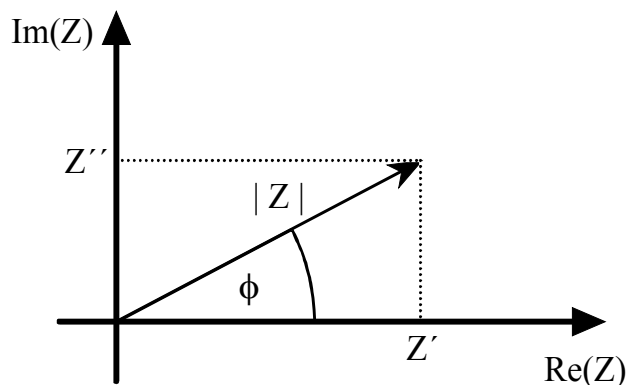


Abb. 2.3:

Darstellung der Impedanz Z in einer Gausschen Zahlenebene.

Der Realteil Z' und Imaginärteil Z'' der komplexen Impedanz Z lassen sich in einem kartesischen Koordinatensystem folgendermaßen ausdrücken:

$$Z = Z' + iZ''$$

Für den Betrag $|Z|$ und die Phasenverschiebung φ ergeben sich daraus folgende Zusammenhänge:

$$|Z| = \sqrt{Z'^2 + Z''^2}$$

$$\varphi = \arctan\left(\frac{Z''}{Z'}\right).$$

2.5.1.3 Die Bestimmung des TER mittels der Impedanzspektroskopie

Zur Bestimmung des transendothelialen elektrischen Widerstandes wurden die cerebralen Kapillarendothelzellen auf Filtern mit einer Wachstumsfläche von 1,13 cm² bzw. 0,33 cm² kultiviert. Für die Messung wurden die Filter in eine mit CDM gefüllte Messkammer Wegener et al. (1996) umgesetzt (s. Abb. 2.4). Die Messung erfolgte in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂.

Die Messkammer besteht aus einer auf einem Glasobjektträger aufgedampften Goldelektrode mit einem Durchmesser von 25 mm, um die herum eine ca. 2 cm hohe Glasumrandung zum Befüllen des entstandenen Gefäßes mit Medium installiert wurde. In diese Goldelektroden-Apparatur konnte der Filter gesetzt und von der apikalen Seite eine Platin-Ringelektrode in das Medium über die mit Zellen bewachsene Filtermembran getaucht werden.

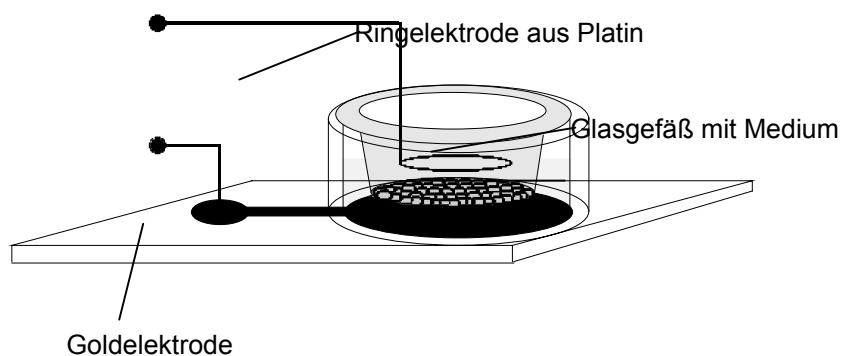


Abb. 2.4:
Schematische Darstellung der Meßkammer zur Bestimmung des TERs.

Die erhaltenen Impedanzen $|Z|$ wurden doppelt logarithmisch gegen die entsprechenden Messfrequenzen aufgetragen und ergaben auf diese Weise ein Impedanzspektrum des mit Endothelzellen bewachsenen Transwell®-Filtersystems. Um aus diesem Spektrum Informationen über den transendothelialen Widerstand (TER), sowie über die Kapazität der Zellschicht (C_{Zell}) zu erhalten, wurden die Messdaten zunächst durch eine mathematische Funktion beschrieben ('gefittet'). Die Funktion beruht auf einem elektrischem Ersatzschaltbild der Zellschicht und enthält mehrere Variablen, die durch einen iterativen Fit an die gegebenen Messdaten angepasst werden.

Als Ersatzschaltbild für endotheliale und epitheliale Monoschichten wurden nach Wegener et al. (1996) erstellt. Diese Anordnung ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Demnach entspricht der zu bestimmende TER dem parallel geschalteten ohmschen Widerstand R_{Zell} . Der Elektrolytwiderstand des apikal und basolateral befindlichen Mediums entspricht dem seriell geschalteten ohmschen Widerstand R_{El} . Die Kapazität der Zellschicht wird durch den parallelgeschalteten Kondensator C_{Zell} beschrieben. Der Kondensator C_{El} in Reihenschaltung gibt die Summe der Kapazitäten der Gold- und Platinelektroden-Grenzflächen an.

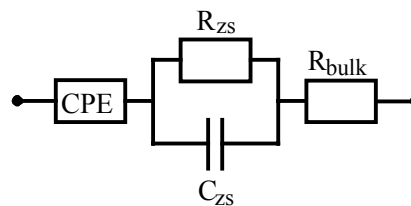


Abb. 2.5:

Ersatzschaltbild zur Datenanalyse der Impedanzmessungen.

R_{ZS} : transendothelialer elektrischer Widerstand; C_{ZS} : Kapazität der Zellschicht; R_{bulk} : Widerstand der Elektrolytlösung, CPE: konstantes Phasenelement

Die Impedanz dieses Ersatzschaltbildes lässt sich nach Gleichung 2.4 als Funktion von der Frequenz der angelegten Wechselspannung ausdrücken:

$$|Z|(\omega) = \sqrt{\left(R_{bulk} + \frac{R_{zs}}{1 + (\omega C_{zs} R_{zs})^2} + \frac{\cos(n\pi / 2)}{A \omega^n} \right)^2 + \left(\frac{\omega C_{zs} R_{zs}^2}{1 + (\omega C_{zs} R_{zs})^2} + \frac{\sin(n\pi / 2)}{A \omega^n} \right)^2} \quad \text{(Gl.2.4)}$$

In Abbildung 2.6 ist ein typisches Impedanzspektrum der cerebralen Kapillarendothelzellen dargestellt, wobei auch das nach dem Ersatzschaltbild berechnete Spektrum eingezeichnet wurde.

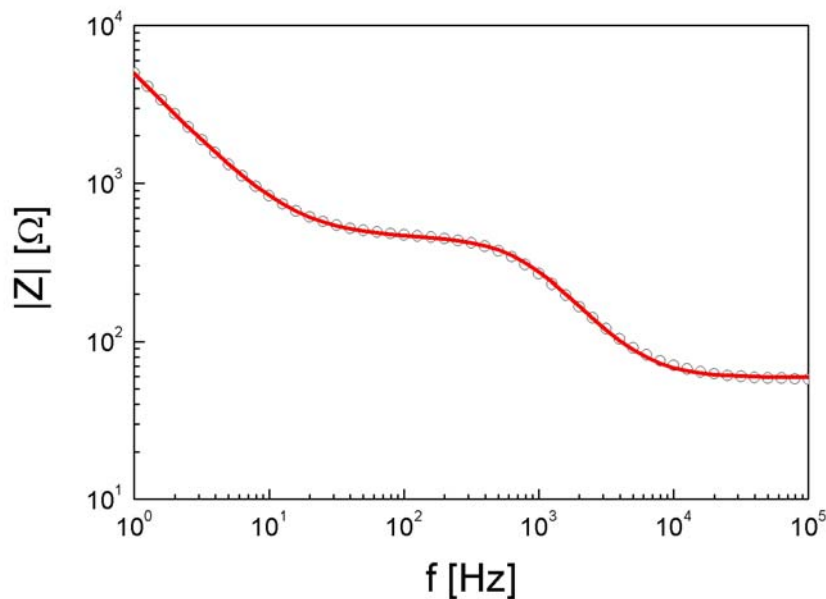


Abb. 2.6:

Impedanzspektrum einer Monoschicht cerebraler Kapillarendothelzelle, kultiviert auf einem Transwell[®]-Filter.

Rechnerische Anpassung des dargestellten Ersatzschaltbildes (s. o.) zur Ermittlung des transendothelialen elektrischen Widerstandes.

Zellschicht: $R_{zs} = 429 \Omega\text{cm}^2$; $C_m = 1.04 \mu\text{F}/\text{cm}^2$; Elektrode + Filter: $A(\text{CPE}) = 35.6 \mu\text{F}/\text{cm}^2\text{s}^{-n-1}$; $n = 0.89$; $R_{\text{bulk}} = 59.5 \Omega$

2.5.2 ECIS

2.5.2.1 Messprinzip

Das Prinzip des ECIS (Electric Cell-Substrate Impedance Sensing)-Verfahrens beruht auf der Bestimmung des Wechselstromwiderstandes (Impedanz) einer zu untersuchenden Zellschicht als Funktion der Frequenz des Erregersignals. Die Änderung der Elektrodenimpedanz, hervorgerufen durch die Anwesenheit der Zellen auf der Elektrodenoberfläche wird genutzt, um Informationen über die Morphologie und Dynamik der Zellen auf der Elektrode zu gewinnen. Die gemessene Gesamtimpedanz besteht aus verschiedenen Beiträgen. Dabei sind die Größe des Spaltes zwischen Zellen und Substrat, sowie die Stärke der barrierebildenden Zell-Zell-Kontakte (*tight junctions*) sowie die Topologie der Plasmamembran entscheidend für die Wechselstromwiderstände der Zellschicht auf der Goldelektrode. Die aus den Zell-Zell- bzw. Zell-Substrat-Kontakten resultierenden parazellulären Impedanzbeiträge lassen sich bei der Kultur der Zellen auf Filtersubstraten nicht voneinander separieren, während im ECIS-Messaufbau eine experimentelle Unterscheidung möglich wird.

Im Unterschied zur Impedanzspektroskopie an den Transwell[®]-Filtersystemen, werden die Zellen direkt auf der Oberfläche von Goldelektroden kultiviert, die auf einem

Glasobjektträger aufgedampft sind. Das Prinzip der ECIS-Technik ist die Messung der elektrischen Impedanz des Systems und die anschließende Extraktion der morphologischen Information der auf der Elektrode befindlichen Zellen aus den Impedanzdaten (s. Abb. 2.7). Das wird möglich, da die Arbeitselektrode 300-mal kleiner als die Messelektrode ist und die Arbeitselektrode dadurch zum 'Flaschenhals' für den fließenden Strom wird. Auf diese Weise wird die gemessene Impedanz des gesamten Systems durch die Zellbewachsene Arbeitselektrode bestimmt, wohingegen die Zellen auf der großen Messelektrode keinen Einfluss ausüben. Das den Endothelzell-Monolayer überschichtende Kulturmedium fungiert als elektrischer Leiter und schließt somit den elektrischen Stromkreis zwischen den beiden Elektroden.

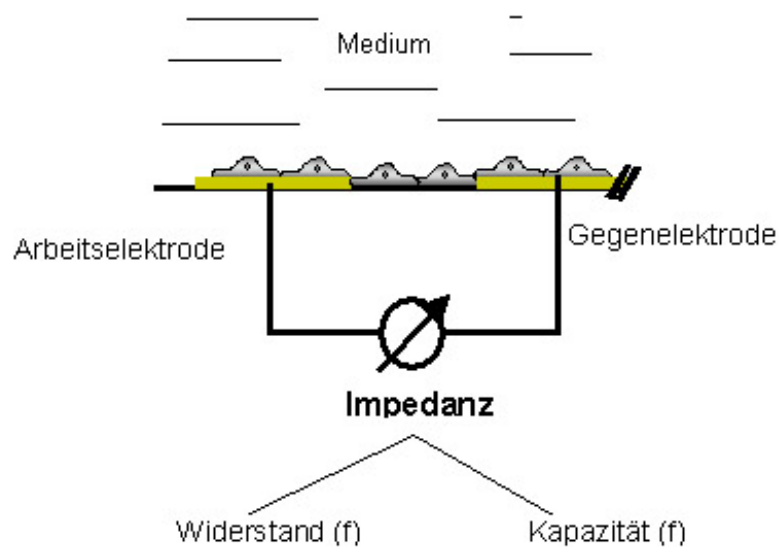


Abb. 2.7:
Grundlegendes Prinzip des ECIS-Verfahrens.

Nach der Adhäsion auf der Goldoberfläche verhalten sich die Zellen in erster Näherung wie nichtleitende, isolierende Partikel, die den aufgeprägten Wechselstrom zwingen, um die Zellen herum zu fließen. Im adhärenen Zustand bilden die Zellen auf der Elektrode Zell-Substrat- sowie Zell-Zell-Kontakte aus. Beide Kontaktformen limitieren den Stromfluss von der Arbeitselektrode über das Medium zur Gegenelektrode und modulieren somit die experimentell bestimmte Elektrodenimpedanz. Im Gegensatz zu vielen anderen elektrochemischen Messmethoden ermöglicht das ECIS-Modell eine Unterscheidung der Impedanzbeiträge zwischen den beiden verschiedenen oben genannten Kontakten der adhärenen Zellen (s. Abb. 2.8).

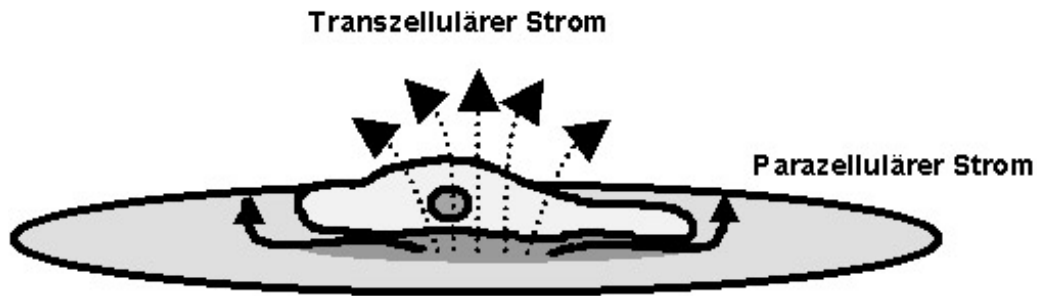


Abb. 2.8:

Schematische Darstellung des Stromflusses durch eine auf einer Goldelektrode adhärenzte Zellschicht.

Der gesamte Stromfluss wird in zwei nach ihrem Verlauf unterschiedliche Beiträge aufgeteilt, den transzellulären und den parazellulären Stromfluss (s. Abb. 2.8). Der transzelluläre Strom wird hauptsächlich durch die kapazitiven Eigenschaften der Zellmembranen bestimmt.

Die ECIS-Methode ist bereits vielfach auf verschiedenste zellbiologische Fragestellungen angewandt worden, wobei anhand verschiedener Messmodi jeweils unterschiedliche Informationen gewonnen werden. Es ergeben sich drei Parameter, die die Eigenschaften der Zellschicht beschreiben: C_m entspricht der Kapazität der Plasmamembran, R_b ist der Widerstand zwischen den Zellen und α beschreibt den Impedanzbeitrag aus dem Zell-Substrat-Kontakt. Mit Hilfe des ECIS-Verfahrens und einem zur Analyse der Rohdaten dienenden Modell von Giaever & Keese (1991) ist es möglich, über den gesamten Frequenzbereich zwischen den Impedanzbeiträgen der Zell-Zell- sowie Zell-Substrat-Kontakte zu unterscheiden. Dabei werden die Zellen als kreisförmige Scheiben mit einem Radius r_c betrachtet, die einen mittleren Abstand h zur Goldoberfläche einnehmen (s. Abb. 2.9).

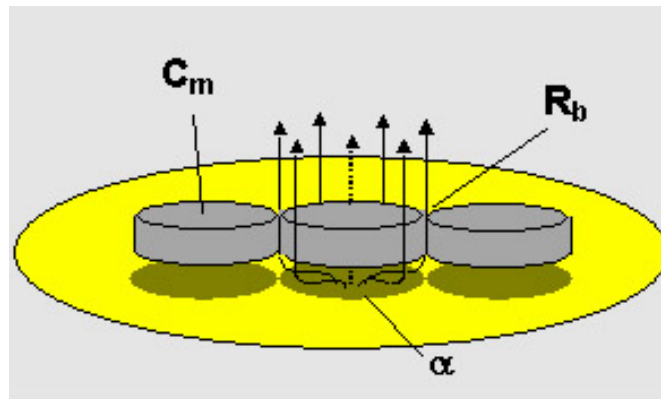


Abb. 2.9:

Schematische Darstellung des Modells von (Giaever and Keese, 1991) zur Auswertung der Impedanzspektren von zellbewachsenen Goldelektroden.

α beschreibt den Impedanzbeitrag aus dem Zell-Substrat-Kontakt, R_b ist der Widerstand zwischen den Zellen und C_m entspricht der Kapazität der Plasmamembran.

Das Modell wird durch eine Übertragungsfunktion ausgedrückt, die R_b , α und C_m als Parameter enthält. Diese Parameter werden so optimiert, dass eine bestmögliche Übereinstimmung zu den gemessenen Daten entsteht und das Abweichungsquadrat minimiert wird. Die so erhaltenen Parameter beschreiben die Zellschicht.

2.5.2.2 Modell zu Auswertung der Impedanzspektren

Zur Auswertung der Impedanzspektren, die mit der ECIS-Technik aufgenommen wurden, wird das Modell von (Giaever and Keese, 1991) verwendet, das im folgenden nochmals mathematisch erläutert wird. Die Impedanzbeiträge der Zellschicht setzen sich aus den drei ermittelten Parametern α , R_b und C_m zusammen. Dabei drückt α die frequenzabhängige Impedanz innerhalb des Zell-Substrat-Kontaktes aus und ist definiert als $\alpha = r_c(\rho/h)^{0.5}$. In diesem Ausdruck bezeichnet r_c den Radius der Zelle, ρ den spezifischen Elektrolytwiderstand im Spalt zwischen Zelle und Substrat und h den Abstand zwischen Zelle und Substrat. Die spezifische Kapazität der Zellschicht, bestimmt durch die dielektrischen Eigenschaften und die Morphologie der Plasmamembranen, wird durch C_m beschrieben. Nach (Giaever and Keese, 1991) kann die Impedanz zellbedeckter Goldelektroden durch eine Übertragungsfunktion ausgedrückt werden.

Die iterative Anpassung der Übertragungsfunktion an die gemessenen Impedanzspektren zur Bestimmung der Parameter R_b , α und C_m erfolgte nach dem Verfahren von Wegener et al. (2000).

In der Abbildung 2.10 ist die Übereinstimmung zwischen den experimentell ermittelten Daten und dem Modell nach Giaever & Keese (1991) nach Anpassung der Parameter exemplarisch dargestellt.

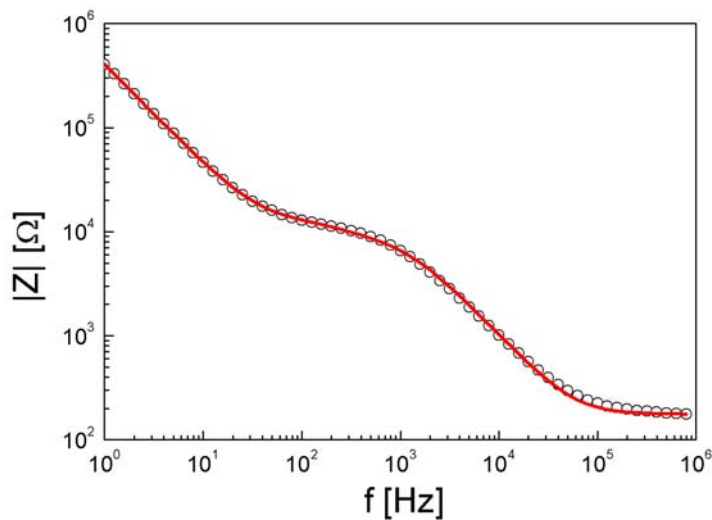


Abb. 2.10:

Typisches Impedanzspektrum einer mit PBCEC bewachsenen ECIS-Goldelektrode.

Die durchgezogene Linie repräsentiert die angepasste Übertragungsfunktion.

Zellschicht: $R_b = 214.1 \Omega\text{cm}^2$; $C_m = 1.12 \mu\text{F}/\text{cm}^2$; $\alpha = 31.9 \Omega^{0.5}\text{cm}$; Elektrode: $A(\text{CPE}) = 14.0 \mu\text{F}/\text{cm}^2\text{s}^{n-1}$; $n = 0.96$; $R_{\text{bulk}} = 176.6 \Omega$

Im allgemeinen kann man für die quantitative Auswertung eines Impedanzspektrums ein Ersatzschaltbild erstellen, das anhand von klassischen elektrischen Bauteilen die elektrischen Eigenschaften des Systems so genau wie möglich beschreibt. Dazu muss das Ersatzschaltbild die gleiche Frequenzabhängigkeit der Impedanz wie das System selbst aufweisen. Die Verwendbarkeit idealer elektrischer Bauteile zur Beschreibung eines realen elektrochemischen Systems ist jedoch limitiert. Daher muss unter Umständen auf nicht-ideale elektrochemische Impedanzelemente zurückgegriffen werden. Aus den Parametern α , R_b und C_m des ECIS-Modells und einigen zusätzlichen elektrischen Komponenten, die die elektrischen Eigenschaften der Elektrode und des Mediums berücksichtigen, lässt sich näherungsweise eine das ECIS-Modell veranschaulichende Ersatzschaltung erstellen (s. Abb. 2.11).

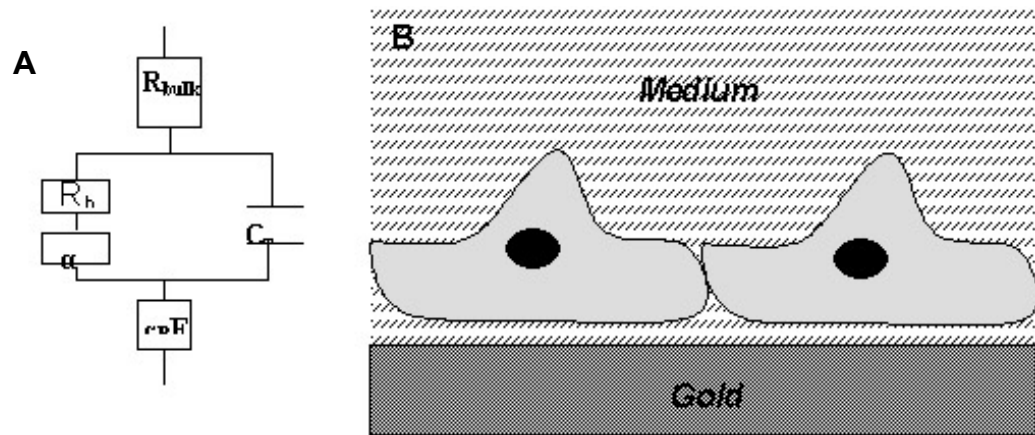


Abb. 2.11:

A: Schematische Darstellung der Ersatzschaltung einer Zellschicht auf Goldelektroden basierend auf dem Modell von Giaever und Keese (1991).

B: Elektrochemisches System: Zellen auf einer planaren Goldoberfläche umgeben von Elektrolytlösung.

R_b : Widerstand des Interzellularspaltes, C_m : Kapazität der Plasmamembran, α : Impedanzelement zur Beschreibung des frequenzabhängigen Impedanzbeitrages aus dem Zell-Substrat-Kontakt, R_{bulk} : Widerstand der Elektrolytlösung, CPE: konstantes Phasenelement

Die Ersatzschaltung, die in dieser Arbeit verwendet wurde, besteht im Wesentlichen aus ohmschen Widerständen mit der Impedanz R und einer Phasenverschiebung von 0, Kondensatoren C mit der Impedanz $\frac{1}{i\omega C}$ und einer Phasenverschiebung von

$-\frac{\pi}{2}$ sowie den nicht-idealen Impedanzbeiträgen durch ein konstantes Phasenelement CPE (constant phase element) und dem Impedanzbeitrag des Zell-Substrat-Kontaktes α .

Das CPE ist ein empirisches Impedanzelement, das keinerlei Entsprechung in einem idealen elektrischen Bauteil findet, aber die Impedanz an der Grenzfläche zwischen einer Edelmetallelektrode und einer Elektrolytlösung adäquat beschreibt. Die Impedanz beträgt $\frac{1}{(i\omega)^n A}$ und für die Phasenverschiebung gilt dem-

entsprechend $-n\frac{\pi}{2}$ mit $n = [0,1]$. Die Frequenzabhängigkeit der Impedanz wird ent-

scheidend vom Parameter n bestimmt und liegt zwischen denen eines ohmschen Widerstandes ($n = 0$, $R = 1/A$) und eines idealen Kondensators ($n = 1$, $C = A$). R_{bulk} beschreibt die elektrischen Eigenschaften des Kulturmediums. Die elektrischen Eigenschaften des Zell-Layers werden durch den Kondensator mit der Kapazität C_m und den ohmschen Widerstand R_b sowie der frequenzabhängigen Komponente α dargestellt. C_m ist parallel zu R_b und diese drei Komponenten seriell mit CPE und R_{bulk} verschaltet.

Die Berechnung der Gesamtimpedanz dieses Netzwerkes verschiedener Bauteile erfolgt nach den Kirchhoffschen Gesetzen durch die Verknüpfung der Impedanzbeträge der jeweiligen Bauteile in Abhängigkeit ihrer Verschaltung. Bei einer Reihenschaltung werden die Einzelimpedanzen summiert, während bei einer Parallelschaltung die Addition der reziproken Impedanzen zur reziproken Gesamtimpedanz erfolgt. Dadurch kann die schon erwähnte Übertragungsfunktion aufgestellt werden, die durch iterative Anpassung des Modells an das gemessene Spektrum eine Charakterisierung des Systems ermöglicht.

2.5.2.3 Messaufbau

Zur Durchführung der ECIS-Messungen wurden die cerebralen Kapillarendothelzellen in Messkammern aus Glas kultiviert. Die Glasumrandung wurde mit Silikonkleber auf einem Objektträger aufgebracht, auf den die Arbeits- und Gegenelektrode als dünne Goldschicht aufgedampft waren (s. Abb. 2.12). Die Endothelzellen wurden auf der Goldschicht, die zuvor mit Gelatine beschichtet wurde (s. Kapitel 2.1.1.3) wie gewöhnlich kultiviert und zur Messung in die Messapparatur eingespannt (s. Abb. 2.12).

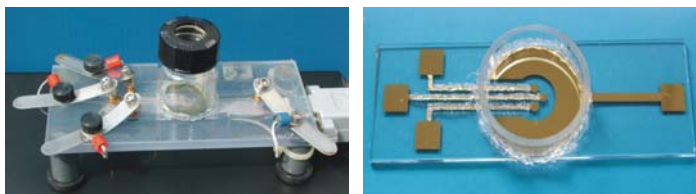
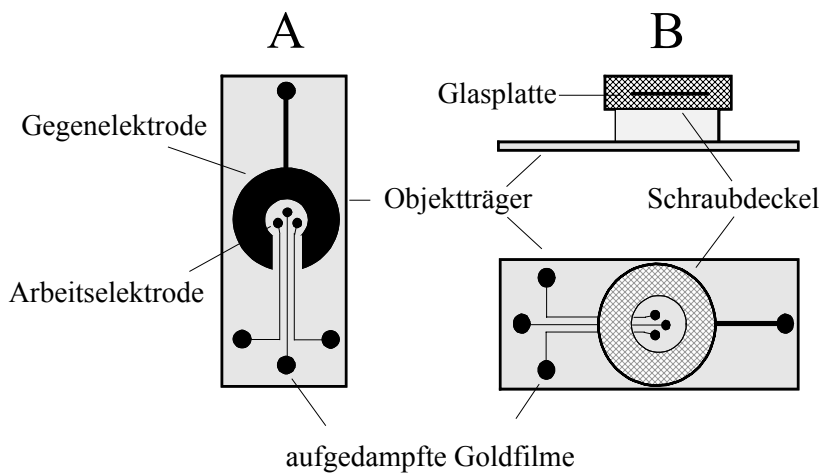


Abb. 2.12:

Schematische und reelle Darstellung einer Goldelektrode in der Aufsicht und in der Seitenansicht.

Die photographische Darstellung unten links zeigt eine Goldelektrode, die zur Messung auf dem Messtischchen festgeklemmt ist.

Jede Kammer enthält drei kleine voneinander unabhängige Arbeitselektroden mit einer Fläche von jeweils $0,03 \text{ cm}^2$, sowie eine co-planar angeordnete gemeinsame große Gegenelektrode, deren Fläche $3,8 \text{ cm}^2$ beträgt und somit im Vergleich zur Arbeitselektrode 100-fach größer ist. Dadurch kann deren Impedanzbeitrag im Vergleich zu der Arbeitselektrode vernachlässigt werden. Beide Elektrodentypen sind über das Kulturmedium leitend verbunden (s Abb. 2.7). Während der gesamten Messung befindet sich die Messkammer in einem Brutschrank bei 5 % CO_2 , $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

Um während der Messung zwischen den drei Arbeitselektroden umschalten zu können, wurde ein Relais-Modul verwendet, welches mit dem Impedanz-Analysator (SI 1260, *Solartron Instruments*) verbunden ist. Relais-Modul und Impedanz-Analysator werden von einem herkömmlichen PC gesteuert, der auch die ECIS-Messdaten erfasst und speichert. Das nachfolgende Blockschaltbild skizziert den experimentellen Aufbau (Abb. 2.13).

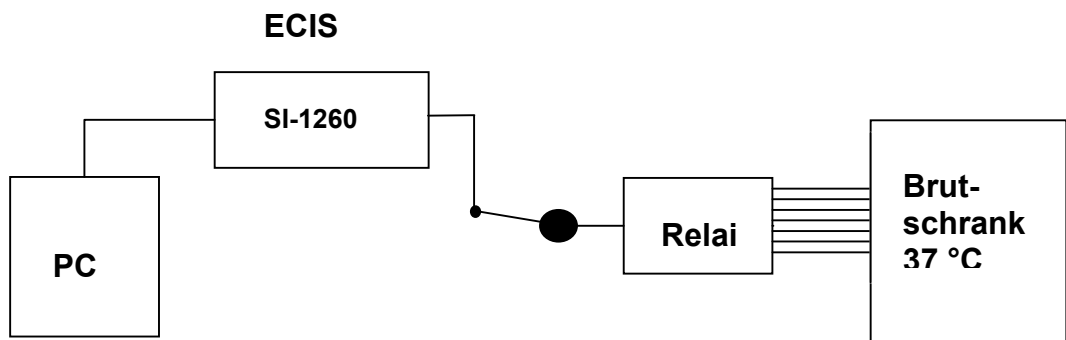


Abb. 2.13:

Schematischer Messaufbau des ECIS-Experiments.

Ein Relais ermöglicht das Umschalten zum Impedanzanalysator (SI-1260). Die Steuerung von SI-1260 und Relais erfolgt über einen PC. Die Messkammer befindet sich im Brutschrank bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und ist mit dem Relais verbunden.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die entzündungsabhängigen morphologischen und molekularen Veränderungen der PBCEC während der Interaktion mit Leukozyten zu charakterisieren. Im Mittelpunkt stand dabei der bisher ungeklärte komplexe Mechanismus der transendothelialen Migration der Leukozyten, der das finale Ereignis der Entzündungskaskade am Endothel darstellt. Ob die Transmigration immunkompetenter Zellen über das cerebrale Endothel dabei trans- oder parazellulär erfolgt, sollte durch biophysikalische Techniken, die eine nicht-invasive Analyse gewährleisten, in Kombination mit immunzytochemischen und ultrastrukturellen Untersuchungen im Detail beleuchtet werden.

3.1 Das Entzündungsmodell der BHS *in vitro*

Die grundlegende Voraussetzung für die Untersuchung des transmigratorischen Prozesses immunkompetenter Zellen über das cerebrale Endothel war zunächst die Etablierung eines umfangreich charakterisierten Entzündungsmodells der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Als Zellkulturmodell dienten primärkultivierte Endothelzellen aus den Hirnkapillaren des Schweins, deren Barrierefunktion *in vitro* nahezu vollständig erhalten blieb. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die Regulation der Permeabilitätseigenschaften und die Beurteilung der Endothelzell-Differenzierung der BHS im nicht-entzündlichen Zustand und im Entzündungsfall. Erst im darauffolgenden Schritt sollte mit einem umfangreichen Methodenspektrum der Durchtritt der Leukozyten durch das Endothel im Entzündungsmodell der BHS charakterisiert werden.

3.1.1 Der Einfluss der Kulturbedingung

Vorbedingung für die Entwicklung des *in vitro*-Modells der BHS zur Untersuchung entzündlicher Prozesse war die Kultivierung der PBCEC unter serumfreien also chemisch definierten Bedingungen. Ausschließlich unter diesen Kulturbedingungen war die Charakterisierung sowohl des Cytokin-verursachten entzündungsinduzierenden Effekts, als auch des Einflusses der Leukozyten auf das Endothel durchführbar.

Am 7. DIV war die Barrierefunktion der PBCEC üblicherweise maximal ausgeprägt, weshalb zur Standardisierung der Experimente an den cerebralen Kapillarendothelzellen, die ohnehin den Primärkultur-typischen Unregelmäßigkeiten unterworfen waren, die Untersuchungen an diesem Kulturtag erfolgten.

3.1.1.1 Impedanzspektroskopische Untersuchungen

Die Grundlage des Entzündungsmodells bildete die Kultivierung cerebraler Kapillarendothelzellen auf Transwell®-Filtersystemen, die den Zellen auch *in vitro* das polare Umfeld boten, wie sie es *in vivo* vorfinden. Dabei entsprach das apikale Kompartiment des Filters dem Blutgefäßlumen und die basolaterale Filterkammer der hirngewandten Seite der Kapillare.

Die Ausbildung der sogenannten *tight junctions* bildet die anatomische Grundlage der Blut-Hirn-Schranke. Da sich deren Ausbildung und damit die Barrierefunktion der eingesetzten Endothelzellen am einfachsten durch die Messung des elektrischen Widerstands darstellen lässt, wurden zur Etablierung und Optimierung des Entzündungsmodells der BHS zunächst transendotheliale Widerstandsmessungen durchgeführt.

Der Einfluss von Hydrocortison und Serumersatz

Ziel war zunächst die Optimierung der Serum- und Hydrocortison-Supplementierung des Entzündungs-Modells der BHS *in vitro*. Hydrocortison, das in der Endothelzell-Kultur üblicherweise eingesetzt wird, wirkt bekanntermaßen entzündungshemmend. Es musste deshalb in seinen Auswirkungen auf das Entzündungsmodell der BHS sorgfältig untersucht werden. Der Einsatz von Serumersatz-Supplementen sollte zeigen, inwiefern sich diese auf die Barriereigenschaften der PBCEC auswirkten, um letztendlich auf den Serum- bzw. Hydrocortison-Zusatz in der Kultur der cerebralen Kapillarendothelzellen verzichten zu können.

In Abbildung 3.1 dargestellt ist der Einfluss unterschiedlicher Kulturmedien auf den transendothelialen Widerstand (TER) der PBCEC.

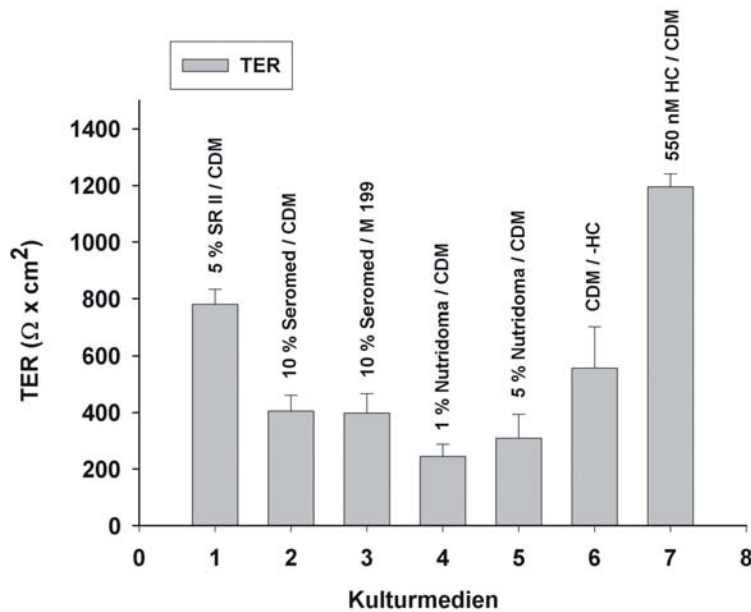


Abb. 3.1:

Der Einfluss unterschiedlicher Kulturmedien auf den TER der PBCEC.

Inkubationsmedium: serumfreies chemisch definiertes Medium (CDM) bzw. M 199 Earle (1x) mit Phenolrot (M 199); Die Substanzen Seromed (Fa. Biochrom), Nutridoma (Fa. Boehringer) und SR II (Serum Replacement, Fa. Sigma) sind käufliche Medienzusätze, die in der angegebenen Konzentration dem jeweiligen Medium (CDM oder M 199) zugegeben wurden und somit am Tag des routinemäßig durchgeführten Medienwechsels am 4. DIV zur Endothelzell-Kultur gegeben wurden. Bestimmung des TER am 7. DIV. Die TER-Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt (n = 10).

Durch den Zusatz des `Serum Replacement II` (SR II, Fa. Sigma) zum Kulturmedium der PBCEC wurden annähernd so hohe TER-Werte erzielt wie durch den Zusatz von Hydrocortison. Problematisch bei der Verwendung des SR II war allerdings die Induktion einer signifikant gesteigerten Apoptoserate in den PBCEC (s. Kapitel 3.1.1.3). Zudem war es nicht möglich, die Zusammensetzung dieses Supplements zu bestimmen. Da die übrigen der dargestellten Kulturmedien-Zusätze (`Seromed` und `Nutridoma`) zu einer starken Reduzierung des TERs der PBCEC führten, die sich in einem Verlust der Barriereigenschaften der Blut-Hirn-Schranke widerspiegelte, wurde auf diese im Entzündungs-Kulturmodell der BHS verzichtet.

Demgegenüber zeigte sich, dass die Kultivierung der PBCEC in serumfreiem, chemisch definierten Medium (CDM) mit Zusatz von Hydrocortison zu einer signifikanten Verstärkung der endothelialen Barrierefunktion führte, die in Abbildung 3.2 aufgeführt ist.

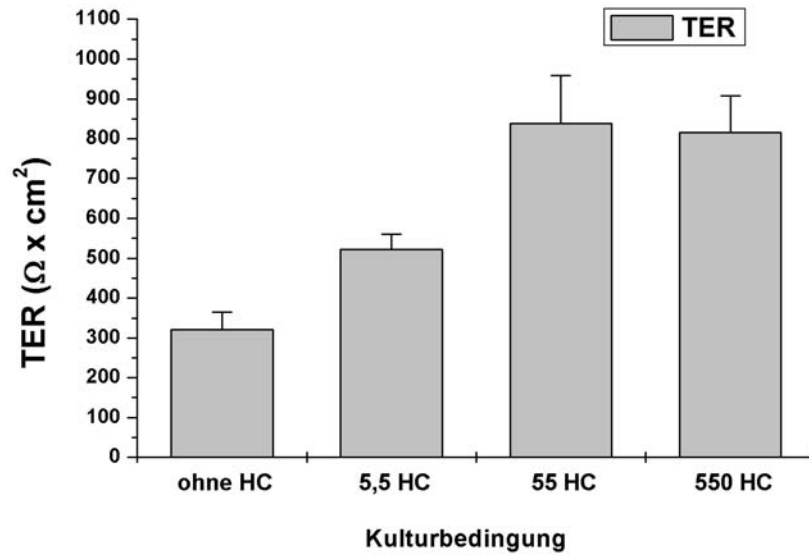


Abb. 3.2:

Der Einfluss der Hydrocortison-Konzentration auf den TER der BHS in vitro.

Inkubationsmedium: serumfreies chemisch definiertes Medium (CDM) mit Zusatz verschiedener Konzentrationen von Hydrocortison (HC) (s. Angaben in der Graphik: 5,5, 55, 550 nM HC) bzw. ohne Zusatz von HC.

Die Bestimmung des transendothelialen Widerstands (TER) erfolgte am 7. DIV. Die TER-Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt (n = 10).

Der transendotheliale Widerstand der PBCEC, kultiviert in reinem CDM ohne Supplemente, dargestellt in Abbildung 3.2, erreichte einen Wert von durchschnittlich $350 \Omega \times \text{cm}^2$. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von Hydrocortison (HC) zu einem konzentrationsabhängigen Sättigungsverlauf des TERs, der bei 55 nM HC mit durchschnittlich $820 \Omega \times \text{cm}^2$ sein Maximum erreichte und sich durch eine weitere Erhöhung der HC-Konzentration nicht mehr steigern ließ. Einzelne Maximalwerte, die hier nicht dargestellt wurden, erreichten Werte von bis zu $2000 \Omega \times \text{cm}^2$. Durch den Zusatz von Hydrocortison war es möglich, den transendothelialen Widerstand der PBCEC über mehrere Tage auf hohem Niveau zu halten, wie die Abbildung 3.3 zeigt.

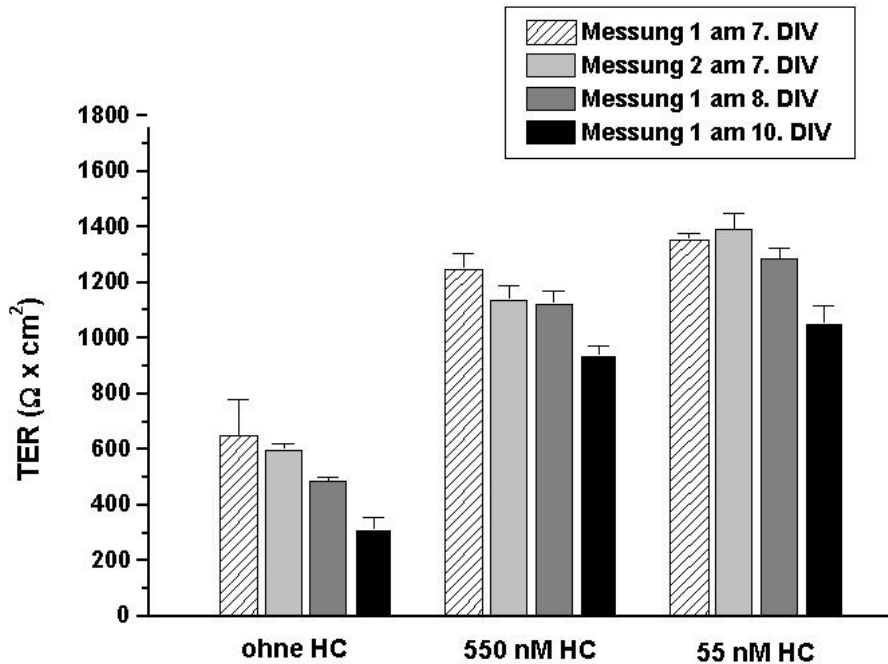


Abb. 3.3:

Der Einfluss der Hydrocortisonkonzentration auf den TER der BHS in vitro im zeitlichen Verlauf.

Inkubationsmedium: serumfreies chemisch definiertes Medium (CDM) mit Zusatz verschiedener Konzentrationen von Hydrocortison (HC) (s. Angaben in der Graphik: 5,5, 55, 550 nM HC) bzw. ohne Zusatz von HC.

Die zwei Messungen des transendothelialen Widerstands am 7. DIV erfolgten im Abstand von 8 h. Die Messung der TER-Werte am 8. DIV erfolgte 24 h nach der zweiten Messung des 7. DIV. Die Bestimmung des TER am 10. DIV erfolgte 48 h nach der Messung des 8. DIV. Die TER-Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt (n = 10).

Die in Abbildung 3.2 und 3.3 dargestellten hohen transendothelialen Widerstände der PBCEC unter Hydrocortison-haltigen Kulturbedingungen ließen sich ausschließlich auf den Transwell®-Filtersystemen mit Filtermembranporen des Durchmessers von 0,4 µm erzielen.

Da jedoch Leukozyten einen Durchmesser von ca. 5 µm aufweisen und somit nicht von der apikalen Filterkammer durch die Membranporen in das basolaterale Kompartiment des Filtersystems gelangen können, eignete sich dieser Filtertyp nicht zur Charakterisierung der Transmigration von Leukozyten. Zu diesem Zweck war es notwendig, die PBCEC auf Filtern mit Membranporen der von 8 µm Durchmesser zu kultivieren, die einen Durchtritt der Immunzellen durch die Filtermembran ermöglichen. Wie in der Abbildung 3.4 zu sehen ist, war es allerdings auf diesen Filtersystemen nicht möglich, höhere TER-Werte als 200 Ω x cm² zu erzielen. Da in dieser Arbeit ohnehin nicht die quantitative, sondern die qualitative Charakterisierung des Transmigrationsprozesses der Leukozyten durch den cerebralen Endothelzell-Monolayer im Focus der Untersuchungen stand, wurde auf die quantitative Bestimmung

der Transmigrationsrate durch Auszählen der Immunzellen im basolateralen Filterkompartiment verzichtet.

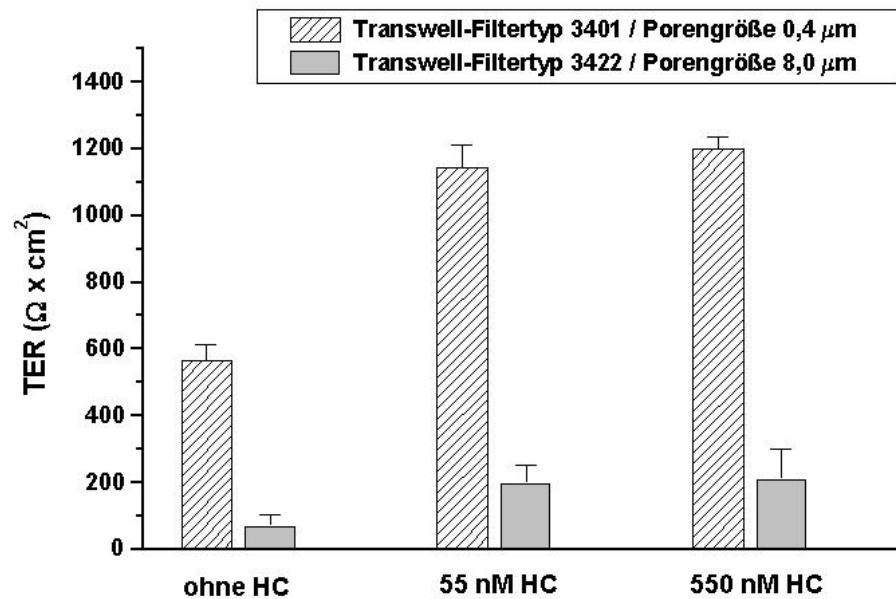


Abb.3.4:

Der Einfluss des Transwell®-Filtertyps auf den TER der PBCEC.

Inkubationsmedium: serumfreies chemisch definiertes Medium (CDM) mit Zusatz von 55 bzw. 550 nM Hydrocortison (HC). Bestimmung des transendothelialen Widerstands (TER) am 7. DIV. Die TER-Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt (n = 10).

Da sich der Zusatz von Hydrocortison in hohem Maße positiv auf die Barriereigenschaften der PBCEC auswirkte, wurde dessen Einfluss auf die Endothelzell-Morphologie im Kulturverlauf mit Hilfe der ECIS (*electric cell substrate impedance sensing*)-Technik zeitaufgelöst analysiert.

Die Fähigkeit der ECIS-Technik, die Zellmorphologie beschreibenden drei Parameter R_b (Zell-Zell-Kontakt), C_m (Membrankapazität) und α (Zell-Substrat-Kontakt) separiert voneinander zu messen, ermöglichte es, diese mit den Ergebnissen der elektronenmikroskopischen und immunzytochemischen Untersuchungen direkt zu vergleichen. So ließ sich der Parameter R_b der Endothelzellschicht, der ein quantitatives Maß für die Dichtigkeit der Zell-Zell-Kontakte der PBCEC darstellt, direkt mit den Ergebnissen der immunzytochemischen Analysen der *tight junction*-assoziierten Proteine korrelieren. Die Parameter R_b und C_m ließen sich mit den rasterelektronenmikroskopischen (REM) Untersuchungen vergleichend gegenüberstellen. Dabei entsprach die morphologische Ausprägung der Zellgrenzen der PBCEC dem Wert des Parameters R_b und die ultrastrukturelle Ausbildung der Plasmamembran der Membrankapazität C_m . Durch den Einsatz der ECIS-Technik wurde zudem die Charakterisierung eines wei-

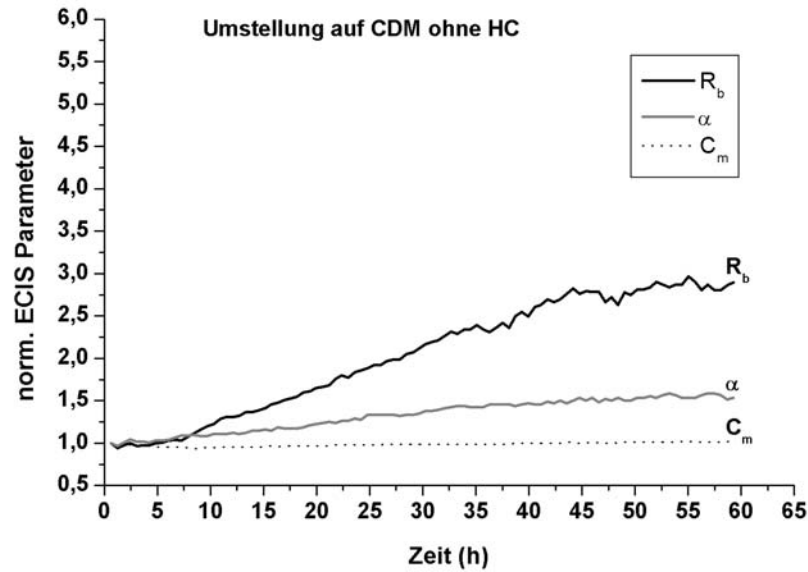
teren morphologischen Parameters ermöglicht, und zwar die des Zell-Substrat-Kontakts (α), der mit dem bisher in dieser Arbeit aufgeführten Methodenspektrum noch nicht erfasst werden konnte. Durch die detaillierte nicht-invasive ECIS-Analyse der die Endothelzell-Morphologie beschreibenden Parameter R_b , α und C_m in hoher zeitlicher Auflösung wurde das Entzündungs-Modell der BHS *in vitro* umfassend charakterisiert.

Mit Hilfe der ECIS-Methode wurde die Entwicklung des barrierebildenden Zell-Zell- und Zell-Substrat-Kontakts zeitaufgelöst dargestellt. Dabei wurde diejenige Kulturphase der PBCEC analysiert, in der sich, bedingt durch den Hydrocortison-Zusatz, die wichtigste Eigenschaft der Blut-Hirn-Schranke, die Barrierefunktion, entwickelte. Zur impedanzspektroskopischen Analyse des barriereverstärkenden Effekts des Hydrocortisons auf die ECIS-Parameter R_b , α und C_m der PBCEC, wurde das serumhaltige Kulturmedium, wie standardmäßig üblich am 4. DIV gegen CDM mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison ausgetauscht. Die ECIS-Messung wurde von diesem Zeitpunkt an bis zum 6. DIV, der Tag an dem die Barrierefunktion der PBCEC normalerweise voll entwickelt war durchgeführt.

Die Abbildung 3.5 B zeigt, dass sich der Zusatz von Hydrocortison im CDM der PBCEC gleichermaßen verstärkend sowohl auf die Zell-Zell- (R_b) als auch auf die Zell-Substrat-Kontakte (α) der Endothelzellen auswirkte. Dabei kam es zu einem biphasischen Verlauf der Messkurve für R_b und α . Innerhalb der ersten 7 Stunden stiegen die Werte der ECIS-Parameter R_b und α gleichermaßen an, wobei R_b innerhalb dieses Zeitraums 36 % seines Endwertes erreichte, α dagegen 55 %. Der weitere zeitliche Verlauf der Werte für R_b und α zeigte eine stetige Verstärkung der beiden Parameter, die für R_b nach 50 Stunden in einen Sättigungswert überging. Der Wert des Parameters α dagegen stieg auch nach 50 Stunden bis zum Abbruch der Messung weiter geringfügig an. Insgesamt kam es zu einem steileren Anstieg des Kurvenverlaufs von R_b im Vergleich zu α , so dass α am Ende der Messung nur 53% des R_b -Endwertes aufwies.

Im Vergleich dazu kam es bei der Umstellung der PBCEC von serumhaltigen auf serumfreie Kulturbedingungen ohne Hydrocortison-Zusatz zu einer stetigen, aber wesentlich geringfügigeren Steigerung von R_b und α . Ein biphasischer Kurvenverlauf von α war nicht zu beobachten (s. Abb. 3.5 A). Dagegen zeigte der Kurvenverlauf von R_b , dass es nach Verlauf der ersten 7 Stunden zu einer stärkeren Zunahme seines Wertes kam. Diese biphasische Steigerung war genau gegensätzlich zu der Steigerung des Zell-Zell-Kontakts unter HC-haltigen Kulturbedingungen. Generell erreichten die Endwerte für R_b in Abwesenheit von Hydrocortison nur 54 % des Endwertes der HC-haltigen Kulturbedingungen, α dagegen nur 42 %. Die Membrankapazität (C_m) blieb in beiden Fällen konstant.

A



B

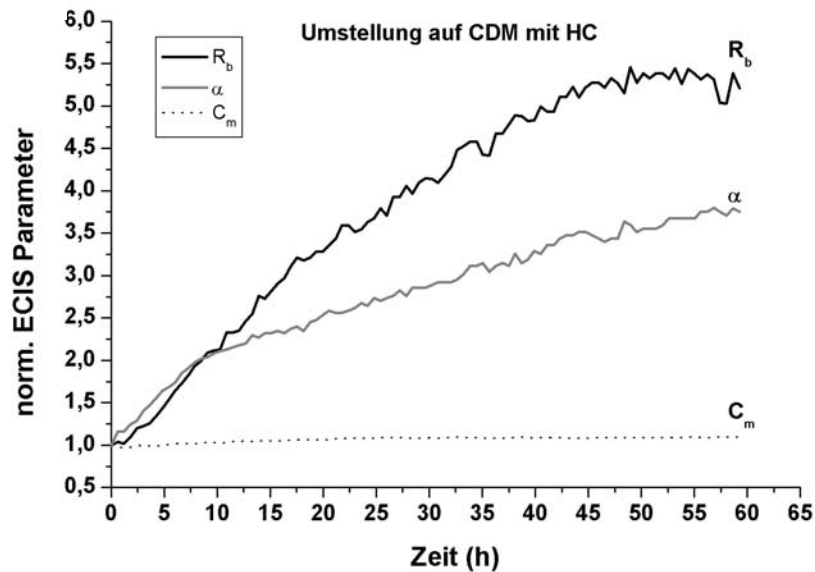


Abb. 3.5 A und B:

Der Einfluss des Hydrocortisons auf die ECIS-Parameter R_b , α und C_m der PBCEC.

Zeitlicher Verlauf der Veränderung der Werte des Zell-Zell-Kontakts (R_b), der Membrankapazität (C_m) und des Zell-Substrat-Kontakts (α) nach Umstellung der PBCEC von serumhaltigen auf serumfreie Kulturbedingungen mit Zusatz von Hydrocortison. Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC).

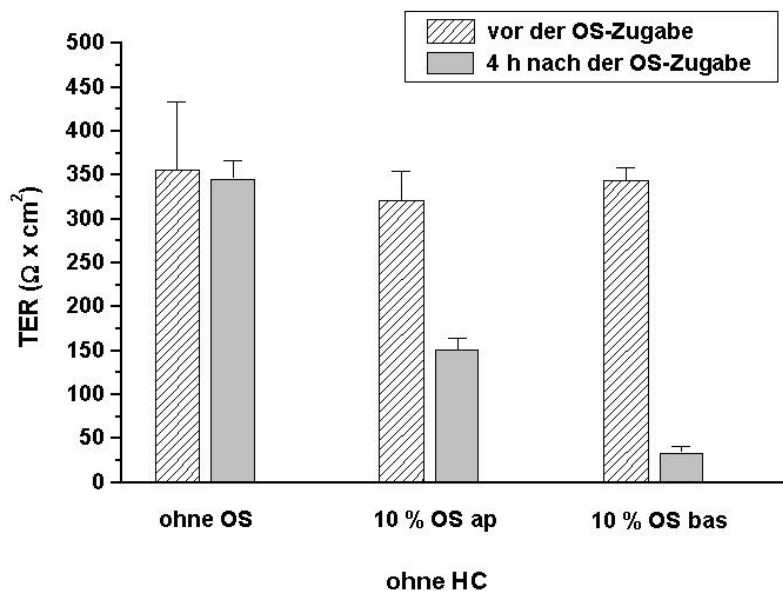
A: Nach Umstellung von serumhaltigen auf serumfreie Kulturbedingungen (CDM ohne HC).

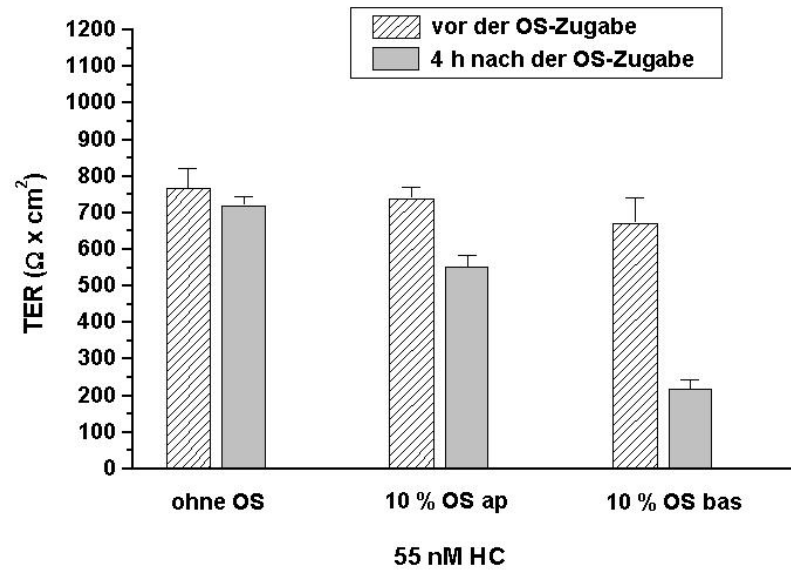
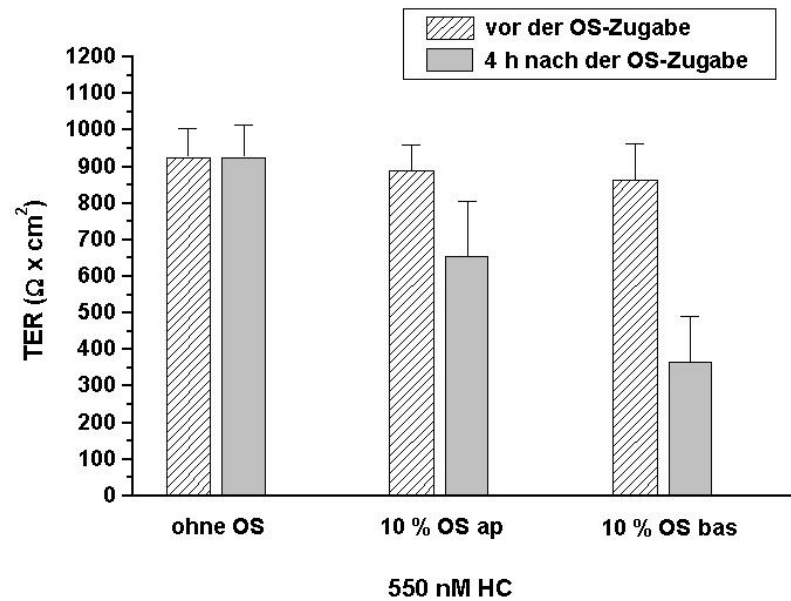
B: Nach Umstellung von serumhaltigen auf serumfreie Kulturbedingungen (CDM mit 55 nM HC).

$R_b(0) = 27 \Omega \times \text{cm}^2$ (A), $R_b(0) = 36 \Omega \times \text{cm}^2$ (B); $\alpha(0) = 14 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ (A), $\alpha(0) = 15 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ (B) und $C_m(0) = 1,8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (A), $C_m(0) = 1,2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (B) geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$, $\alpha(0)$ und $C_m(0)$ normiert.

Der Einfluss des Serums

Die impedanzspektroskopischen Messungen des transendothelialen Widerstands (TER), dargestellt in Abbildung 3.6, verdeutlichen, dass die Ausbildung des barrierebildenden Phänotyps der BHS *in vitro* in starkem Maße von der Anwesenheit des Serums im Kulturmedium der PBCEC bestimmt wurde. Dabei zeigte sich, dass Serum einen polaren Einfluss ausübte, der sich darin äußerte, dass das Serum lediglich bei Einwirkung von der basolateralen Seite der Endothelzellen (Hirnseite) zu einem weitgehenden Verlust der Barrierefunktion führte. Dieser Effekt wurde besonders in Abwesenheit von Hydrocortison im CDM der PBCEC deutlich (s. Abb. 3.6). Interessanterweise wurde der TER durch Serum-Zugabe von der apikalen Seite der Zellen wesentlich geringfügiger beeinflusst.

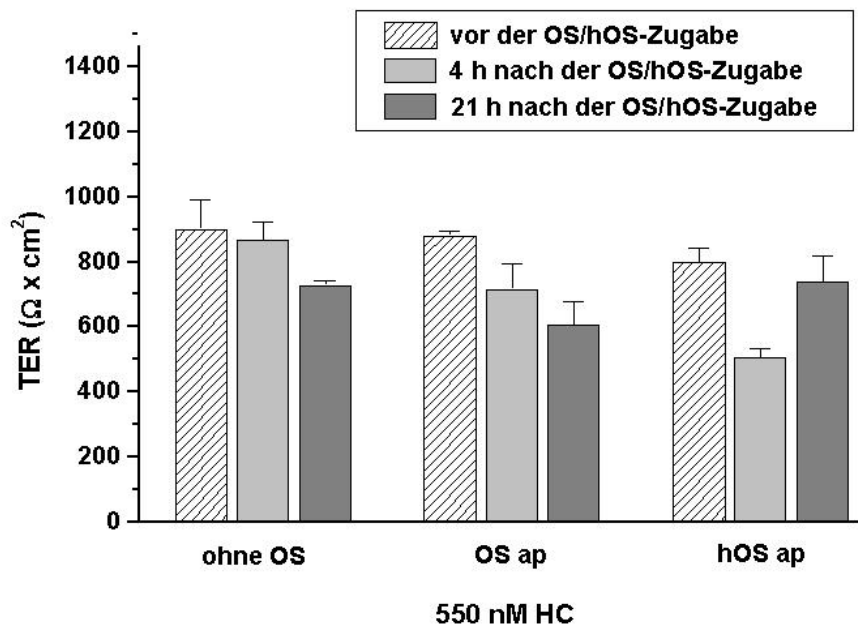
A

B**C****Abb. 3.6 A-C:****Der polare Einfluss von Serum auf den TER der PBCEC.****A:** Der Einfluss des Serums in Abwesenheit von Hydrocortison im CDM.**B:** Der Einfluss des Serums in Anwesenheit von 55 nM Hydrocortison im CDM.**C:** Der Einfluss des Serums in Anwesenheit von 550 nM Hydrocortison im CDM.

Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium (CDM) ohne bzw. mit Zusatz verschiedener Konzentrationen von Hydrocortison (HC) (s. Grafik). Die Messung erfolgte am 7. DIV, 4 h nach Zugabe des Serums. Als Serum diente Ochsen Serum (OS), das zu 10 Vol. % in die apikale (50 μ l) bzw. in die basolaterale (150 μ l) Filterkammer appliziert wurde.

Die TER-Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt (n = 10).

Die Untersuchung des basolateralen Serumeffekts auf den TER der Endothelzellen, kultiviert in Hydrocortison-haltigem CDM zeigte, dass die Wirkung des Serums sukzessiv durch eine Steigerung der Hydrocortison-Konzentration gedämpft, aber dennoch deutlich detektierbar blieb (vergl. Abb. 3.6 A, 3.6 B und 3.6 C). Die vierstündige Inkubation der PBCEC mit hitzeinaktiviertem Serum von der basolateralen Filterseite führte ebenfalls zur Senkung des TERs, die allerdings weniger drastisch war, als nach der Zugabe des nicht hitzeinaktiviertem Serums. In der Abbildung 3.7 A und 3.7 B ist der Einfluss des hitzeinaktivierten und des nicht hitzeinaktivierten Serums in Anwesenheit von 550 nM Hydrocortison vergleichend dargestellt.

A

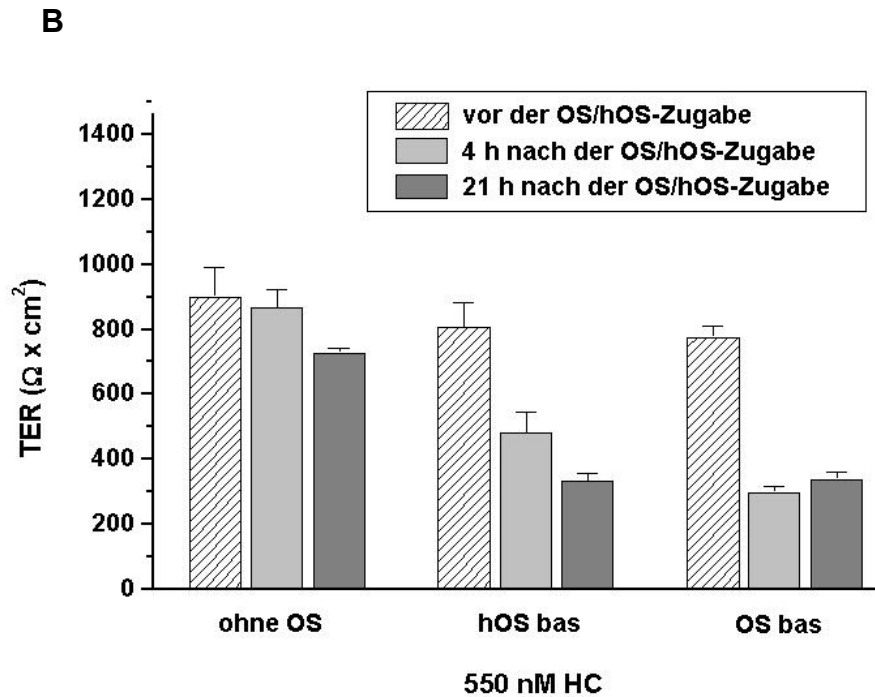


Abb. 3.7 A und B:

Der polare Einfluss von hitzeinaktiviertem Serum auf den TER der PBCEC.

A: Applikation des Serums in das apikale (ap) Filterkompartiment.

B: Applikation des Serums in das basolaterale (bas) Filterkompartiment.

Inkubationsmedium: Chemisch definiertes Medium (CDM) mit Zusatz von 550 nM Hydrocortison (HC). Die Messung erfolgte am 7. DIV, 4 h bzw. 21 h nach Zugabe des Serums in die apikale (ap) bzw. basolaterale (bas) Filterkammer. Als Serum diente 10 Vol. % Ochsen Serum (OS), das zuvor durch eine 30-minütige Inkubation bei 56 °C hitzeinaktiviert wurde (hitzeinaktiviertes Ochsen Serum (hOS)). Die TER-Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt (n = 10).

Der Effekt des Serums auf die Morphologie der PBCEC wurde zusätzlich mit Hilfe der ECIS-Technik unter Hydrocortison-freien Kulturbedingungen analysiert (s. Abb. 3.8). Da die Zellen direkt auf den Goldelektroden kultiviert wurden und eine basolaterale Serum-Applikation somit nicht möglich war, konnte der barriereschwächende basolaterale Serumeffekt im ECIS-Experiment nicht untersucht werden.

Der in Abbildung 3.8 dargestellte Einfluss des Serums auf die Parameter R_b , α und C_m der PBCEC zeigte, dass das Serum von der apikalen Zellseite zunächst innerhalb der ersten 1, 5 Stunden zu einer 50 %-igen Senkung von R_b führte. Der Parameter α wurde zeitgleich mit R_b auf ca. 70 % seines Ausgangswertes gesenkt, stieg allerdings schon nach ungefähr 50 Minuten wieder an und erreichte zusammen mit R_b in einem Zeitraum von 9 bis 10 Stunden wieder annähernd seinen Ausgangswert. Die Membrankapazität wurde durch die Serum-Applikation nicht beeinflusst. Wie die ECIS-Messung insgesamt zeigte, führte die Zugabe von Serum zu einer kurzfristigen und reversiblen Schwächung des Zell-Zell- und des Zell-Substrat-Kontakts der PBCEC.

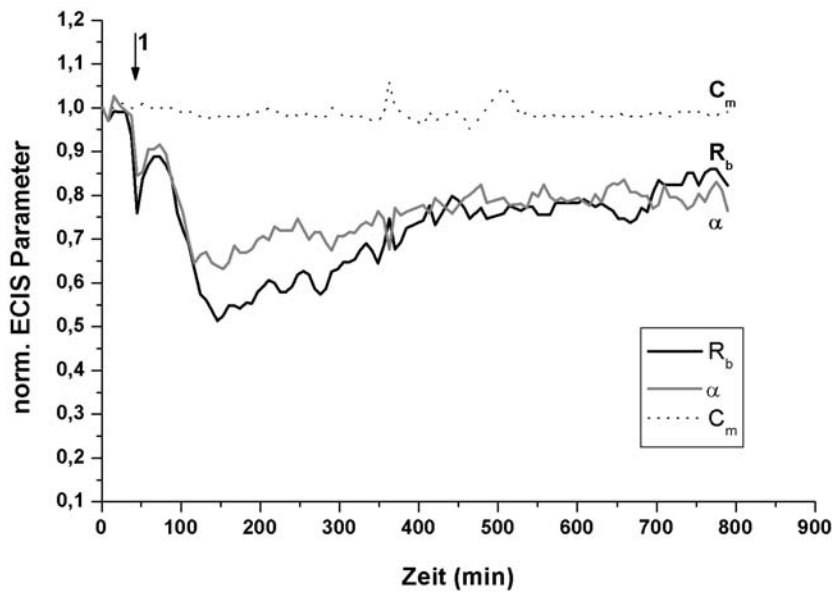


Abb. 3.8:

Der Einfluss des Serums auf die ECIS-Parameter R_b , α und C_m der PBCEC.

Zeitlicher Verlauf des Zell-Zell-Kontakts (R_b), der Membrankapazität (C_m) und des Zell-Substrat-Kontakts (α) nach Applikation von 10 Vol. % Ochsen Serum zu den PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC. Die Messung erfolgte am 7. DIV. Der eingezeichnete mit 1 versehene Pfeil markiert die Zugabe des Serums

$R_b(0) = 180 \Omega \times \text{cm}^2$; $\alpha(0) = 30 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ und $C_m(0) = 1,2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (A), $1,05 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$, $\alpha(0)$ und $C_m(0)$ normiert.

3.1.1.2 Ultrastrukturelle und immunzytochemische Untersuchung

Interessanterweise spiegeln sich die Ergebnisse der impedanzspektroskopischen Widerstandsmessungen exakt im morphologischen Zustand der cerebralen Endothelzellen unter den verschiedenen Kulturbedingungen wieder.

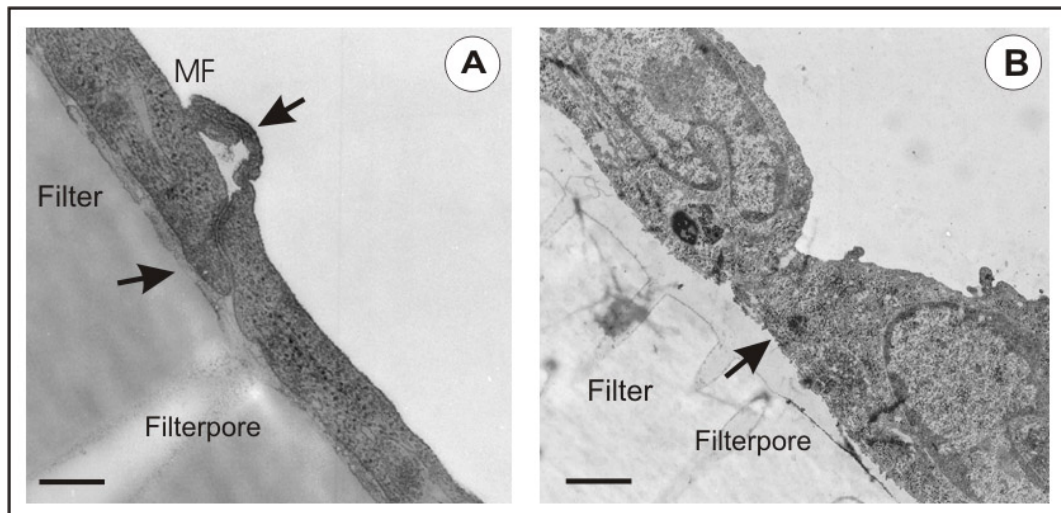


Abb. 3.9 A und B:

Vergleichende ultrastrukturelle Untersuchung der PBCEC

A: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der PBCEC, kultiviert in chemisch definiertem Medium (CDM) mit Zusatz von 550 nM Hydrocortison (HC).

Der Pfeil im unteren Bildabschnitt verdeutlicht den dichten Zell-Substrat-Kontakt. Die Ausstülpungen an den Zellgrenzen (Pfeil, oberer Bildabschnitt) werden als marginal folds (MF) bezeichnet.

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht 0, 2 μm .

B: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der PBCEC, die in chemisch definiertem Medium ohne Hydrocortisonzusatz kultiviert wurden. Es erfolgte eine 4-stündige Inkubation mit 10 Vol. % Ochsen Serum von der basolateralen Seite des Filtersystems.

Der Pfeil im unteren Bildabschnitt zeigt das Ablösen der Zellen vom Substrat; der rote Kreis verdeutlicht die Zell-Zell-Kontaktzone.

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht 0, 64 μm . (Da die Zellen durch die Anschwellung enorm vergrößert wurden, wurde die Bildvergrößerung um das 3-fache reduziert).

Die Fixierung der PBCEC zur TEM-Analyse erfolgte am 7. DIV.

Wie die TEM-Aufnahme in der Abbildung 3.9 A verdeutlicht, entwickelten die Endothelzellen im serumfreien, Hydrocortison-haltigem Medium eine klar definierte *tight junction*-Region, wiesen einen flächig langgestreckten Zellkörper auf und waren dicht an dem Kultursubstrat verankert. Ausschließlich unter serumfreien, Hydrocortison-haltigen Kulturbedingungen kam es zur Ausbildung der Ausstülpungen an den Zellgrenzen, den sogenannten *marginal folds*, die als typische *in vivo* Endothelzell-Strukturen gelten. Dieses morphologische Bild der PBCEC stand in unmittelbarem Zusammenhang mit den in Abbildung 3.5 B dargestellten ECIS-Parametern R_b (Zell-Zell-Kontakt) und α (Zell-Matrix-Kontakt) und den hohen TER-Filtermesswerten unter dieser Kulturbedingung.

Wie dagegen in der Abbildung 3.9 B zu sehen ist, verursachte der Serumzusatz in das basolaterale Filterkompartiment in Abwesenheit von Hydrocortison ein Ablösen der Zellen vom Substrat (s. Abb. 3.9 B, Pfeil), verbunden mit einem hypertonisch wirkenden Zellkörper. Darüber hinaus entwickelten die Zellen die *tight junction*-Region kaum. Der Vergleich der morphologischen Ausprägung der PBCEC mit den TER-Messergebnissen unter dieser Kulturbedingung demonstriert wiederum die Parallele

der elektronenmikroskopischen Beobachtungen mit den impedanzspektroskopischen Befunden.

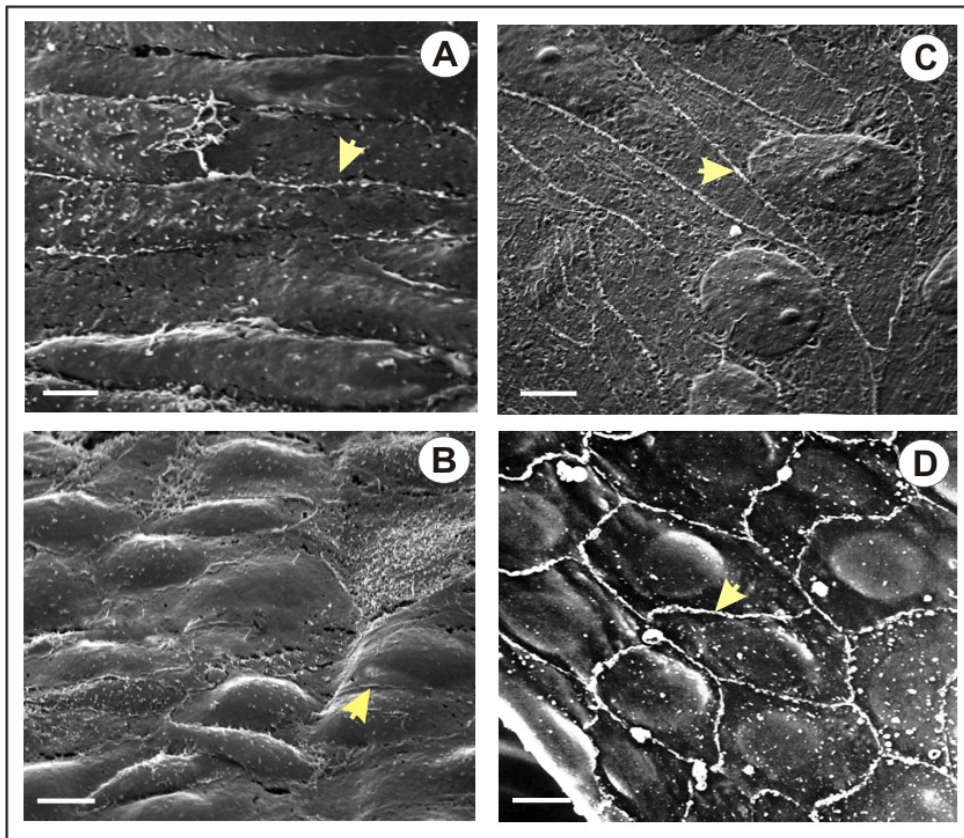


Abb. 3.10 A-D:

Vergleichende REM-Untersuchung der PBCEC mit Endothelzellen peripherer Gefäße in situ.

A: Aortaendothel vom Schwein, *in situ*.

B: Aortaendothel vom Schwein, *in situ*.

C: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison.

D: Endothelzellen einer kleinen Vene (Uterus, Ratte) *in vivo*. Quelle: T. Fujita et al (1986) "Zellen und Gewebe".

Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC), Zellkern (ZK). Die Pfeile in den Abbildungen zeigen die *marginal folds* der Endothelzellen.

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht in Abb. A, B und C 10 µm, in Abbildung D: 20 µm.

Der Vergleich der TEM-Aufnahmen mit den REM-Bildern der PBCEC unter den verschiedenen Kulturbedingungen zeigte ein identisches Bild in der Ausprägung der *marginal folds* (vergl. Abb. 3.9 und 3.10).

Die REM-Aufnahmen der PBCEC, kultiviert unter Hydrocortison-haltigen Kulturbedingungen zeigten, dass die *marginal folds* identisch wie die des gesunden Endothels *in vivo* ausgeprägt waren (vergl. Abb. 3.10 A und D mit 3.10 C). Die REM-Bilder des Aortenendothels des Schweins *in situ* wiesen ebenfalls die Endothel-spezifischen Strukturen an den Zellgrenzen auf.

Zusätzlich zu den TEM-Untersuchungen der PBCEC, die die morphologische Entwicklung der Endothelzellen jeweils unter den für sie günstigsten und ungünstigsten

Kulturbedingungen demonstrierten, wurden erweiternd REM-Studien weiterer Kulturbedingungen durchgeführt. Dabei stand die Ausprägung der Zellgrenzen im Fokus der Untersuchungen. Die Korrelation der morphologischen Ausprägung der *marginal folds* mit den impedanzspektroskopisch ermittelten TER-Filtermesswerten und dem ECIS-Parameter R_b wurden durch die impedanzspektroskopischen Analysen und die im Folgenden aufgeführten REM-Untersuchungen verdeutlicht (vergl. Abb. 3.2, 3.5, 3.6 und Abb. 3.11 und 3.12).

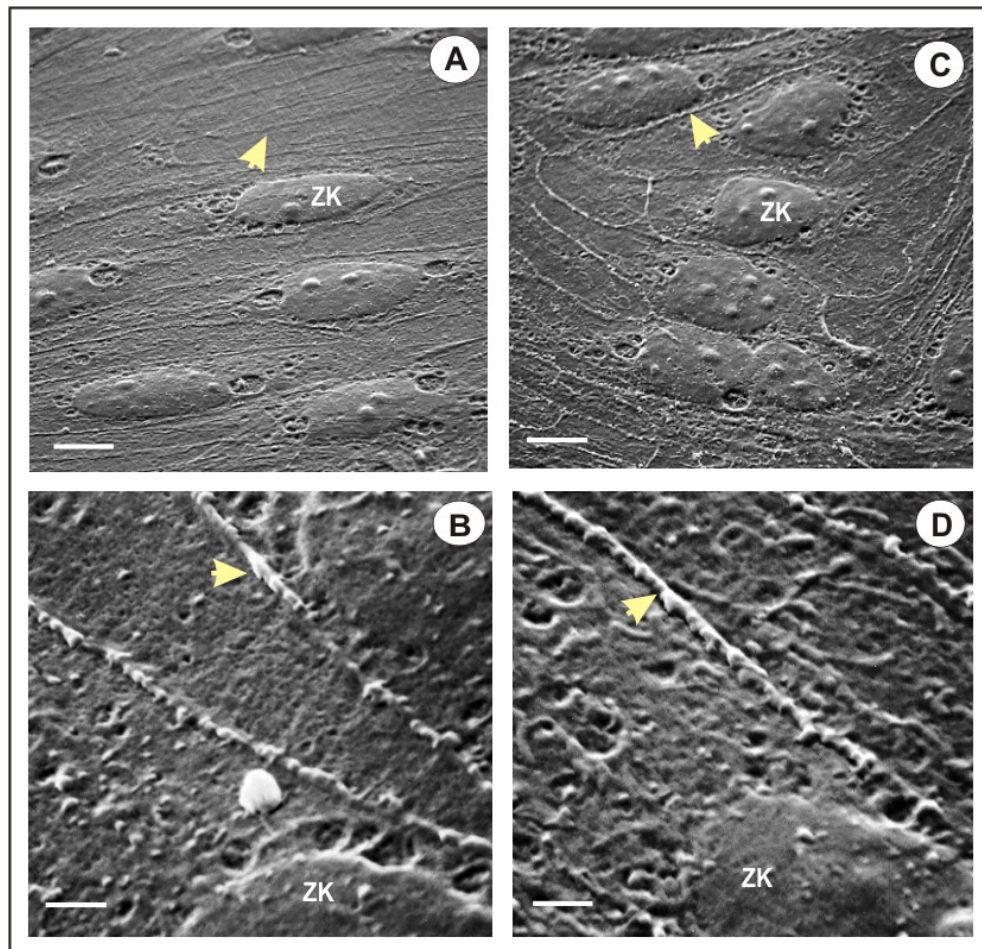


Abb. 3.11 A-D:

Vergleichende REM-Untersuchung der PBCEC unter verschiedenen Kulturbedingungen.

A: PBCEC, kultiviert in CDM ohne HC.

B: PBCEC, kultiviert in CDM mit 550 nM HC

C: PBCEC, kultiviert in CDM mit 55 nM HC.

D: PBCEC, kultiviert in CDM mit 55 nM HC.

Die Fixierung der PBCEC zwecks der REM-Analyse erfolgte am 7. DIV. Die Pfeile in den Abbildungen verdeutlichen die Zellgrenzen.

Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC), Zellkern (ZK).

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht in Abbildung A und B 8 μm und in Abbildung C und D 1,6 μm .

Die vergleichende Untersuchung der cerebralen Kapillarendothelzellen, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM bzw. 550 nM Hydrocortison, zeigte weder Unterschiede

in der Ausprägung der *marginal folds*, noch in der Entwicklung ihrer Zellmembranen (vergl. Abb. 3.11 B, C und D). Im Gegensatz dazu entwickelten die PBCEC in CDM ohne Hydrocortison-Zusatz die *marginal folds* an den Zellgrenzen nicht, bildeten aber dennoch einen gut entwickelten Zell-Monolayer aus (s. Abb. 3.11 A).

Diese Beobachtung korrelierte mit den TER-Messungen die zeigten, dass die PBCEC die Endothelzell-spezifischen *marginal folds* ausschließlich dann bildeten, wenn sie entsprechend hohe TER-Werte entwickelten. Die Zugabe von Serum in das Hydrocortison-haltige CDM des apikalen Filterkompartiments der PBCEC führte ebenfalls zur Ausbildung eines intakten Endothelzell-Monolayers mit einer deutlich erkennbaren Ausprägung der *marginal folds* (s. Abb. 3.12 D). Auch in Abwesenheit von Hydrocortison kam es durch die Applikation von Serum in das apikale Filterkompartiment zu einer normalen Entwicklung des cerebralen Endothelzell-Monolayers (s. Abb. 3.12 B).

Im Gegensatz dazu verursachte die Applikation des Serums in das CDM des basolateralen Filterkompartiments in Abwesenheit von Hydrocortison eine verminderte Zellintegrität des Endothelzell-Monolayers, die zu Präparations-bedingten Rissen zwischen den Zellen und zu einem partiellem Ablösen der Zellen vom Substrat führte (s. Abb. 3.12 C). Die Zugabe von Serum in das Hydrocortison-haltige CDM des basolateralen Filterkompartiments ließ zwar die Aufwölbungen an den Zellgrenzen verschwinden, jedoch blieben die Zellen auf dem Substrat der Filtermembran adhärent. Die Gegenüberstellung der Abbildungen 3.12 E und 3.12 F verdeutlicht nochmals die fehlenden *marginal folds* der Endothelzellgrenzen durch die Inkubation der PBCEC mit bzw. ohne Serum im basolateralen Filterkompartiment in Abwesenheit von Hydrocortison.

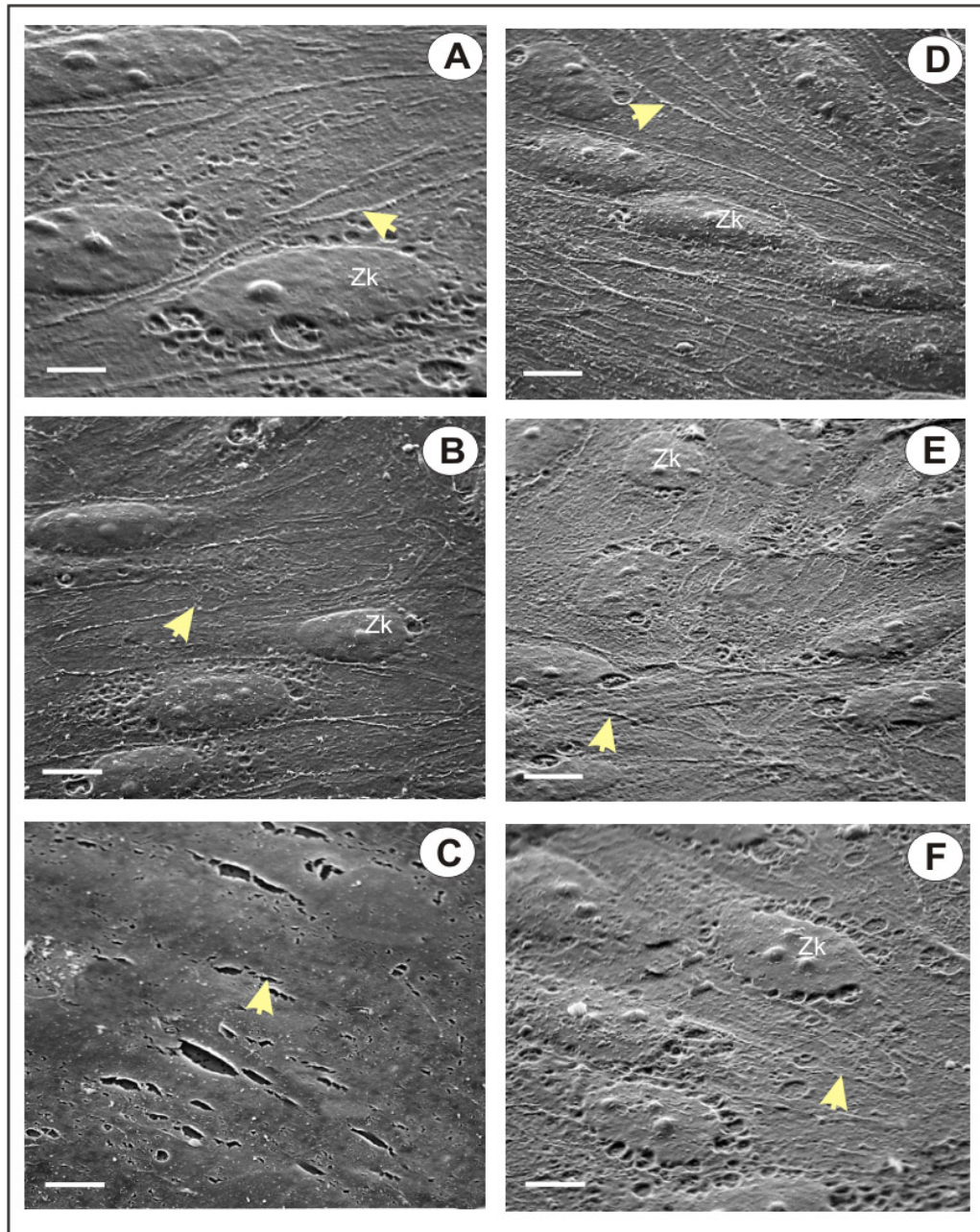


Abb. 3.12 A-F:

Der polare Einfluss von Serum und Hydrocortison auf die Morphologie der PBCEC.

A: PBCEC, kultiviert in CDM ohne Hydrocortison und ohne Serum.

B: PBCEC, kultiviert in CDM ohne Hydrocortison und 4-stündiger Inkubation mit 10 Vol. % Ochsen-serum von der apikalen Seite.

C: PBCEC, kultiviert in CDM ohne Hydrocortison und 4-stündiger Inkubation mit 10 Vol. % Ochsen-serum von der basolateralen Seite.

D: PBCEC, kultiviert in CDM mit 550 nM HC und 4-stündiger Inkubation mit 10 Vol. % Ochsen-serum von der apikalen Seite.

E: PBCEC, kultiviert in CDM mit 550 nM HC und 4-stündiger Inkubation mit 10 Vol. % Ochsen-serum von der basolateralen Seite.

F: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 550 nM HC und 4-stündiger Inkubation mit 10 Vol. Ochsen-serum von der basolateralen Seite.

Die Fixierung der PBCEC zwecks der REM-Analyse erfolgte am 7. DIV. Die Pfeile in den Abbildungen verdeutlichen die Zellgrenzen. Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC), Zellkern (ZK).

Vergrößerung: Die Maßstabsbalken in den Abbildungen A-D entsprechen 8 μ m. Die Maßstabsbalken in den Abbildungen E und F entsprechen 4 μ m.

Mit Hilfe der elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde der polare Serum-Effekt auf die Endothelzell-Morphologie, insbesondere auf die Zell-Zell-Kontaktzone der PBCEC analysiert und mit den impedanzspektroskopischen Ergebnissen in Korrelation gesetzt. Um im Detail den Einfluss der unterschiedlichen Kulturbedingungen und den polaren Effekt des Serums auf die interendothelialen Zell-Kontakte der PBCEC zu untersuchen, wurde die Expression der an den Zell-Zell-Kontakten beteiligten Proteine ZO-1, Occludin und Claudin-5 immunzytochemisch untersucht.

Der Vergleich der immunzytochemischen Analysen zeigte, dass unter Entzug des Hydrocortisons das ZO-1-Protein an den Zellgrenzen umstrukturiert wurde, so dass die Zellgrenzen dadurch verzerrt und schmaler wirkten. Ein ähnliches Bild ergab die immunzytochemische Analyse des Claudin-5-Proteins unter den verschiedenen Kulturbedingungen der PBCEC (vergl. Abb. 3.13 A-C und Abb. 3.13 D-E). Wie die immunzytochemischen Aufnahmen zeigen, wurde die Claudin-5-Expression durch den Entzug des Hydrocortisons im PBCEC-Kulturmedium im Vergleich zur ZO-1-Expression nicht in dem Maße beeinträchtigt. Die Expression des Occludins der PBCEC wurde im Vergleich zu der des ZO-1 und der des Claudin-5 durch die Abwesenheit von Hydrocortison im CDM geringfügiger beeinträchtigt (s. Abb. 3.14).

Durch den Entzug des Hydrocortisons veränderten die PBCEC zudem ihre Zellform, was besonders die ZO-1-Färbungen verdeutlichten. So wiesen die Endothelzellen in Anwesenheit von Hydrocortison im CDM eine deutlich erkennbare langgestreckte, spindelförmige Gestalt auf, wohingegen die Zellen in Abwesenheit von HC eine runde Zellform annahmen.

Der Serumzusatz in das Hydrocortison-haltige Kulturmedium in das apikale bzw. basolaterale Filterkompartiment verursachte keinen sichtbaren Unterschied in der ZO-1-, Claudin-5- und Occludin-Expression der PBCEC. Im Gegensatz dazu wirkten die Zellgrenzen in Abwesenheit von Hydrocortison durch die Inkubation der Endothelzellen mit serumhaltigen Medium von der basolateralen bzw. von beiden Seiten im Vergleich zur Inkubation der Zellen mit serumhaltigem Medium von der apikalen Filterseite verstärkt verzerrt (vergl. Abb. 3.15, 3.16 und 3.17).

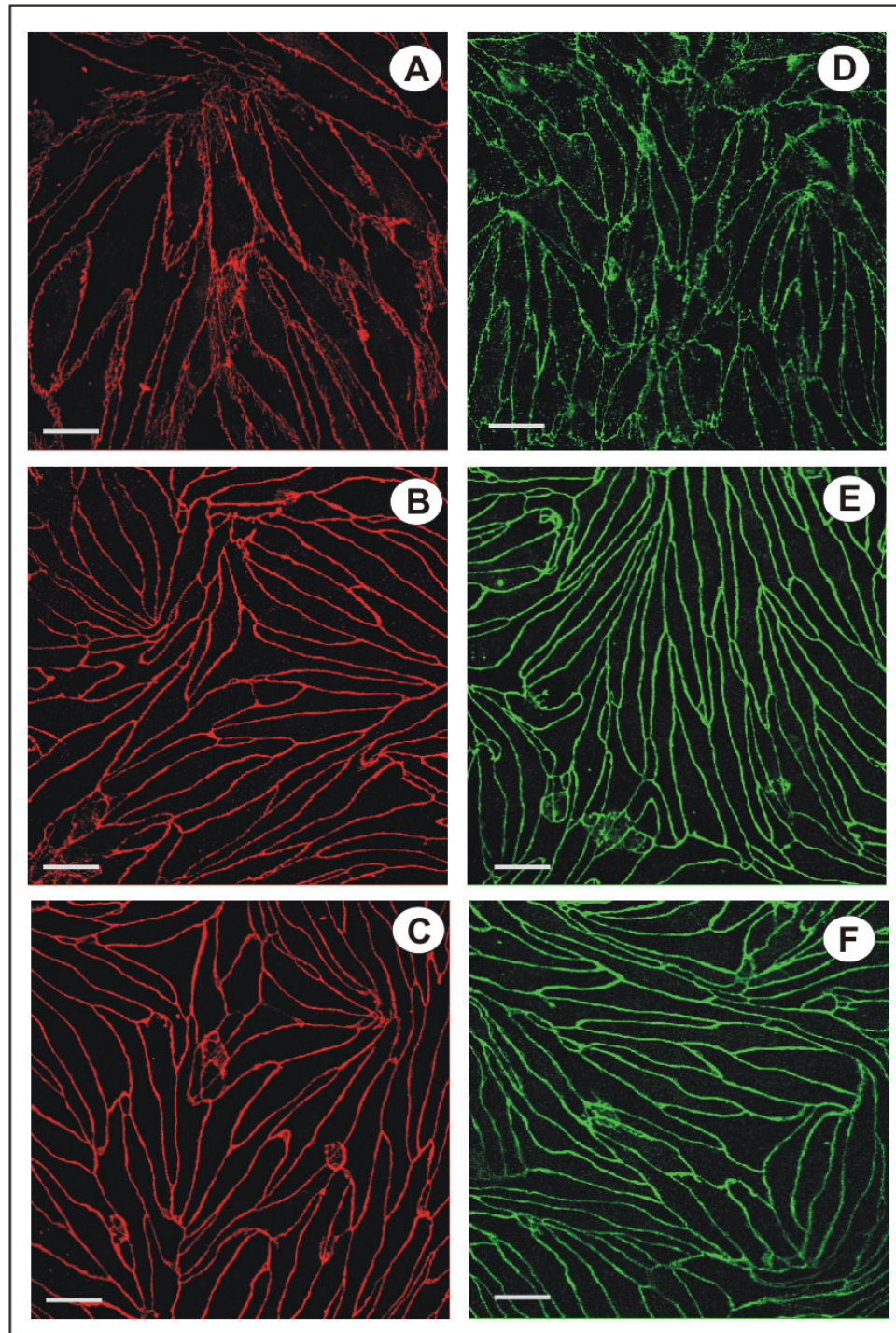


Abb. 3.13 A-F:

Immunzytochemische Analyse der tight junction-assoziierten Proteine ZO-1 (in rot) und Claudin-5 (in grün) der PBCEC unter verschiedenen Kulturbedingungen.

A: ZO-1-Expression der PBCEC, kultiviert in CDM ohne Zusatz von HC.

B: ZO-1-Expression der PBCEC, kultiviert in CDM mit 55 nM HC.

C: ZO-1-Expression der PBCEC, kultiviert in CDM mit 550 nM HC.

D: Claudin-5-Expression der PBCEC kultiviert in CDM ohne Zusatz von HC.

E: Claudin-5-Expression der PBCEC, kultiviert in CDM mit 55 nM HC.

F: Claudin-5-Expression der PBCEC, kultiviert in CDM mit 550 nM HC.

Die immunzytochemische Analyse der PBCEC erfolgte am 7. DIV. Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC).

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht 35 µm.

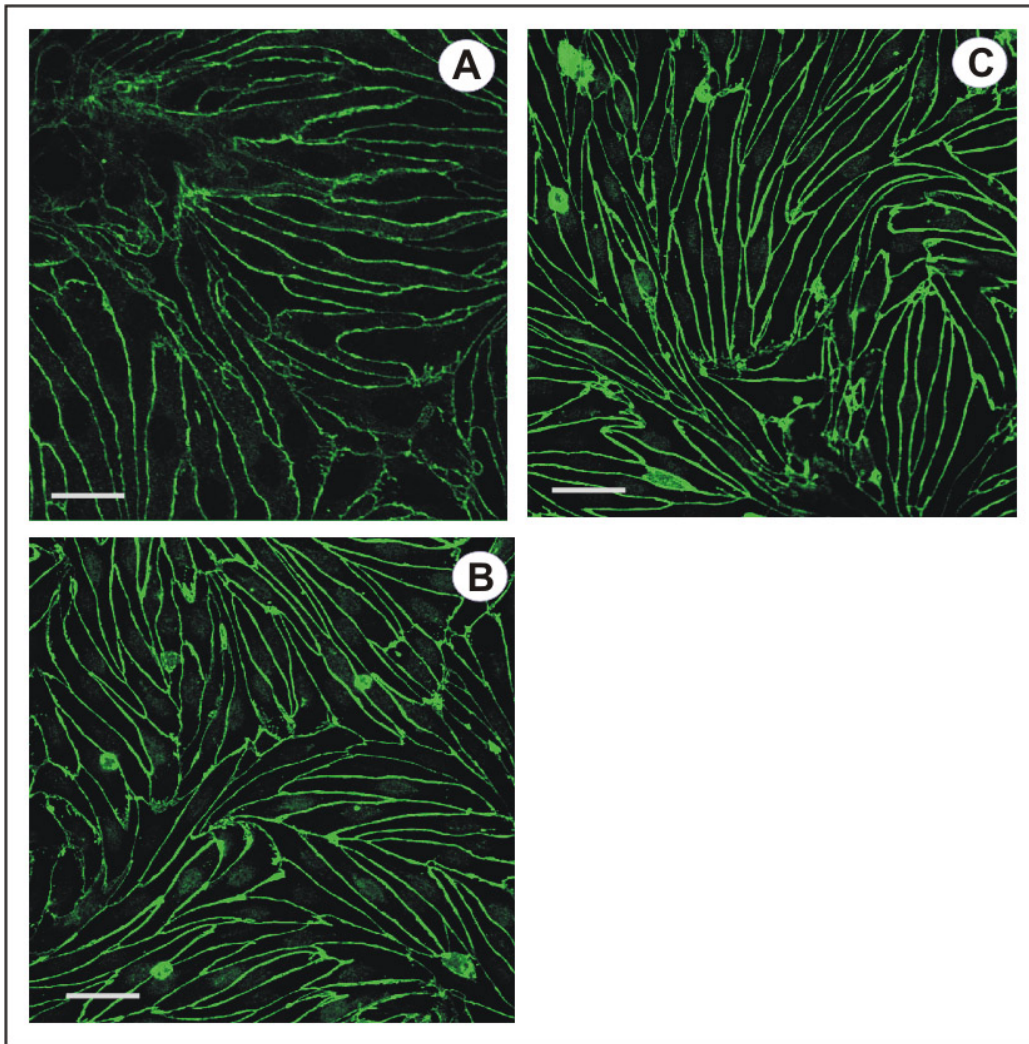


Abb. 3.14 A-C

Immunzytochemische Analyse des tight junction-assoziierten Proteins Occludin der PBCEC unter verschiedenen Kulturbedingungen.

A: PBCEC, kultiviert in CDM ohne Zusatz von HC.

B: PBCEC, kultiviert in CDM mit 55 nM HC.

C: PBCEC, kultiviert in CDM mit 550 nM HC.

Die immunzytochemische Analyse der PBCEC erfolgte am 7. DIV. Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC).

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht 35 μ m.

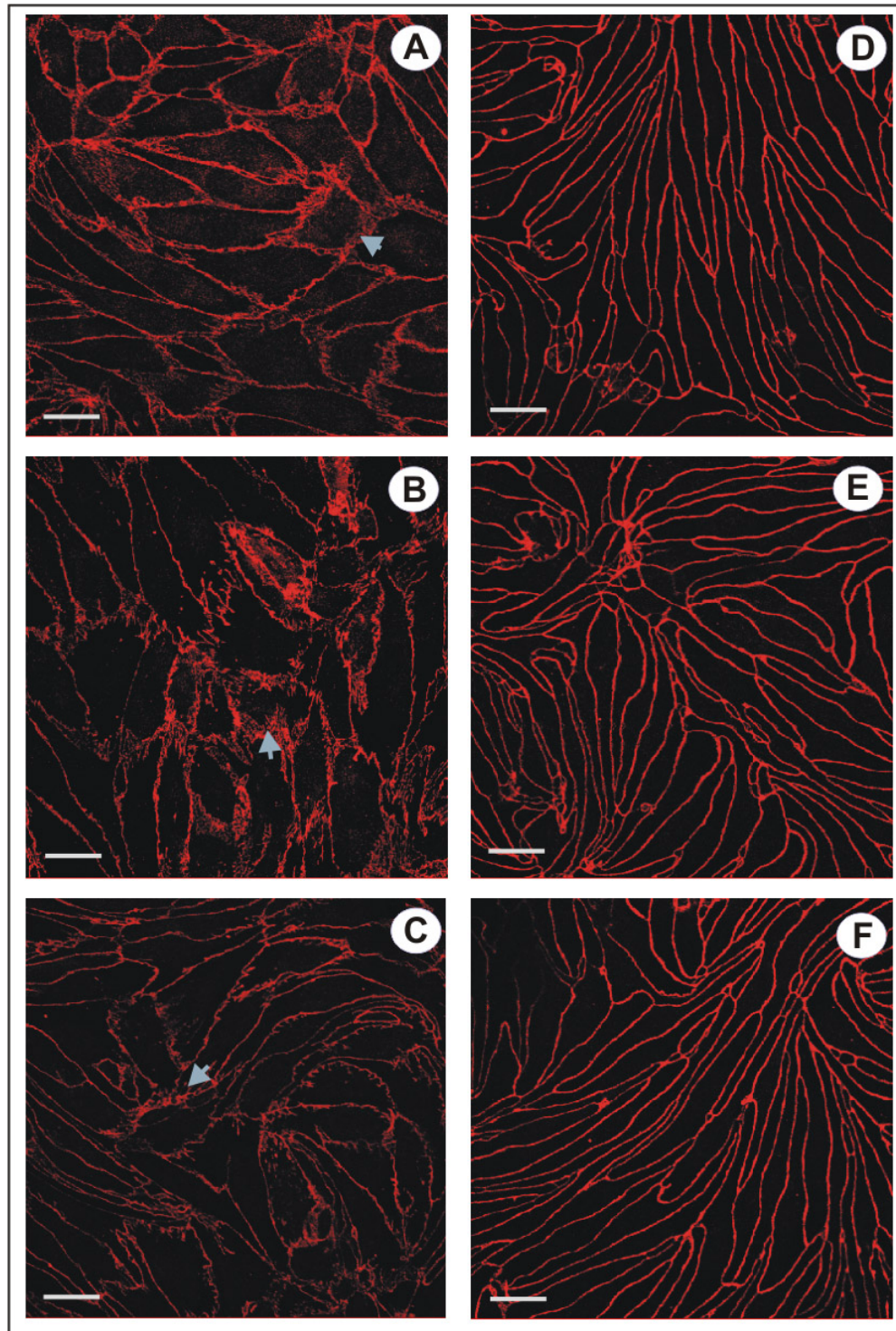


Abb. 3.15 A-F:

Der polare Einfluss des Serums auf die ZO-1-Expression der PBCEC.

A: Serum-Zusatz in die apikale Filterkammer (CDM ohne HC).

B: Serum-Zusatz in die basolaterale Filterkammer (CDM ohne HC).

C: Serum-Zusatz in die apikale und basolaterale Filterkammer (CDM ohne HC).

D: Serum-Zusatz in die apikale Filterkammer (CDM mit 550 nM HC).

E: Serum-Zusatz in die basolaterale Filterkammer (CDM mit 550 nM HC).

F: Serum-Zusatz in die apikale und basolaterale Filterkammer (CDM mit 550 nM HC).

Serum-Zusatz: 10 Vol. % Ochsen Serum (apikal: 50 μ l, basolateral: 150 μ l). Die immunzytochemische Analyse der PBCEC erfolgte am 7. DIV. Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC). Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht 25 μ m.

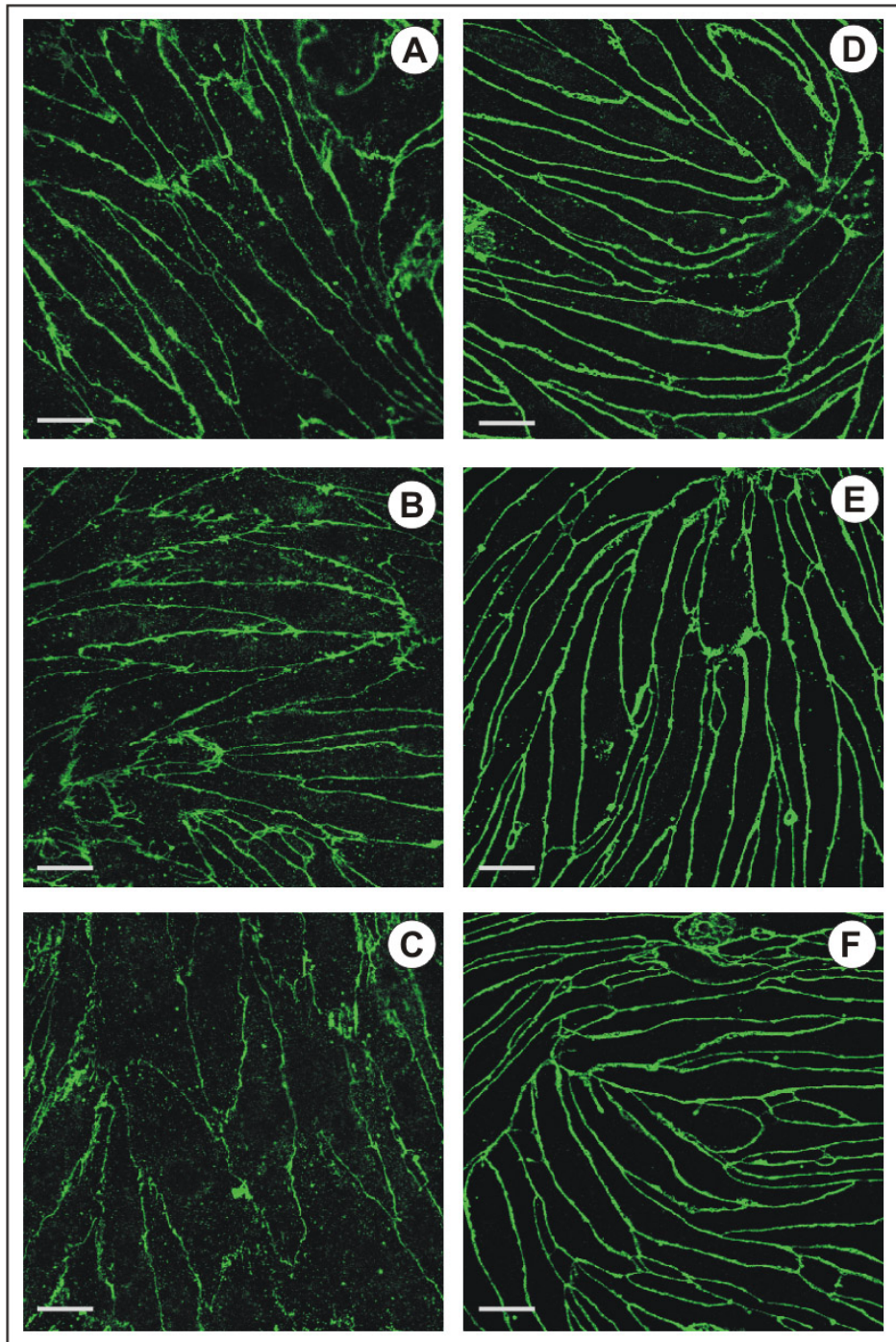


Abb. 3.16 A-F:

Der polare Einfluss des Serums auf die Claudin-5-Expression der PBCEC.

- A:** Serum-Zusatz in die apikale Filterkammer (CDM ohne HC).
- B:** Serum-Zusatz in die basolaterale Filterkammer (CDM ohne HC).
- C:** Serum-Zusatz in die apikale und basolaterale Filterkammer (CDM ohne HC).
- D:** Serum-Zusatz in die apikale Filterkammer (CDM mit 550 nM HC).
- E:** Serum-Zusatz in die basolaterale Filterkammer (CDM mit 550 nM HC).
- F:** Serum-Zusatz in die apikale und basolaterale Filterkammer (CDM mit 550 nM HC).

Serum-Zusatz: 10 Vol. % Ochsen Serum (apikal: 50 μ l, basolateral: 150 μ l). Die immunzytochemische Analyse der PBCEC erfolgte am 7. DIV. Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC). Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht 25 μ m.

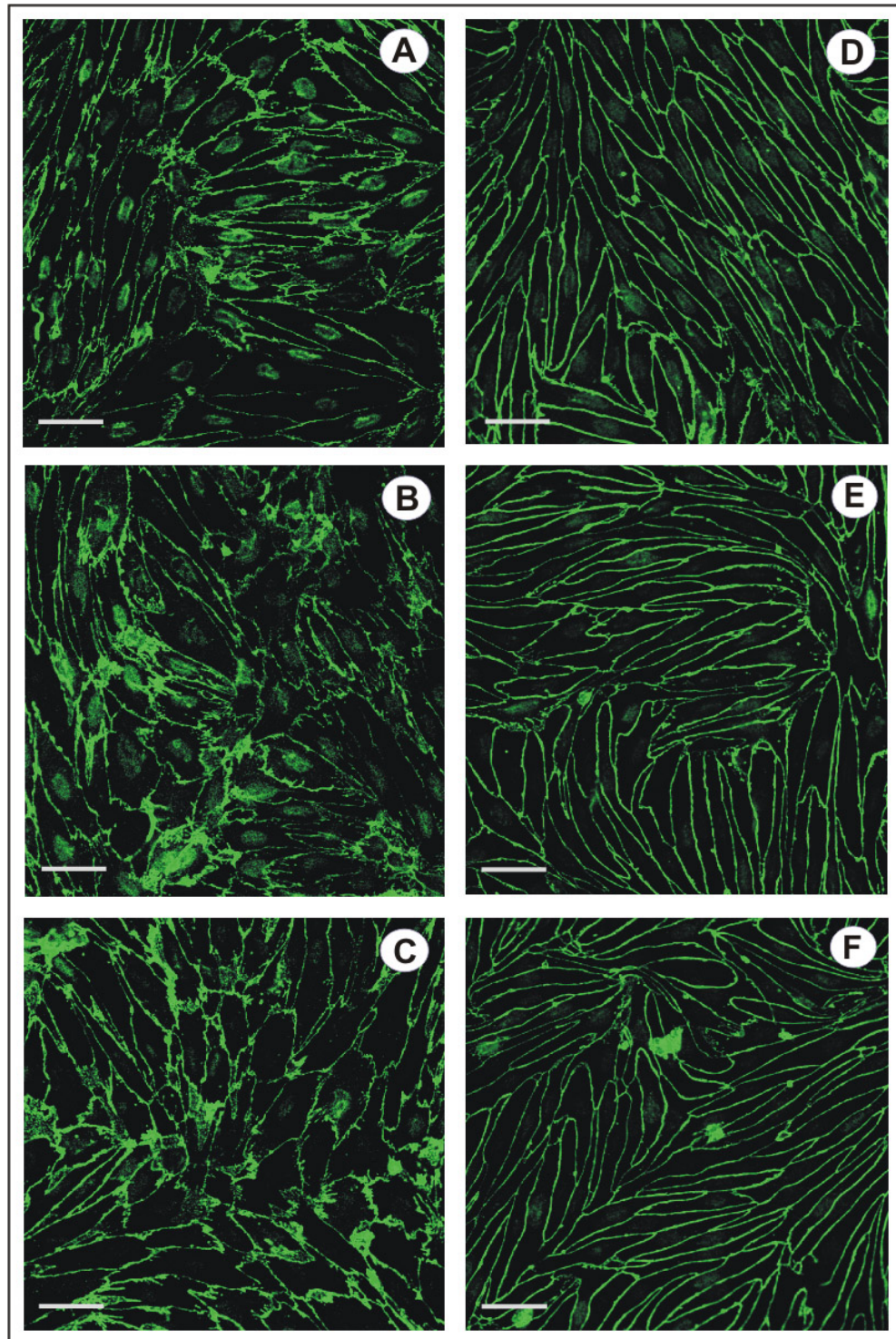


Abb 3.17 A-F:

Der polare Einfluss des Serums auf die Occludin-Expression der PBCEC.

A: Serum-Zusatz in die apikale Filterkammer (CDM ohne HC).

B: Serum-Zusatz in die basolaterale Filterkammer (CDM ohne HC).

C: Serum-Zusatz in die apikale und basolaterale Filterkammer (CDM ohne HC).

D: Serum-Zusatz in die apikale Filterkammer (CDM mit 550 nM HC).

E: Serum-Zusatz in die basolaterale Filterkammer (CDM mit 550 nM HC).

F: Serum-Zusatz in die apikale und basolaterale Filterkammer (CDM mit 550 nM HC).

Serum-Zusatz: 10 Vol. % Ochsen Serum (apikal: 50 μ l, basolateral: 150 μ l). Die immunzytochemische Analyse der PBCEC erfolgte am 7. DIV. Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC). Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht 25 μ m.

3.1.1.3 Apoptose-Studien

Zur Charakterisierung des Transmigrationsweges der Leukozyten durch den cerebralen Kapillarendothelzell-Monolayer war eine vollkommen intakte Endothelzell-Zellschicht die grundlegende Voraussetzung. Mit dem bisher aufgeführten Methodenspektrum war es möglich, die Integrität der Endothelzellen biophysikalisch, ultrastrukturell und immunzytochemisch zu beschreiben. Jedoch konnte keine Aussage darüber getroffen werden, inwieweit allein durch die Kulturbedingung der PBCEC apoptotische Prozesse in den Endothelzellen induziert wurden. So wurde beispielsweise trotz der hohen TER-Werte der PBCEC, die in CDM mit Zusatz von SR II (*Serum Replacement II*) kultiviert wurden, eine stark erhöhte Apoptoserate in den Endothelzellen detektiert (vergl. Abb. 3.1 und 3.18 bzw. 3.19). Das verdeutlichte, dass die Befunde der impedanzspektroskopischen und morphologischen Analysen keine Aussage über die Apoptoserate in den Endothelzellen zuließen. Da jedoch sichergestellt werden musste, dass nicht schon vor Induzierung eines entzündlichen Prozesses in den PBCEC bzw. vor deren Inkubation mit den Immunzellen apoptotische Prozesse eingeleitet wurden, wurden vor dem Einsatz der PBCEC zur Untersuchung der Endothelzell-Leukozyten-Interaktion Apoptose-Untersuchungen durchgeführt. Zudem wurde mit Hilfe der ECIS-Technik der Effekt einer Apoptose-induzierenden Substanz auf die barrierebildenden Zell-Zell- und Zell-Substrat-Kontakte der PBCEC vergleichend unter verschiedenen Kulturbedingungen analysiert.

Diese Untersuchungen zeigen erstmals, in welchem hohem Maße die Ausprägung und damit verbunden die Empfindlichkeit der Barrierefunktion gegenüber externen Stimuli durch die Kulturbedingung gesteuert wird und unterstreichen somit die Relevanz einer derartigen Voruntersuchung für die folgenden *in vitro*-Studien. Da in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Entzündungsstimulantien allein und im Kontext der Leukozyten-Interaktion auf die Barrierefunktion der BHS studiert wurde, war es essentiell, vorab der Experimente zu untersuchen, welchen Einfluss die Kulturbedingung auf die Empfindlichkeit der barrierebildenden Zell-Zell- und Zell-Substrat-Kontakte gegenüber externen Reizen generell ausübte.

Caspase-3-Assay und DNA-Fragmentierung

Die im Folgenden aufgeführten Untersuchungen sollten zeigen, ob und in welcher Intensität die unterschiedlichen Kulturbedingungen Apoptose in den PBCEC induzieren. Zu diesem Zweck wurde zum einen ein Caspase-3-Assay durchgeführt und zum anderen der Anteil fragmentierter DNA in den Endothelzellen bestimmt.

Das Enzym Caspase-3 zählt zu den Effektor-Caspasen und wird im Verlauf apoptotischer Prozesse aktiviert. Die Bestimmung ihrer Aktivität diente somit als quantitatives

Maß für die Apoptoserate. Zur Verifizierung der Versuchsergebnisse des Caspase-3-Assays diente der Nachweis von spezifischen DNA-Bruchstücken (*DNA-ladder*). Die vergleichende Analyse sowohl der Caspase-3-Aktivität als auch der Nachweis der DNA-Fragmente zeigte, dass der Zusatz von Hydrocortison und/oder Serum zum chemisch definierten Medium (von der apikalen Zellseite) die Apoptoserate signifikant senkte. Dagegen wurde die Apoptoserate der PBCEC in CDM ohne Zusätze und durch den Zusatz von SR II ins Inkubationsmedium erheblich erhöht (s. Abb. 3.18 und 3.19).

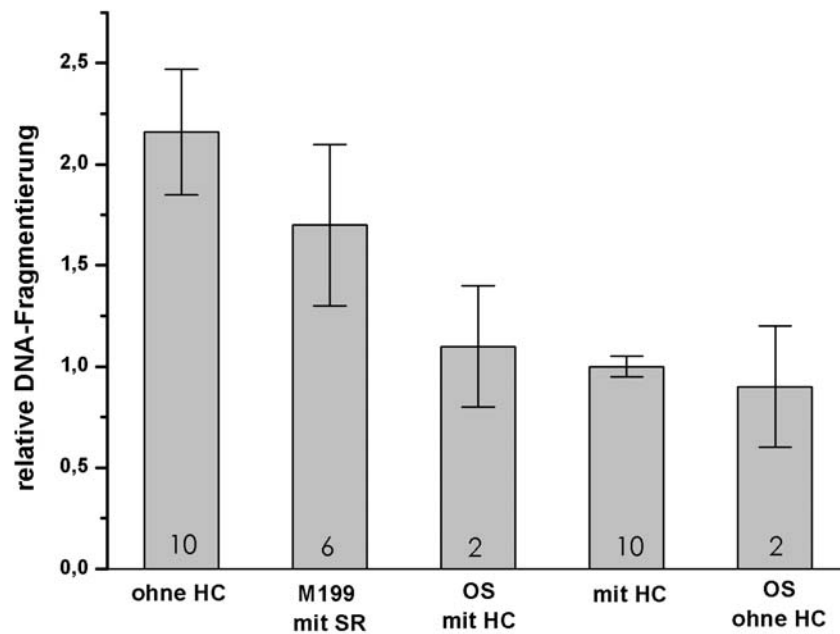


Abb. 3.18:

Relative DNA-Fragmentierung der PBCEC unter verschiedenen Kulturbedingungen.

Inkubationsmedium der PBCEC: CDM ohne (*ohne HC*) bzw. mit Zusatz von 550 nM HC (*mit HC*), CDM ohne HC-Zusatz mit 10 Vol. % Ochsenserum (*OS ohne HC*), CDM mit 550 nM HC und 10 Vol. % OS (*OS mit HC*), M 199 (Grundmedium) mit Zusatz von 5 % SR II (*M 199 mit SR*). Die Kultur der PBCEC erfolgte in 10 cm² Petrischalen.

Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC), Ochsenserum (OS), M 199 Earle (1 x) (M 199), Serum Replacement II (SR).

Die Messwerte sind angegeben als Mittelwerte +/- Standardabweichung, n = Zahlen innerhalb der Balken.

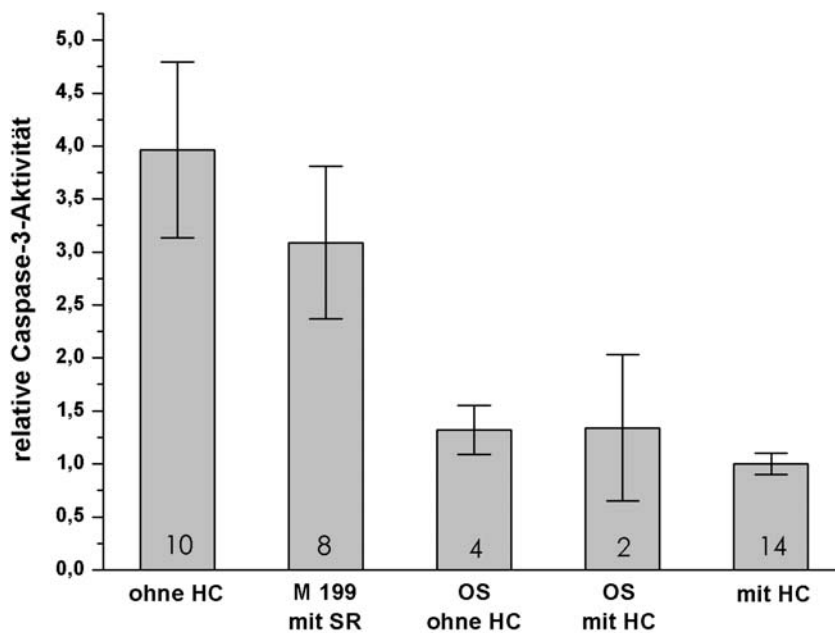


Abb. 3.19:

Relative Caspase-3-Aktivität der PBCEC unter verschiedenen Kulturbedingungen.

Inkubationsmedium der PBCEC: CDM ohne (ohne HC) bzw. mit Zusatz von 550 nM HC (mit HC), CDM ohne HC-Zusatz mit 10 Vol. % Ochsenserum (OS ohne HC), CDM mit 550 nM HC und 10 Vol. % OS (OS mit HC), M 199 (Grundmedium) mit Zusatz von 5 % SR II (M 199 mit SR). Die Kultur der PBCEC erfolgte in 10 cm² Petrischalen.

Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC), Ochsenserum (OS), M 199 Earle (1 x) (M 199), Serum Replacement II (SR).

Die Messwerte sind angegeben als Mittelwerte +/- Standardabweichung, n = Zahlen innerhalb der Balken.

Die in Abbildung 3.20 dargestellte Caspase-3-Aktivitätsmessung zeigte, dass eine Erniedrigung der Hydrocortison-Konzentration im Kulturmedium auf 55 nM die Apoptoserate nicht steigerte und eine Erhöhung der HC-Konzentration auf 550 bzw. 5500 nM nicht zu einer signifikant gesenkten Apoptoserate führte.

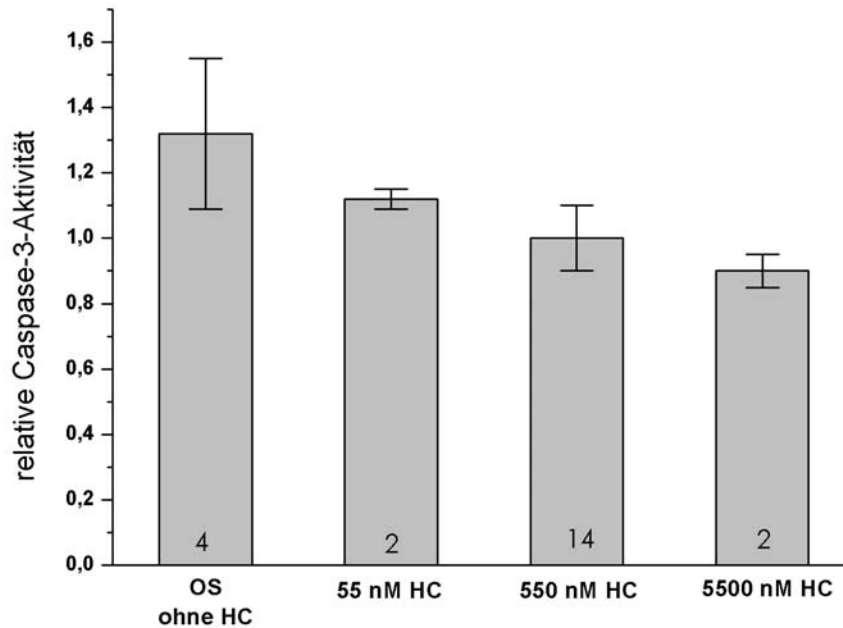


Abb. 3.20:

Bestimmung der relativen Caspase-3-Aktivität der PBCEC unter verschiedenen Hydrocortison-Konzentrationen bzw. Serumzusatz im CDM.

Inkubationsmedium: CDM mit Zusatz der in der Grafik aufgeführten Konzentrationen an Hydrocortison bzw. 10 Vol. % Ochsen Serum in Abwesenheit von HC (OS ohne HC). Die Kultur der PBCEC erfolgte in 10 cm² Petrischalen.

Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC), Ochsen Serum (OS)

Die Messwerte sind angegeben als Mittelwerte +/- Standardabweichung, n = Zahlen innerhalb der Balken.

Cycloheximid-induzierte Apoptose

Der kausale Zusammenhang zwischen einer erhöhten Apoptoserate der PBCEC in An- oder Abwesenheit von Hydrocortison bzw. Serum wurde ermittelt, indem durch die Applikation von Cycloheximid (CHX) die Apoptose in den cerebralen Kapillarendothelzellen gezielt chemisch induziert wurde.

Um eine optimale Inkubationszeit des CHX zu ermitteln, wurde zeitabhängig die Apoptoserate im Caspase-3-Assay unter Hydrocortison-haltigen Kulturbedingungen der PBCEC bestimmt (s. Abb. 3.21). Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden wurde eine 50-fach erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu den unbehandelten Zellen gemessen, so dass diese Inkubationszeit für die weiterführenden induzierten Apoptose-Bestimmungen gewählt wurde. Eine Inkubationszeit des CHX, die die 16 Stunden überschritt führte zum Ablösen der Endothelzellen von ihrem Substrat, so dass die Einwirkzeit des CHX für die folgenden Experimente zeitlich auf maximal 16 Stunden limitiert wurde.

Der Einsatz von CHX als Apoptose-Induktor zeigte sowohl im Hinblick auf die Bestimmung der Caspase-3-Aktivität als auch durch die Messung der DNA-Fragmentierung in Abhängigkeit von der jeweiligen Kulturbedingung, dass durch Hydrocortison oder Serum im Vergleich zur Kultivierung der Zellen in CDM ohne Zusätze die Apoptoserate jeweils um 50 % inhibiert wurde (s. Abb. 3.22 A und B).

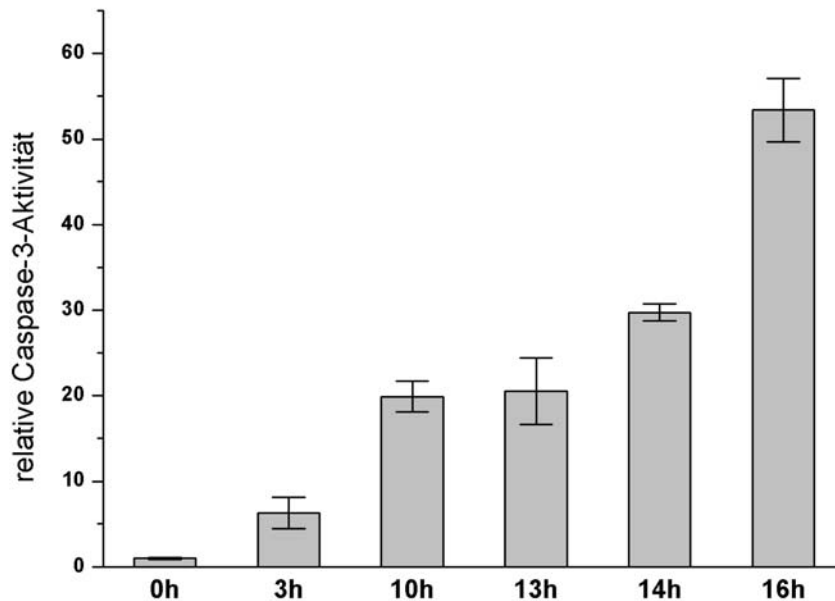


Abb. 3.21:

Bestimmung der relativen Caspase-3-Aktivität der PBCEC nach 0-, 3-, 10-, 13- und 16-stündiger Inkubation mit CHX.

Kulturmedium: chemisch definiertes Medium mit 550 nM HC. CHX-Zugabe: 25 μ g. Die Kultur der PBCEC erfolgte in 10 cm² Petrischalen.

Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC), Ochsen Serum (OS), Cycloheximid (CHX). Die Messwerte sind angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichung; n = 2.

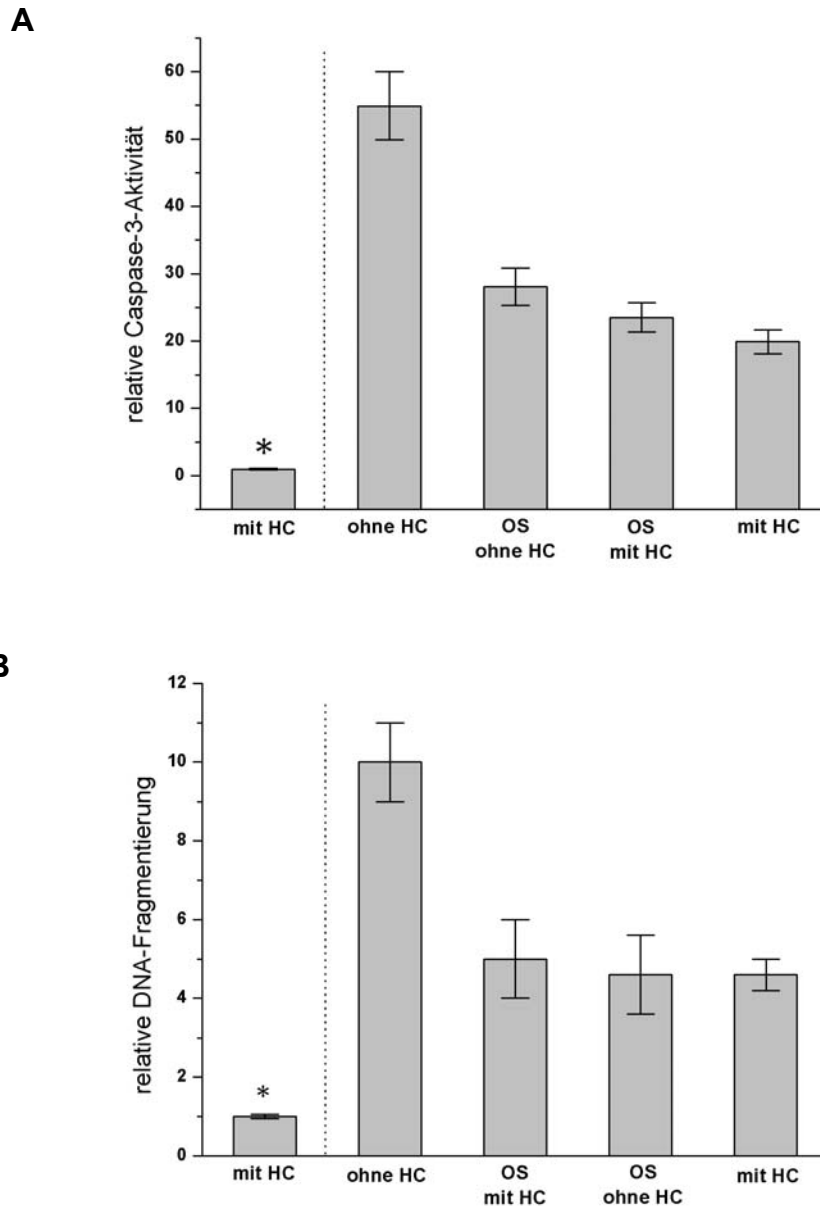


Abb. 3.22 A und B:

Bestimmung der relativen Caspase-3-Aktivität (A) und der relativen DNA-Fragmentierung (B) der PBCEC nach 16-stündiger Inkubation mit CHX unter verschiedenen Kulturbedingungen.

Die Kultur der PBCEC erfolgte in 10 cm² Petrischalen. Kulturmedium: CDM ohne bzw. mit Zusatz von 550 nM Hydrocortison und mit/ohne Zusatz von 10 Vol. % Ochsenserum (s. Graphik).

Kulturbedingungen der PBCEC:

ohne HC: chemisch definiertes Medium ohne Zusatz von HC oder OS, OS mit HC: chemisch definiertes Medium mit Zusatz von 550 nM HC und 10 Vol. % OS, OS ohne HC: chemisch definiertes Medium mit Zusatz von 10 Vol. % OS, mit HC: chemisch definiertes Medium mit 550 nM HC, * mit HC: chemisch definiertes Medium mit 550 nM HC ohne CHX-Zugabe (Kontrolle). CHX-Zugabe: 25 µg.

Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC), Ochsenserum (OS), Cycloheximid (CHX).

Die Messwerte sind angegeben als Mittelwerte +/- Standardabweichung, n = 2.

Der Einfluss von Cycloheximid auf die PBCEC-Morphologie

Mit Hilfe der ECIS-Technik sollte der Verlauf der Apoptose im Hinblick auf strukturelle sowie funktionelle Veränderungen der Zellmorphologie zeitaufgelöst verfolgt werden. Die Veränderung der Werte für R_b und α nach der CHX-Zugabe differierten stark unter den verschiedenen Versuchsbedingungen. Die Studien zeigten, dass die barrierebildenden *tight junctions* der PBCEC bereits in einem sehr frühen Stadium der Apoptose massiv gestört wurden, was sich in einem raschen Absinken der Werte des Parameters R_b äußerte, wohingegen der Wert des Parameters α deutlich langsamer reduziert wurde. Dieser zeitlich differente Verlauf der beiden Parameter R_b und α nach der CHX-Zugabe, der sich in der primären Schwächung der Zell-Zell-Kontakte und dem sich erst mehrere Stunden danach lösenden Zell-Substrat-Kontakten der PBCEC äußerte, war besonders unter serumhaltigen Kulturbedingungen zu beobachten. Dagegen kam es in Abwesenheit von Serum im Kulturmedium der PBCEC in der Anfangsphase (ca. 50 Minuten nach CHX-Zugabe) zu einem gemeinsamen Abfall der Werte für R_b und α . Dieser Effekt wurde durch den Zusatz von Hydrocortison noch weiter verstärkt. Die Abbildungen 3.23 bis 3.26 zeigen den Verlauf der ECIS-Messwerte des Zell-Zell- und des Zell-Substrat-Kontakts der PBCEC im zeitlichen Verlauf nach Applikation des CHX unter verschiedenen Kulturbedingungen.

In der Abbildung 3.23 ist der Kurvenverlauf der Parameter-Werte für R_b und α nach der Zugabe zu den in CDM ohne Hydrocortison- und Serum-Zusatz kultivierten PBCEC dargestellt. Die Abbildung zeigt deutlich, dass der Wert von R_b nach Zusatz von CHX zu den PBCEC, die in Abwesenheit von Hydrocortison und Serum kultiviert wurden sehr schnell, innerhalb der ersten 3 Stunden abfiel. Bereits $68 (\pm 9)$ Minuten nach der CHX-Zugabe wurde der Ausgangswert von $295 (\pm 49) \Omega \times \text{cm}^2$ um die Hälfte reduziert, wohingegen die Werte des Parameters α deutlich langsamer sanken. Erst nach $156 (\pm 58)$ Minuten war der Wert auf 50% des Anfangswertes von $37 (\pm 4,8) \Omega^{0,5} \times \text{cm}$ gesunken. Interessanterweise kam es im Verlauf der ersten Stunde nach Zugabe des CHX zu den PBCEC zu einer gemeinsamen Schwächung des Zell-Zell- und des Zell-Substrat-Kontakts, so dass der Kurvenverlauf von α und R_b parallel verlief. Nach ca. 3 Stunden kam es dann zu einer deutlichen Trennung des Kurvenverlaufs der beiden Parameter, der sich in einer unvermindert starken Senkung von R_b manifestierte, wohingegen sich die Reduzierung von α wesentlich verlangsamt und dadurch insgesamt im Gegensatz zu R_b einen zweistufigen Kurvenverlauf aufwies.

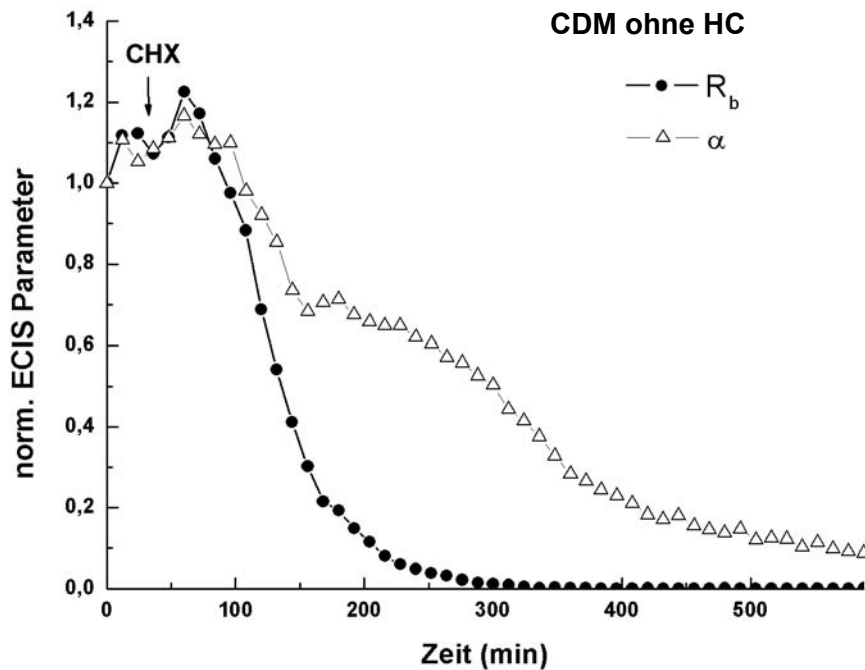


Abb. 3.23:

Typischer Verlauf der Parameter R_b und α der in CDM ohne HC-Zusatz kultivierten PBCEC nach CHX-Zugabe.

$R_b(0) = 220 \Omega \times \text{cm}^2$ und $\alpha(0) = 30 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$ bzw. $\alpha(0)$ normiert.

Kulturmedium: CDM ohne HC. Der Pfeil markiert die Zugabe des CHX ($25 \mu\text{M}$). Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC), Cycloheximid (CHX), Zell-Zell-Kontakt (R_b), Zell-Substrat-Kontakt (α).

Die CHX-Zugabe in das serumhaltige CDM der PBCEC in Abwesenheit von Hydrocortison, dargestellt in Abbildung 3.24, führte ebenfalls zu einem schnellen Abfall des Widerstands der Zell-Zell-Kontakte, der allerdings im Vergleich zur Kulturbedingung ohne Serum-Zusatz ca. 50% langsamer verlief. Nach $150 (\pm 8)$ Minuten erreichte R_b die Hälfte seines Ausgangswertes von $136 (\pm 2,8) \Omega \times \text{cm}^2$. Der zeitliche Verlauf von α unterschied sich wesentlich deutlicher zu den in CDM ohne Serum- und Hydrocortison-Zusatz kultivierten PBCEC. Bis zu 100 Minuten nach CHX-Zusatz blieben die Werte von α im Gegensatz zu den R_b -Werten nahezu konstant, bevor sie sehr langsam aber stetig abfielen. Erst $588 (\pm 17)$ Minuten nach der Applikation von CHX erreichte der Wert des Zell-Substrat-Kontakts α die Hälfte seines Anfangswertes von $25 (\pm 0,2) \Omega^{0.5} \times \text{cm}$. Im Gegensatz zum Verlauf der Werte von R_b und α unter den nicht serumhaltigen Kulturbedingungen, kam es in Anwesenheit von Serum zu einem biphasischen Kurvenverlauf von R_b anstatt von α , wie es in den serumfreien Kulturbedingungen nachgewiesen werden konnte.

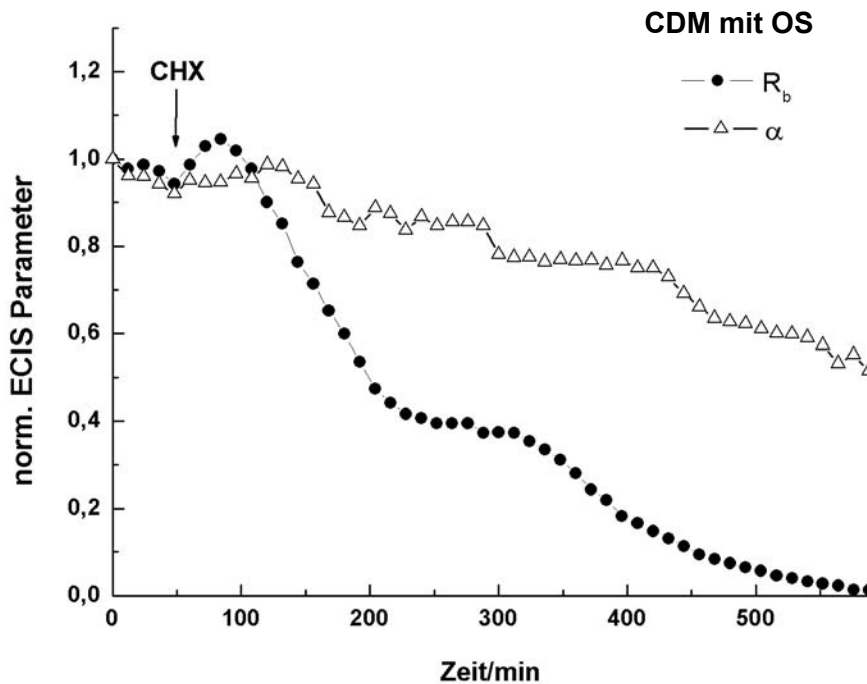


Abb. 3.24:

Typischer Verlauf der Parameter R_b und α der in CDM mit OS kultivierten PBCEC nach der CHX-Zugabe.

$R_b = 134 \Omega \times \text{cm}^2$ und $\alpha = 30 \Omega^{0,5} \times \text{cm}$ geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$ bzw. $\alpha(0)$ normiert. Kulturmedium: CDM ohne HC mit 10 Vol. % OS.

Der Pfeil markiert die Zugabe des CHX ($25 \mu\text{M}$). Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC), Ochsenserum (OS), Cycloheximid (CHX), Zell-Zell-Kontakt (R_b), Zell-Substrat-Kontakt (α).

Wie Abbildung 3.25 zeigt, nahmen die Werte des Zell-Substrat-Kontakts (α) nach der Zugabe des CHX in das Hydrocortison-haltige CDM in Anwesenheit von Serum langsamer ab als die des Zell-Zell-Kontakts (R_b). Während die Hälfte des jeweiligen Ausgangswertes von R_b ($211 \pm 11,3 \Omega \times \text{cm}^2$) bereits nach $220 (\pm 25)$ Minuten erreicht wurde, wurde α erst nach $396 (\pm 55)$ Minuten auf die Hälfte seines Anfangswertes von $32 \pm 3,9 \Omega^{0,5} \times \text{cm}$ reduziert. Ein zweistufiger Kurvenverlauf von R_b und α konnte unter dieser Kulturbedingung nicht beobachtet werden.

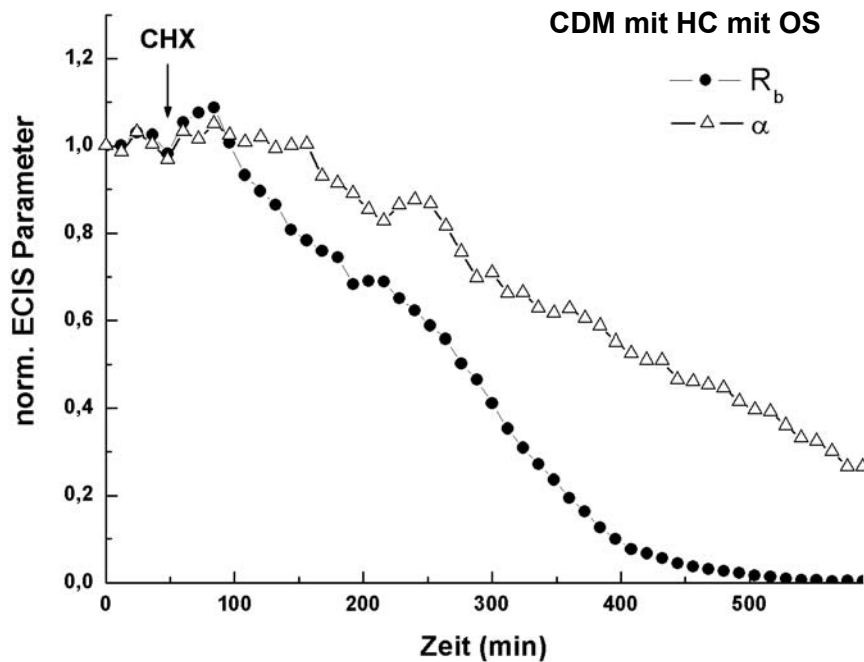


Abb. 3.25:

Typischer Verlauf der Parameter R_b und α der in CDM mit OS mit HC kultivierten PBCEC nach CHX-Zugabe.

$R_b = 219 \Omega \times \text{cm}^2$ und $\alpha = 29,2 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$ bzw. $\alpha(0)$ normiert. Kulturmedium: CDM mit Zusatz von 550 nM HC und 10 Vol. % OS.

Der Pfeil markiert die Zugabe des CHX (25 μM). Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC), Ochsenserum (OS), Cycloheximid (CHX), Zell-Zell-Kontakt (R_b), Zell-Substrat-Kontakt (α).

In Anwesenheit von Hydrocortison im serumfreien Kulturmedium der PBCEC, sank α nach der CHX-Applikation zeitgleich mit dem Wert des Zell-Zell-Kontakts (s. Abb. 3.26). 100 (± 5) Minuten nach der CHX-Zugabe erzielte α 50% seines Ausgangswertes von 61,6 ($\pm 3,8$) $\Omega^{0.5} \times \text{cm}$. Dagegen erreichte R_b die Hälfte seines Anfangswertes von 818 (± 106) $\Omega \times \text{cm}^2$ bereits nach 60 (± 5) Minuten. Der zweistufige Kurvenverlauf von α war vergleichbar mit demjenigen unter serumfreien Kulturbedingungen ohne Hydrocortison. Allerdings wurde in Anwesenheit von Hydrocortison α zusammen mit R_b zeitgleich wesentlich stärker reduziert, bevor die Kurvenverläufe der beiden Parameter entkoppelt wurden und es zu einer wesentlich langsameren Schwächung des Zell-Matrix-Kontakts im Vergleich zum Zell-Zell-Kontakt kam.

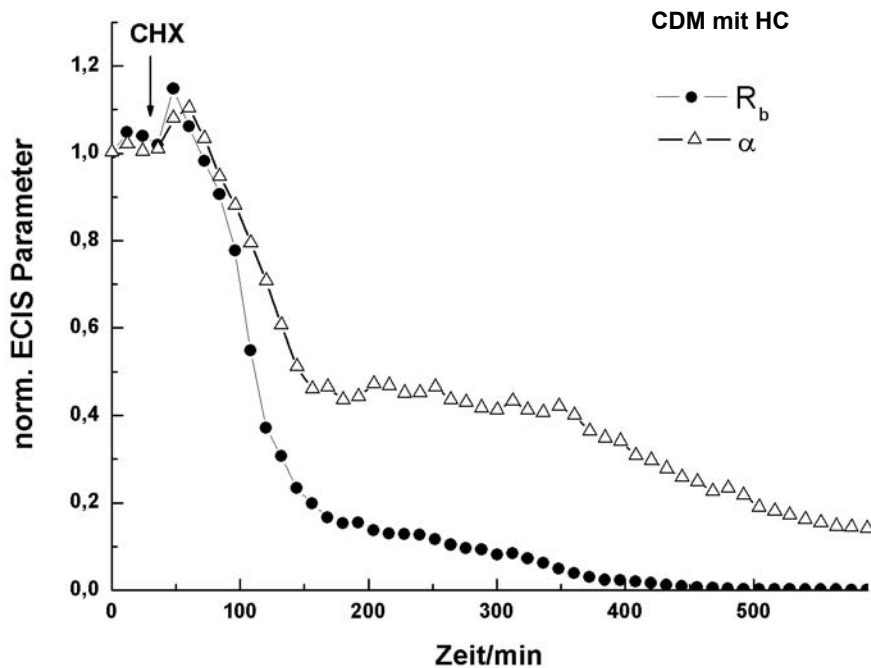


Abb. 3.26:

Typischer Verlauf der Parameter R_b und α der in CDM mit HC kultivierten PBCEC nach der CHX-Zugabe.

$R_b = 645 \Omega \times \text{cm}^2$ und $\alpha = 55,5 \Omega^{0,5} \times \text{cm}$ geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$ bzw. $\alpha(0)$ normiert. Kulturmedium: CDM mit Zusatz von 550 nM HC.

Der Pfeil markiert die Zugabe des CHX (25 μm). Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC), Cycloheximid (CHX), Zell-Zell-Kontakt (R_b), Zell-Substrat-Kontakt (α).

In der Abbildung 3.27 sind die einzelnen Kurvenverläufe der R_b -Werte der PBCEC der Abbildungen 3.23 bis 3.26 nach der CHX-Zugabe zusammenfassend dargestellt. Wie die Abbildung 3.27 nochmals deutlich demonstriert, übt die jeweilige Kulturbedingung der PBCEC einen erheblichen Einfluss auf die Eigenschaften der Zell-Zell-Kontakte aus. So verursachte die Applikation des CHX in das serumfreie Kulturmedium der PBCEC einen rapiden Abfall der Werte für R_b , was einer Schwächung der Zell-Zell-Kontakte entsprach. Dabei war es unerheblich, ob im Medium der PBCEC Hydrocortison vorhanden war. Wurden die PBCEC dagegen in serumhaltigem Medium kultiviert, so verlief die Senkung von R_b nach der CHX-Zugabe zweiphasig. Umgekehrt kam es bei der CHX-induzierten Reduzierung des Parameters α unter serumfreien Kulturbedingungen der PBCEC zu einem zweiphasigen Verlauf der Messkurve (vergl. Abb. 3.28).

Die graue Linie in der Grafik 3.27 und 3.28 unterteilt den Kurvenverlauf von R_b und α . Sie zeigt, welche Zeit zur Senkung der Parameterwerte R_b bzw. α auf 70% ihres Ausgangswertes ($t_{70\%}$) nach der CHX-Zugabe zu den PBCEC unter den verschiedenen Kulturbedingungen benötigt wurde. Zum direkten zeitlichen Vergleich der

Absenkung von R_b und α auf einen festgelegten Wert, durfte keiner der Kurvenverläufe in die verzögerte zweite Phase eingetreten sein. Der $t_{70\%}$ -Wert wurde gewählt, da sich zu diesem Zeitpunkt keiner der dargestellten Kurvenverläufe der ECIS-Parameter in der sekundären, verzögerten Verlaufsphase befand. In der Tabelle 3.1 sind die konkreten $t_{70\%}$ -Werte von R_b und α der unterschiedlich kultivierten PBCEC nach der CHX-Zugabe angegeben.

Wie in der Abbildung 3.27, 3.28 und in der Tabelle 3.1 anhand des $t_{70\%}$ -Werts deutlich abzulesen ist, wurde durch den Serumzusatz im Kulturmedium der PBCEC sowohl die Senkung von R_b als auch von α deutlich verzögert.

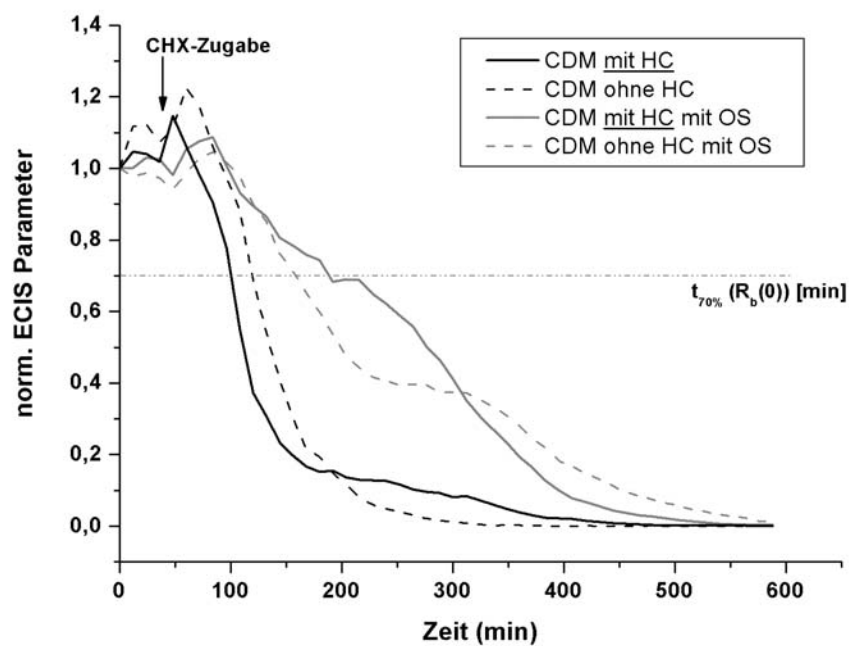


Abb. 3.27:

Vergleichender Verlauf des Parameters R_b nach der Zugabe von CHX zu den unterschiedlich kultivierten PBCEC.

Die Messungen wurden am 7. DIV der PBCEC durchgeführt. Der Pfeil markiert die Zugabe des CHX (25 μ m). Die gestrichelte graue Linie kennzeichnet den Zeitpunkt t an dem R_b 70 % seines Ausgangswertes erreicht hat ($t_{70\%}(R_b(0))$ [min]). Die Werte zu $t_{70\%}(R_b(0))$ [min] sind in der Tabelle 3.1 angegeben.

Kulturbedingungen: CDM mit 550 nM HC, CDM mit 550 nM HC mit 10 Vol. % OS, CDM ohne HC, CDM ohne HC mit 10 Vol. % OS. Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC), Ochsenserum (OS), Cycloheximid (CHX), Zell-Zell-Kontakt (R_b), Zell-Substrat-Kontakt (α).

$R_b = 645 \Omega \times \text{cm}^2$ (CDM mit HC), $R_b = 220 \Omega \times \text{cm}^2$ (CDM ohne HC), $R_b = 134 \Omega \times \text{cm}^2$ (CDM ohne HC mit OS) und $R_b = 219 \Omega \times \text{cm}^2$ (CDM mit HC mit OS) geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$ bzw. $\alpha(0)$ normiert.

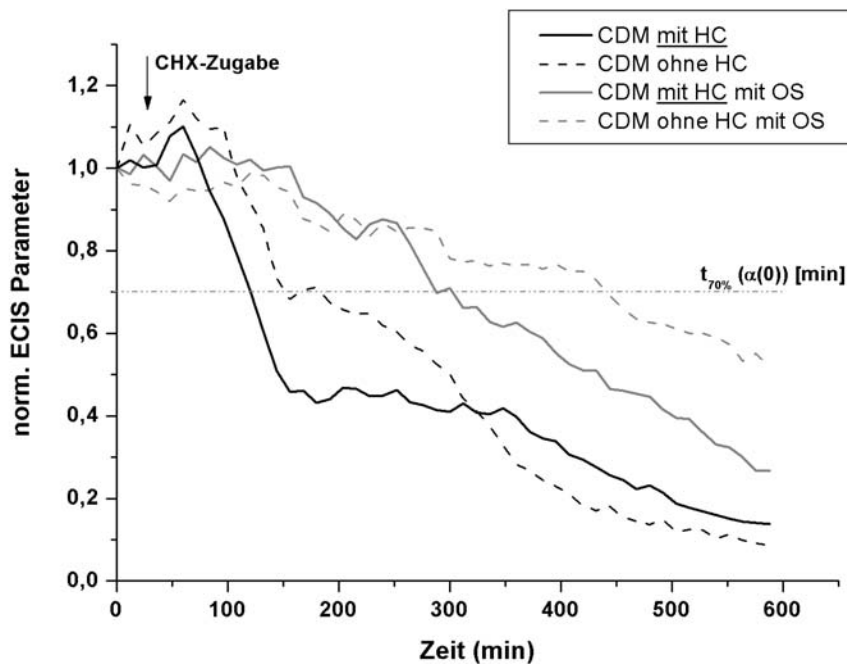


Abb. 3.28:

Vergleichender Verlauf des Parameters α nach der Zugabe von CHX zu den unterschiedlich kultivierten PBCEC.

$\alpha = 55,5 \Omega^{0,5} \times \text{cm}$ (CDM mit HC), $\alpha = 30 \Omega^{0,5} \times \text{cm}$ (CDM ohne HC), $\alpha = 30 \Omega^{0,5} \times \text{cm}$ (CDM ohne HC mit OS) und $\alpha = 29 \Omega^{0,5} \times \text{cm}$ (CDM mit HC mit OS) geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an.

Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$ bzw. $\alpha(0)$ normiert. Die Messungen wurden am 7. DIV der PBCEC durchgeführt. Der Pfeil markiert die Zugabe des CHX ($25 \mu\text{m}$). Die gestrichelte graue Linie kennzeichnet den Zeitpunkt t an dem α 70 % seines Ausgangswertes erreicht hat ($t_{70\%}(\alpha(0))$ [min]). Die Werte zu $t_{70\%}(\alpha(0))$ [min] sind in der Tabelle 3.1 angegeben.

Kulturbedingungen: CDM mit 550 nM HC, CDM mit 550 nM HC mit 10 Vol. % OS CDM ohne HC, CDM ohne HC mit 10 Vol. % OS. Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC), Och-senserum (OS), Cycloheximid (CHX), Zell-Zell-Kontakt (R_b), Zell-Substrat-Kontakt (α).

In der Tabelle 3.1 sind die Anfangswerte der ECIS-Parameter R_b und α der verschiedenen Kulturbedingungen der PBCEC vor Zugabe des Cycloheximids gegenüber-stellend aufgeführt. Die dargestellten Werte zeigen, dass in Anwesenheit von Hydro-cortison im CDM der PBCEC der Parameter R_b bis zu 4-fach höhere Anfangswerte und der Parameter α doppelt erhöhte Ausgangsmesswerte im Vergleich zu den der übrigen aufgeführten Kulturbedingungen erreichte.

Hydrocortison bewirkte somit nicht nur eine Optimierung der Barrierefunktion der PBCEC durch die Verstärkung der Zell-Zell-Kontakte, sondern übte zudem einen ent-scheidenden Einfluss auf die Stärke des Zell-Substrat-Kontakts der cerebralen Endo-thelzellen aus. Die durch CHX verursachte Abnahme von R_b und α auf die Hälfte ihres Ausgangswertes erfolgte bei den in CDM mit Hydrocortison-Zusatz kultivierten PBCEC im Vergleich zu den übrigen Kulturbedingungen am schnellsten. Das ver-deutlicht, dass die PBCEC durch die Hydrocortison-haltigen Kulturbedingungen unter

Ausschluss von Serum, wesentlich sensibler auf CHX, also auf externe Reize reagierten. Zudem lag der Wert für R_b nach der Erniedrigung auf 50% seines Ausgangswertes mit $320 \Omega \times \text{cm}^2$ immer noch weit über den Ausgangswerten der übrigen Kulturbedingungen.

Die hohe Empfindlichkeit der barrierebildenden interendothelialen Zell-Kontakte der PBCEC gegenüber externen Stimuli, in Verbindung mit den hohen Werten der Parameter R_b und α der PBCEC unter serumfreien, Hydrocortison-haltigen Kulturbedingungen stellte somit eine optimale Ausgangsvoraussetzung für die folgenden Untersuchungen der entzündlichen Prozesse an der Blut-Hirn-Schranke *in vitro* dar. Insbesondere zur Analyse der Endothelzell-Leukozyten-Interaktion war eine erhöhte messbare Sensibilität an den Zell-Zell-Kontakten der cerebralen Endothelzellen eine grundlegende Voraussetzung.

Tab. 3.1:

Darstellung der Anfangs- und t_{80} -Werte der ECIS-Parameter R_b und α der unterschiedlichen Kulturbedingungen der PBCEC.

Kulturbedingung	$R_b(0)$ [Ωcm^2]	$\alpha(0)$ [$\Omega^{0,5} \text{cm}$]	$t_{70\%}(R_b(0))$ [min]	$t_{70\%}(\alpha(0))$ [min]
CDM	203 ± 46	37,3 ± 4,8	70 ± 5	115 ± 5
CDM mit OS	120 ± 11	25 ± 0,2	110 ± 5	400 ± 5
CDM mit HC und OS	167 ± 19	32 ± 3,9	135 ± 5	240 ± 5
CDM mit HC	654 ± 90	61,6 ± 3,8	60 ± 5	90 ± 5

Kulturbedingung: CDM mit HC: chemisch definiertes Medium mit Zusatz von 550 nM HC, CDM mit OS: chemisch definiertes Medium mit Zusatz von 10 Vol. % Ochsen Serum, CDM mit HC und OS: chemisch definiertes Medium mit Zusatz von 550 nM HC und 10 Vol. % OS, CDM: chemisch definiertes Medium ohne Zusatz von HC und OS.

Darstellung der Anfangswerte von R_b und α und Angabe der Zeitpunkte ($t_{70\%}$), bei denen die Werte für R_b und α nach CHX-Zugabe 70 % ihres Ausgangswertes erreicht hatten ($R_b = 70\% R_b(0)$ und $\alpha = 70\% \alpha(0)$). Die Angabe der $t_{70\%}$ -Werte für R_b und α erfolgte exemplarisch für die in Abb. 3.23 bis 3.26 dargestellten Messungen. Aufgrund der Ablesungs- Ungenauigkeit wurden die Werte stets mit ± 5 min angegeben.

Parameter des Zell-Zell-Kontakts (R_b), Parameter des Zell-Substrat-Kontakts (α). Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC), Ochsen Serum (OS).

Die +/- angegebenen Fehler sind die berechneten Standardabweichungen der Mittelwerte.

Die mit Hilfe der ECIS-Analysen ermittelten Befunde standen in unmittelbarer Korrelation zu den Ergebnissen der Apoptose-Bestimmung, die mittels der Messung der Caspase-3-Aktivität der PBCEC unter den verschiedenen Kulturbedingungen erzielt wurden (vergl. Abb. 3.22, 3.24 und 3.25). Durch den Hydrocortison-Zusatz in das serumfreie Kulturmedium der PBCEC wurde die induzierte Apoptoserate im Vergleich zur Hydrocortison-freien Kulturbedingung zwar deutlich gedämpft, der CHX-induzierte Abfall der Parameter R_b und α konnte dadurch allerdings nicht verzögert werden (vergl. Abb. 3.26). Inwiefern also eine direkte Korrelation der Apoptoserate mit dem

CHX-induzierten Senkungsverhalten der ECIS-Parameter R_b und α möglich ist, ist fraglich.

3.1.2 Die Entzündungsaktivierung

3.1.2.1 Serum

Serum, appliziert von der apikalen Seite des Endothelzell-Monolayers, wirkte sich Apoptose-senkend aus und pufferte die Auswirkung der chemisch induzierten Apoptose erheblich ab. Demgegenüber zeigten die impedanzspektroskopischen Untersuchungen der auf den Transwell®-Filtersystemen kultivierten PBCEC, dass ein Zusatz von Serum in das apikale Filterkompartiment zu einer leichten Beeinträchtigung des TERs der PBCEC, die Applikation in die basolaterale Filterkammer dagegen zu einem massiven Absinken des transendothelialen Widerstands führte (s. Abb. 3.6). Diese widersprüchlich erscheinenden Befunde zeigten, dass die Wirkung des Serums auf die cerebralen Endothelzellen vermutlich ein komplexes multifaktorielles Geschehen darstellt.

Das ausschlaggebende Kriterium für den Verzicht des Serum-Zusatzes in dem Entzündungsmodell der BHS war jedoch der Befund der immunzytochemischen Untersuchungen, der zeigte, dass Serum entzündliche Veränderungen in den Endothelzellen hervorrief. Als Entzündungsmarker wurde E-Selektin gewählt, ein Molekül der Adhäsionskaskade entzündlicher Prozesse, das ausschließlich auf der Zelloberfläche entzündungsaktivierter Endothelzellen exprimiert wird. Um zu überprüfen, inwieweit der permeabilitätssteigernde basolaterale Effekt des Serums mit der Auslösung eines entzündlichen Prozesses in Korrelation gebracht werden konnte, wurde die Expression des E-Selektins nach Inkubation der PBCEC in CDM mit Serum-Zusatz von der apikalen als auch von der basolateralen Zellseite untersucht.

Die in den Abbildungen 3.29 und 3.30 sichtbaren punktförmigen roten Strukturen auf den PBCEC zeigen deutlich, dass eine Expression des E-Selektins nach vierstündiger Inkubation der cerebralen Endothelzellen in serumhaltigem Medium erfolgte. Die gleichzeitige Anwesenheit von Hydrocortison im serumhaltigen CDM spielte dabei keine Rolle.

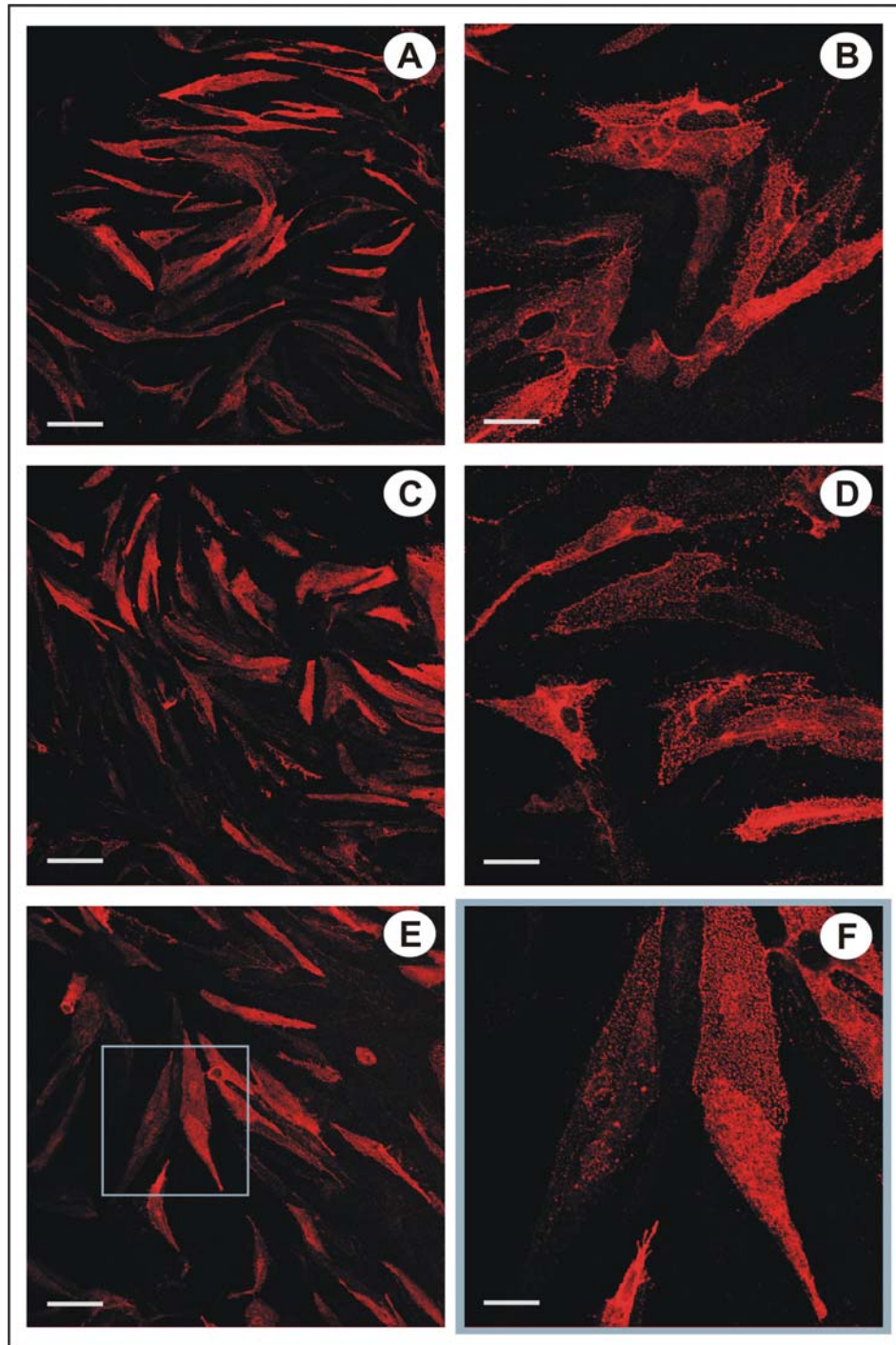


Abb. 3.29 A-E:

Immunzytochemischer Nachweis des E-Selektins der PBCEC nach der Zugabe von Serum in das apikale bzw. basolaterale Filterkompartiment.

A u. B: Zugabe des Serums in das apikale Filterkompartiment (CDM mit 550 nM HC).

C u. D: Zugabe des Serums in die basolaterale Filterkammer (CDM mit 550 nM HC).

E u. F: Zugabe des Serums in das apikale Filterkompartiment (CDM mit 55 nM HC).

Inkubationsmedium: CDM mit Zusatz von 55 bzw. 550 nM HC. Die Inkubation der PBCEC mit 10 Vol. % Ochsen Serum erfolgte über einen Zeitraum von 4 h. Die immunzytochemische Analyse erfolgte am 7. DIV der PBCEC. Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC).
Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht in Abbildung A, C und E 45 μm , in Abbildung B und D 25 μm und in Abbildung F 15 μm .

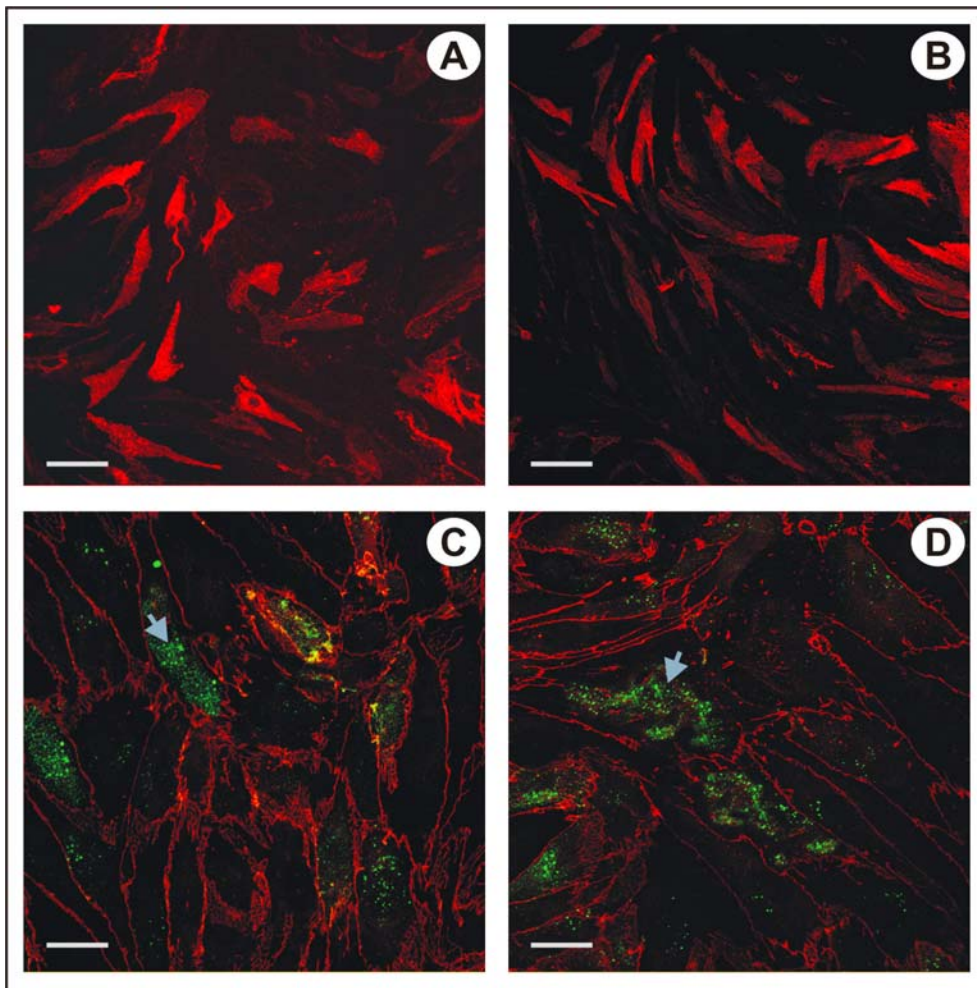


Abb. 3.30 A-D:

Immunzytochemischer Nachweis des E-Selektins der PBCEC nach der Zugabe von Serum in das apikale bzw. basolaterale Filterkompartiment.

A: Zugabe des Serums in das apikale Filterkompartiment.

B: Zugabe des Serums in das basolaterale Filterkompartiment.

Doppelimmunfluoreszenz: E-Selektin (Punkte), s. Pfeil, ZO-1 (Zellgrenzen)

C: Zugabe des Serums in das apikale Filterkompartiment.

D: Zugabe des Serums in das basolaterale Filterkompartiment.

In Abbildung C und D ist die E-Selektin-Expression punktförmig und ZO-1 linienförmig an den Zellrändern dargestellt.

Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC). Inkubationsmedium: CDM ohne Hydrocortison-Zusatz. Die Inkubation der PBCEC mit 10 Vol.% Ochsen Serum erfolgte über einen Zeitraum von 4 Stunden.

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht in Abbildung A und B 45 μm , in Abbildung C und D 25 μm .

Im Gegensatz zum serumfreien PBCEC-Modell, in dem keine E-Selektin-Expression nachgewiesen wurde, belegte die Abbildung 3.29, dass durch die Serum-Zugabe in das Hydrocortison-haltige Medium eine entzündliche Reaktion in den Endothelzellen hervorgerufen wurde. Die Zugabe des Serums sowohl in das apikale als auch in das basolaterale Filterkompartiment verursachte eine gleichermaßen starke E-Selektin-Expression auf der PBCEC-Zelloberfläche (s. Abb. 3.29 A-C und E). In Abbildung 3.28 D und F ist exemplarisch die E-Selektin-Expression vergrößert dargestellt, um

das punktförmige Erscheinungsbild des E-Selektins zu veranschaulichen. Die Abbildung 3.30 zeigt den Nachweis der entzündlichen Reaktion, ausgelöst durch die Serum-Zugabe zu den PBCEC in Abwesenheit von Hydrocortison. Die Doppelimmunfluoreszenzen von ZO-1 (Zellgrenzen) und E-Selektin (punktförmige Strukturen) in den Abbildungen 3.30 C und D zeigen, dass die ZO-1-Expression von der Anwesenheit des Serums im Kulturmedium der PBCEC unbeeinflusst blieb.

Der Serumzusatz, appliziert in die basolaterale Filterkammer des Transwell®-Filtersystems verursachte eine drastische Senkung des TERs der cerebralen Endothelzellen, verbunden mit einem nachweisbaren Ablösen der Zellen vom Substrat und einer starken Beeinträchtigung der barrierebildenden Zell-Zell-Kontaktzone. Dagegen führte der Zusatz von Serum in die apikale Filterkammer zwar kaum zu einer Senkung des TERs, verursachte aber dennoch eine Entzündungsaktivierung der PBCEC. Erstaunlicherweise wurde jedoch durch die Serum-Zugabe zur apikalen Zellseite die Apoptoserate erheblich gesenkt. Wie die Studien der CHX-induzierten Apoptose, dargestellt in Abbildung 3.24 und 3.25 allerdings zeigten, wurde durch die Inkubation mit serumhaltigem Medium von der apikalen Zellseite die Sensibilität der Barrierefunktion gegen äußere Einflüsse erheblich gesenkt.

Diese Beobachtungen verdeutlichten den komplexen Wirkmechanismus des Serums auf die PBCEC. Aufgrund des beschriebenen vielschichtigen Serum-Effekts auf die Endothelzellen, dessen Wirkmechanismus bisher noch nicht aufgeklärt ist, musste zur Etablierung des Entzündungsmodells deshalb auf den Serumzusatz im Kulturmodell der PBCEC verzichtet werden. Als Grundlage des Entzündungsmodells der BHS wurde schließlich das Hydrocortison-haltige, serumfreie Kulturmodell gewählt, das neben seiner hohen *in vivo*-Kompatibilität die Applikation verschiedener Entzündungsmediatoren unter chemisch definierten Bedingungen zuließ. Hydrocortison maximiert die Barrierefunktion der BHS *in vitro* und dessen Sensibilität gegenüber äußeren Einflüssen, indem es für die Ausbildung einer gesunden, physiologischen Morphologie der Zellen verbunden mit einer stark verminderten Apoptoserate sorgt.

3.1.2.2 TNF- α

Aufgrund der bekannten anti-inflammatorischen Wirkung des Hydrocortisons, stellte sich die Frage, ob sich in dessen Gegenwart tatsächlich eine Entzündungsreaktion im PBCEC-Modell hervorrufen ließ. Die immunzytochemischen Analysen zeigten, dass es tatsächlich möglich war, die PBCEC in Gegenwart der im Arbeitskreis üblicherweise verwendeten Hydrocortisonkonzentration von 550 nM gezielt durch die Applikation von TNF- α (*tumor necrosis factor*- α) zu aktivieren. TNF- α ist ein bekannter Entzündungsmediator, der die Neusynthese und Oberflächenexpression von E-

Selektin auf den Endothelzellen induziert (Kubes & Ward, 2000). Die in Abbildung 3.31 dargestellte Expression des E-Selektins, induziert durch TNF- α demonstriert, dass E-Selektin ein idealer Entzündungsmarker für das PBCEC-Modell ist. Der Vergleich der Abbildungen 3.31 A und C zeigt, dass die Inkubation der PBCEC mit 2 ng/ml TNF- α zu einer verstärkten Expression des E-Selektins führte. Diese schien den Immunfluoreszenzen zufolge bei den Endothelzellen, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison, stärker ausgeprägt zu sein als in Anwesenheit von 550 nM Hydrocortison. Der Einsatz von 0,2 ng/ml TNF- α löste zwar ebenfalls eine entzündliche Reaktion in den PBCEC aus, war jedoch nicht verlässlich genug, wie die immunzytochemischen Befunde in Abbildung 3.31 A und B verdeutlichen. Die Abbildungen 3.31 D und F zeigen die charakteristische punktförmige E-Selektin-Expression in höherer Vergrößerung nach der Inkubation der PBCEC mit 2 ng/ml TNF- α in Gegenwart von 55 nM und 550 nM Hydrocortison im CDM der PBCEC. Die Inkubation der PBCEC mit TNF- α von der apikalen oder basolateralen Filterseite verursachte keine Veränderung der E-Selektin Expression (s. Abb. 3.32).

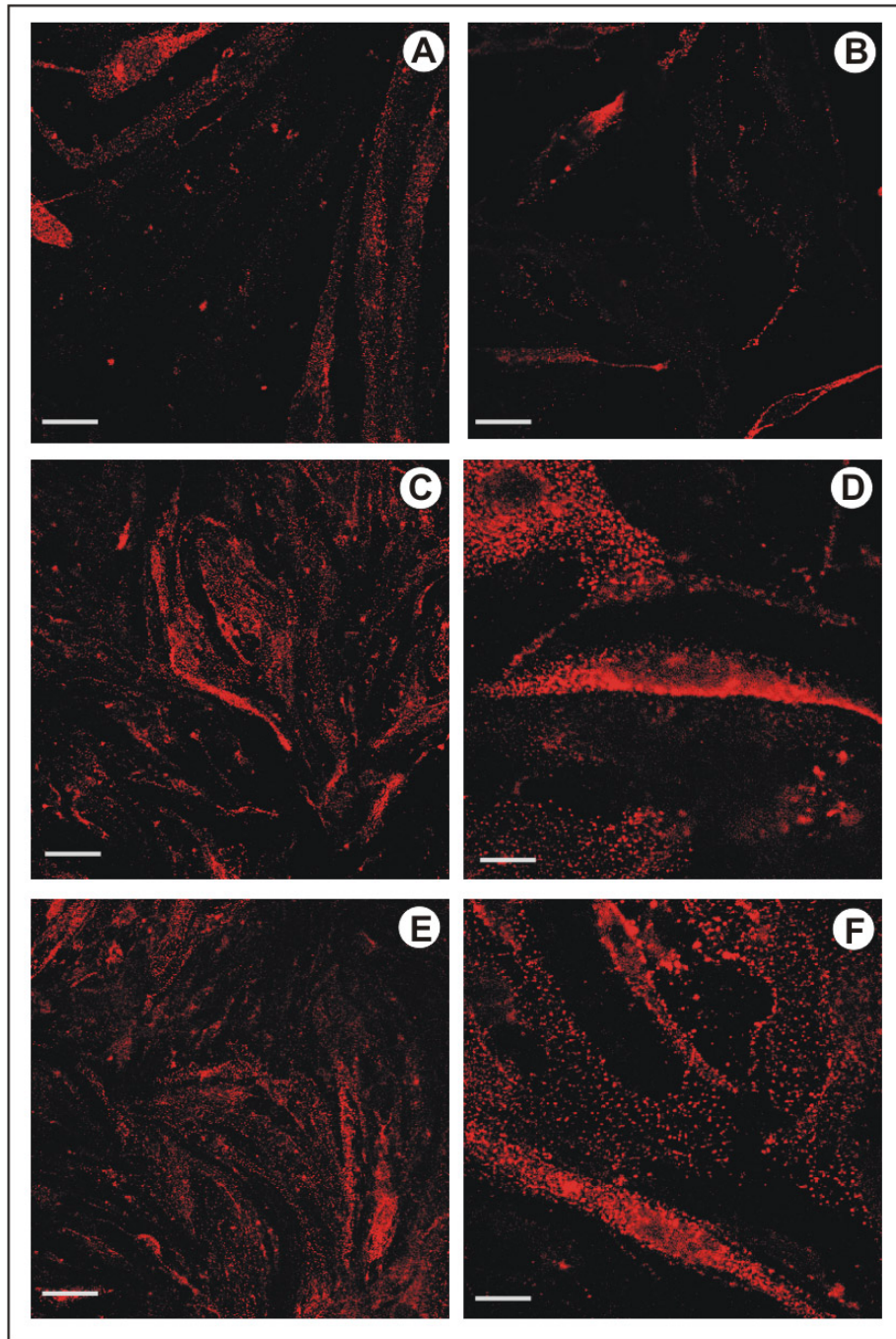


Abb. 3.31 A-F:

Immunocytochemischer Nachweis des E-Selektins nach der Inkubation der PBCEC mit TNF- α .

Die Inkubation der PBCEC mit TNF α erfolgte zeitgleich sowohl von der apikalen als auch von der basolateralen Filterseite.

A: Inkubation der PBCEC mit 0,2 ng/ml TNF- α (CDM mit 55 nM HC).

B: Inkubation mit 0,2 ng/ml TNF- α (CDM mit 550 nM HC).

C: Inkubation mit 2 ng/ml TNF- α (CDM mit 55 nM HC).

D: Inkubation mit 2 ng/ml TNF- α (CDM mit 55 nM HC).

E: Inkubation mit 2 ng/ml TNF- α (CDM mit 550 nM HC).

F: Inkubation mit 2 ng/ml TNF- α (CDM mit 550 nM HC).

Die immunocytochemische Analyse der PBCEC erfolgte am 7. DIV. Die Inkubation der PBCEC mit 2 ng/ml TNF- α erfolgte über einen Zeitraum von 4 h. Angabe des Kulturmediums in Klammern. Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC).

Vergrößerung: der Maßstabsbalken links unten in den Abbildungen entspricht bei Abbildung A, B, C und E: 25 μ m und Abb. D und F: 10 μ m.

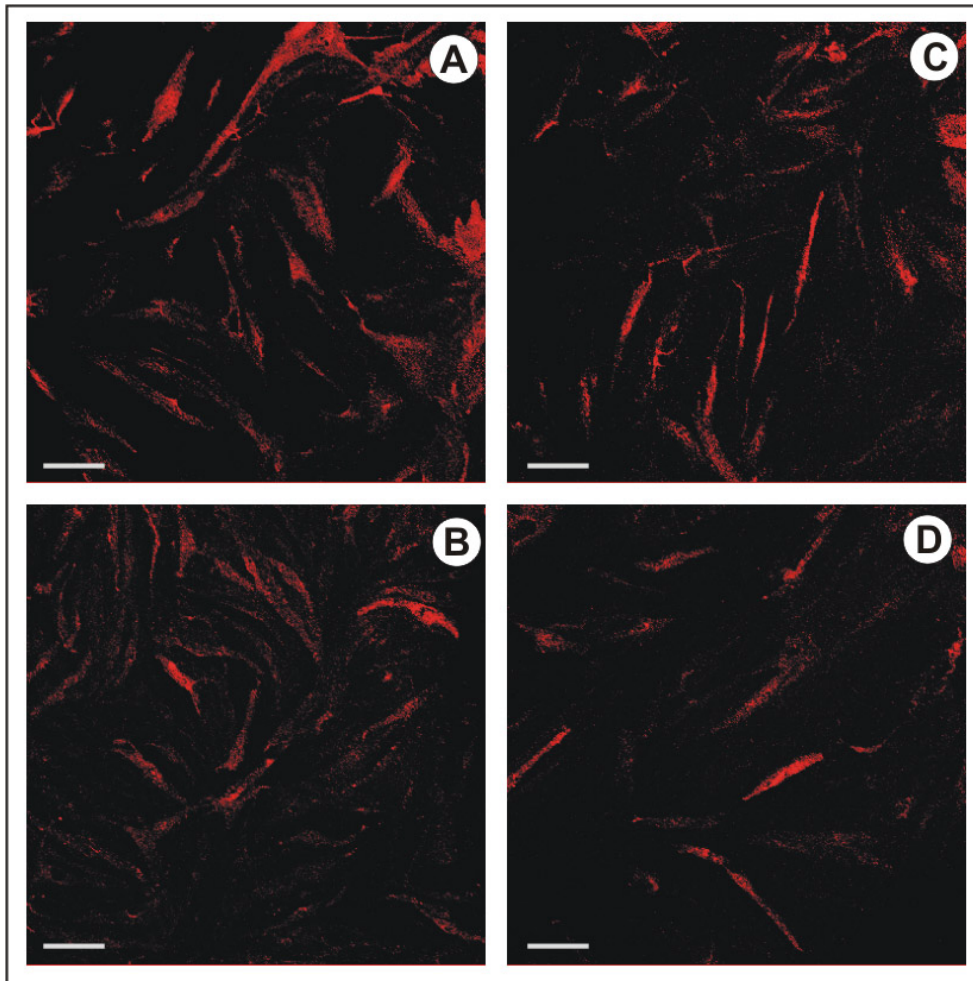


Abb. 3.32 A-D:

Immunzytochemischer Nachweis des E-Selektins nach der Inkubation der PBCEC mit TNF- α .

A: 2 ng/ml TNF- α (apikale Filterseite), CDM mit 55 nM HC.

B: 2 ng/ml TNF- α (basolaterale Filterseite), CDM mit 55 nM HC.

C: 2 ng/ml TNF- α (apikale Filterseite), CDM mit 550 nM HC.

D: 2 ng/ml TNF- α (basolaterale Filterseite), CDM mit 550 nM HC

Die immunzytochemische Analyse der PBCEC erfolgte am 7. DIV. Die Inkubation der PBCEC mit 2 ng/ml TNF- α erfolgte über einen Zeitraum von 4 h.

Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC).

Vergrößerung: der Maßstabsbalken links unten in den Abbildungen entspricht bei Abb. A–D: 25 μ m.

Obwohl E-Selektin als Entzündungsmarker für das PBCEC-Modell gewählt wurde, wurde die Entzündungsreaktion der Endothelzellen, ausgelöst durch 2 ng/ml TNF- α mit Hilfe des immunzytochemischen Nachweises der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 zusätzlich überprüft. Wie in der Abbildung 3.33 deutlich zu sehen ist, wurden durch die Inkubation der PBCEC mit TNF- α die Entzündungs-Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 auf der Endothelzell-Oberfläche exprimiert. Die Abbildungen 3.33 A und B zeigen die Expression des VCAM-1 nach der Inkubation der PBCEC mit 0,2 bzw. 2 ng/ml TNF- α in Hydrocortison-haltigem CDM. Wie die Abbildungen demonstrieren, wurde die VCAM-1-Expression der PBCEC in Hydrocortison-

freiem CDM nicht verstärkt (s. Abb. 3.33 C). Das Adhäsionsmolekül ICAM-1 wurde im Vergleich zu VCAM-1 und zu E-Selektin nach der Inkubation der Endothelzellen mit TNF- α deutlich schwächer exprimiert (s. Abb. 3.33 D).

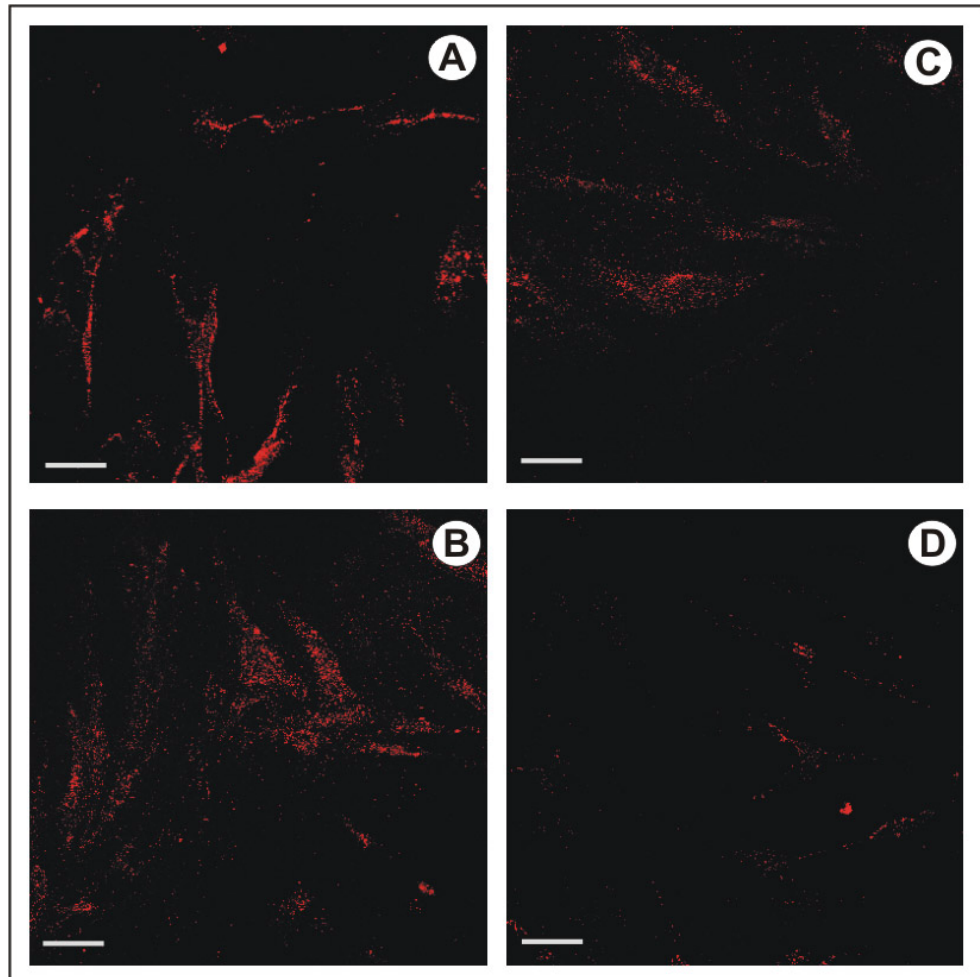


Abb. 3.33 A-D:

Immunzytochemischer Nachweis des VCAM-1 und ICAM-1 nach der Inkubation der PBCEC mit TNF- α .

A: VCAM-1: Inkubation mit 0,2 ng/ml TNF- α (CDM mit 55 nM HC).

B: VCAM-1: Inkubation mit 2 ng/ml TNF- α (CDM mit 55 nM HC).

C: VCAM-1: Inkubation mit 2 ng/ml TNF- α (CDM ohne HC).

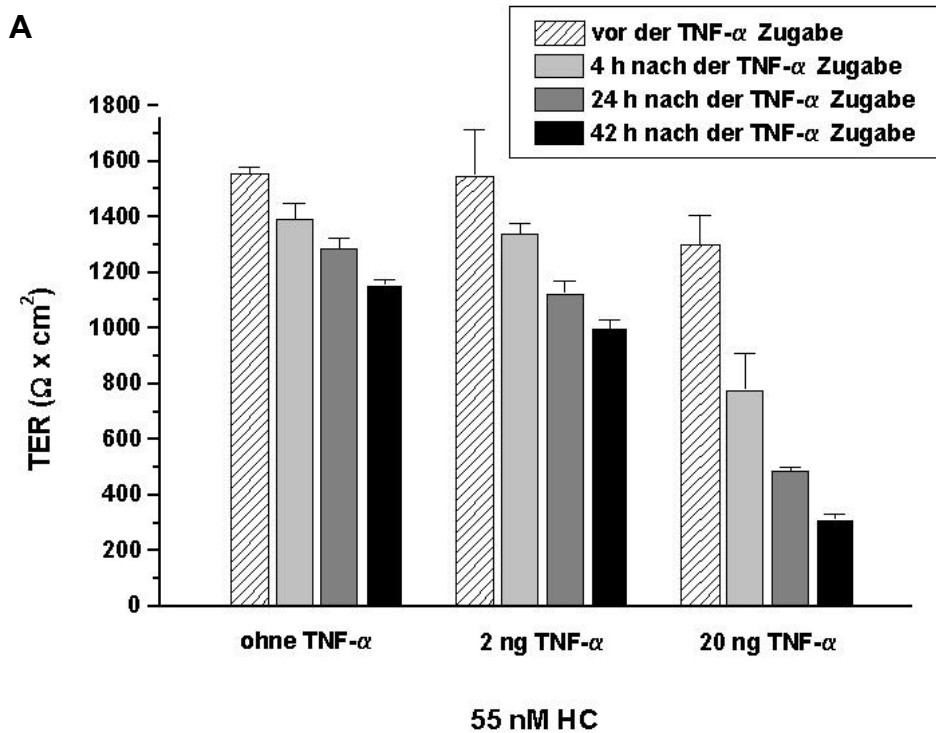
D: ICAM-1: Inkubation mit 2 ng/ml TNF- α (CDM + 55 nM HC).

Die Immunzytochemische Analyse der PBCEC erfolgte am 7. DIV. Die Entzündungsaktivierung der PBCEC mit TNF- α (apikales Filterkompartiment), erfolgte über einen Zeitraum von 4 h. Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC).

Vergrößerung: der Maßstabsbalken links unten in den Abbildungen A-D entspricht 25 μ m.

Durch die Inkubation der PBCEC mit 2 ng/ml TNF- α in Anwesenheit von 55 nM Hydrocortison im CDM wurde eine maximale Expression des E-Selektins induziert und somit die erwünschte entzündliche Reaktion der PBCEC unter chemisch definierten Bedingungen nachweislich ausgelöst. Um optimale Voraussetzungen für die anschließende Charakterisierung der Leukozyten-Transmigration unter entzündlichen

Bedingungen zu schaffen, war es essentiell, dass nicht schon durch die Entzündungsaktivierung der PBCEC deren TER beeinträchtigt wurde. Deshalb wurde der TER der cerebralen Endothelzellen zunächst vor und nach 4-, 24- und 42-stündiger Inkubation mit TNF- α gemessen (s. Abb. 3.34 A und B). Dabei zeigte sich, dass 2 ng/ml TNF- α , unabhängig von der An- oder Abwesenheit von 55 bzw. 550 nM Hydrocortison im CDM, zu keinem signifikanten Abfall des TERs der PBCEC führte. Dagegen verursachte die Applikation einer 10-fach erhöhten Konzentration von TNF- α (20 ng/ml) eine deutliche Beeinträchtigung der Barrierefunktion der PBCEC. So wurde der TER 4 Stunden nach der TNF- α -Applikation auf die Hälfte seines Ausgangswertes reduziert (s. Abb. 3.34 A). In Anwesenheit von 550 nM Hydrocortison im Kulturmedium wurde diese drastische Senkung des TERs etwas verzögert, so dass der TER nach 4 Stunden lediglich um durchschnittlich $200 \Omega \times \text{cm}^2$ reduziert wurde. Nach 24 Stunden wies er allerdings nur noch die Hälfte seines Ausgangswertes auf (s. Abb. 3.34 B).



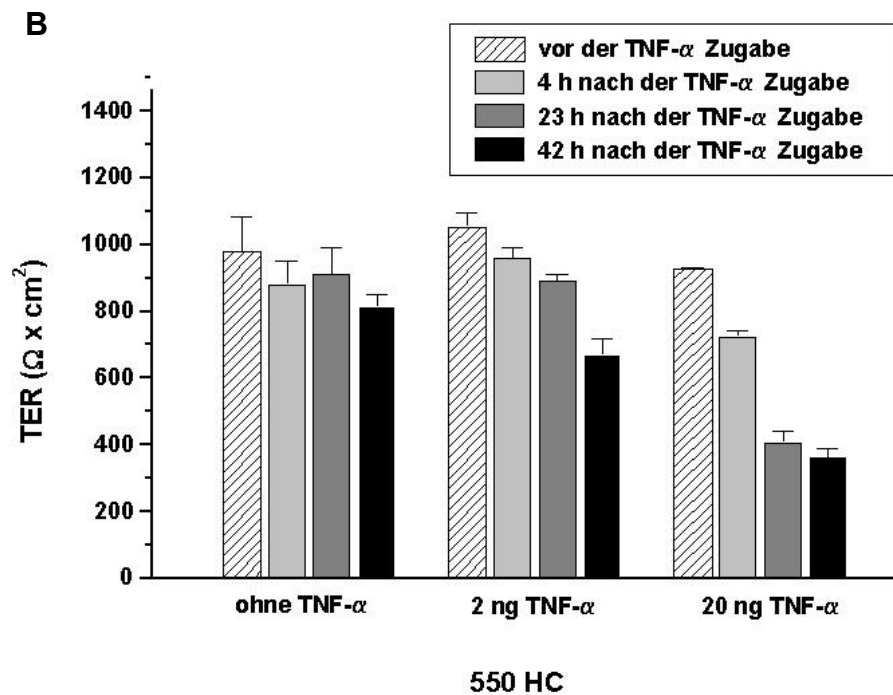


Abb. 3.34 A und B:

Der Einfluss von TNF- α auf den TER der PBCEC.

Inkubationsmedium: serumfreies chemisch definiertes Medium (CDM) mit Zusatz von 55 nM (A) bzw. 550 nM (B) Hydrocortison.

Die Messung des TERs 4 h nach der TNF- α -Zugabe erfolgte am 7. DIV, die Messung nach 24 h am 8. DIV und nach 42 h am 9. DIV. Das TNF- α wurde in die apikale Filterkammer gegeben.

Die TER-Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt (n = 6).

Wie in der Abbildung 3.35 zu sehen ist, war es unerheblich, ob TNF- α von der apikalen oder basolateralen Filterseite appliziert wurde. In beiden Fällen wurde der TER der Endothelzellen durch die Inkubation mit 2 ng/ml TNF- α in Anwesenheit von 55 nM Hydrocortison im Kulturmedium nicht beeinträchtigt.

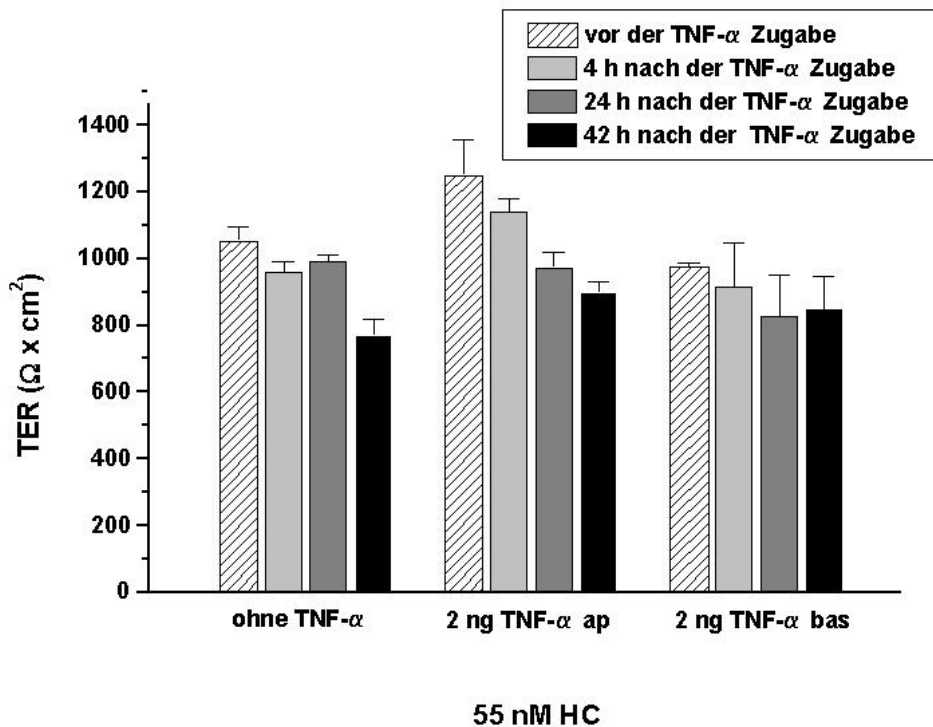


Abb. 3.35:

Der polare Einfluss von TNF- α auf den TER der PBCEC.

Einfluss von 2 ng/ml TNF- α auf die PBCEC nach der Zugabe in die apikale bzw. basolaterale Filterkammer. Die Messung des TERs 4 h und 15 h nach der TNF- α -Zugabe erfolgte am 7. DIV. Inkubationsmedium: serumfreies chemisch definiertes Medium (CDM) mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Die TER-Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt ($n = 6$).

Parallel zu den transendothelialen Widerstandsmessungen der entzündungsaktivierten PBCEC wurde der Einfluss des Entzündungsinduktors TNF- α auf die Expression der *tight junction*-assoziierten Proteine untersucht. Zu diesem Zweck wurden immunzytochemische Analysen des ZO-1-, des Occludin- und des Claudin-5-Proteins der auf Transwell[®]-Filtern gewachsenen PBCEC nach der Inkubation der Endothelzellen mit TNF- α durchgeführt.

Wie in der Abbildung 3.36 A-C zu sehen ist, verursachte die Inkubation der PBCEC mit 2 ng/ml TNF- α im Hydrocortison-haltigem Kulturmedium keine Beeinträchtigung der ZO-1-Expression. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Zellen mit TNF- α von der apikalen oder basolateralen Seite inkubiert wurden (vergl. Abb. 3.36 B und C). Die Erhöhung der TNF- α Konzentration auf 20 ng/ml führte zu einer Veränderung der ZO-1-Expression, was sich in einer geringfügigen Verzerrung der Zellgrenzen widerspiegelte (s. Abb. 3.36 D). Die Inkubation der Endothelzellen mit 2 ng/ml TNF- α in Abwesenheit von Hydrocortison im Kulturmedium führte ebenfalls zu einer beeinträchtigten ZO-1 Expression (s. Abb. 3.36 E).

Ein identisches Bild ergab sich bei der immunzytochemischen Untersuchung der Claudin-5-Expression der PBCEC nach der Inkubation der Endothelzellen mit 2 ng/ml TNF- α (s. Abb. 3.37). Weder die Zugabe in das apikale noch in das basolaterale Filterkompartiment führte nach einer 4-stündigen Inkubation der PBCEC mit 2 ng/ml TNF- α in Anwesenheit von 55 nM Hydrocortison im CDM zu einer Veränderung der Claudin-5-Expression (s. Abb. 3.37 B und C). Dagegen verursachte die Applikation von 20 ng/ml TNF- α eine Verzerrung der Claudin-5-Expression an den Zellgrenzen der PBCEC. Diese Beeinträchtigung war allerdings wesentlich geringfügiger ausgeprägt als bei der ZO-1-Expression (s. Abb. 3.36 D und 3.37 D). Eine ähnliche Verzerrung der Claudin-5-Expression erfolgte durch die Inkubation der PBCEC mit 2 ng/ml TNF- α in Abwesenheit von Hydrocortison im Kulturmedium der Endothelzellen. Allerdings wurde die Expression der *tight junction*-assoziierten Proteine ZO-1, Occludin und Claudin-5 der PBCEC in Abwesenheit von Hydrocortison im CDM ohnehin beeinträchtigt, so dass unter dieser Kulturbedingung der Einfluss des TNF- α schwer zu beurteilen war.

Die Occludin-Expression wurde durch die Inkubation der PBCEC mit 2 ng/ml TNF- α im Hydrocortison-haltigen Kulturmedium von der apikalen bzw. basolateralen Seite ebenfalls nicht beeinträchtigt (s. Abb. 3.38. B und C). 20 ng/ml TNF- α führten dagegen zu einer starken Verzerrung der Zellgrenzen, die sich auch durch die Inkubation der Endothelzellen mit 2 ng/ml TNF- α im Hydrocortison-freien CDM zeigte (s. Abb. 3.38 D und E).

Die immunzytochemische Analyse der *tight junction*-assoziierten Proteine an den auf Transwell®-Filtersystemen kultivierten PBCEC wurde direkt mit den TER-Messungen korreliert. Die unveränderte ZO-1-, Occludin- und Claudin-5-Expression der mit 2 ng/ml TNF- α inkubierten PBCEC im Hydrocortison-haltigen CDM, spiegelte sich unmittelbar in den hohen TER-Werten der Endothelzellen unter den gleichen Versuchsbedingungen wieder (vergl. Abb. 3.34 A und B sowie Abb. 3.36, 3.37 und 3.38).

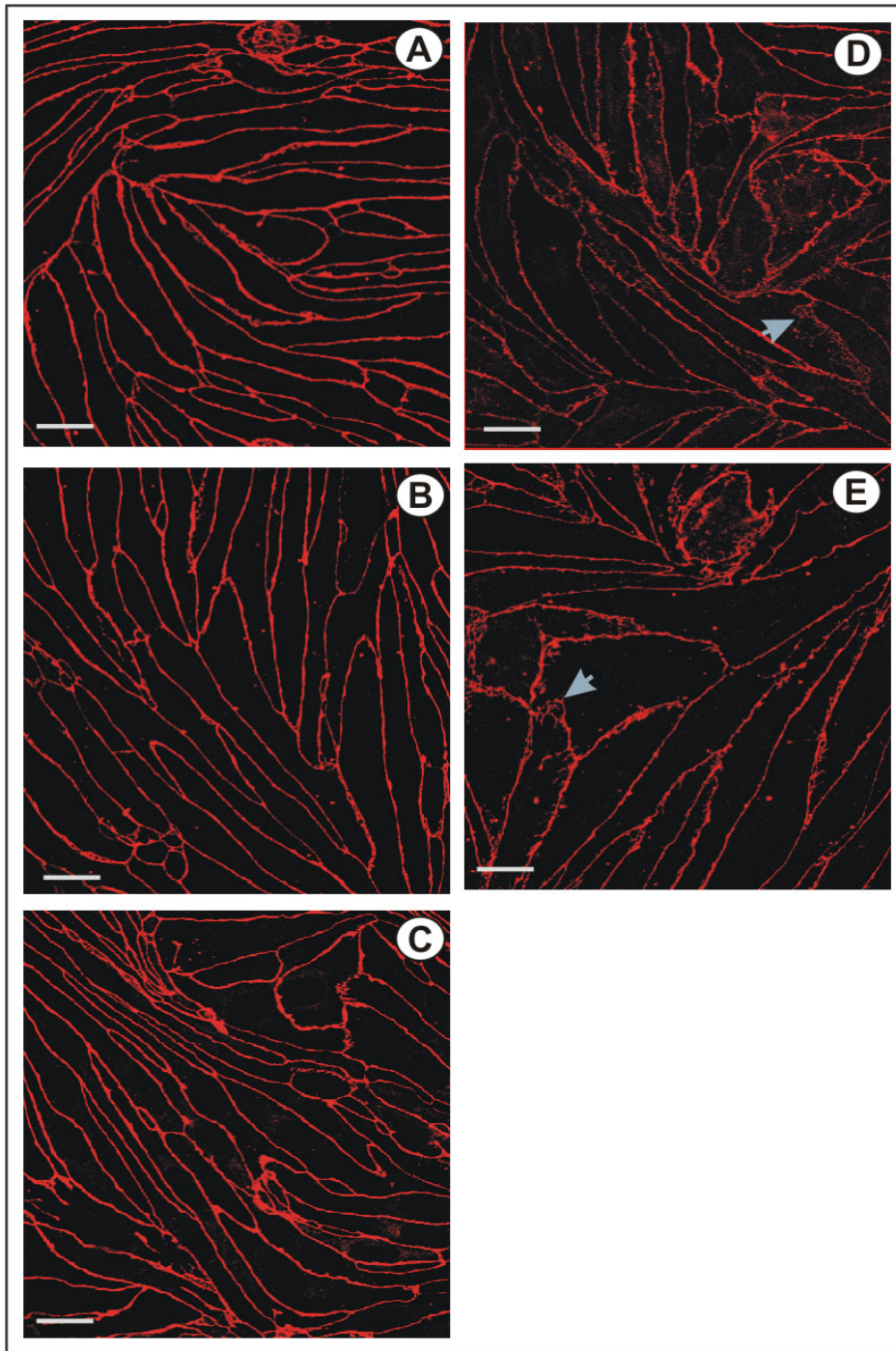


Abb. 3.36 A-E:

Immunzytochemischer Nachweis des tight junction-assoziierten Proteins ZO-1 nach der Inkubation der PBCEC mit TNF- α .

4-stündige Inkubation der PBCEC mit 2 bzw. 20 ng/ml TNF- α .

A: ohne TNF- α (CDM mit Zusatz von 55 nM HC).

B: 2 ng/ml TNF- α , apikales Filterkompartiment (CDM mit Zusatz von 55 nM HC).

C: 2 ng/ml TNF- α , basolaterales Filterkompartiment (CDM mit Zusatz von 55 nM HC).

D: 20 ng/ml TNF- α , apikales Filterkompartiment (CDM mit Zusatz von 55 nM HC).

E: 2 ng/ml TNF- α , apikales Filterkompartiment (CDM ohne HC).

Die immunzytochemische Analyse erfolgte am 7. DIV der PBCEC. Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC).

Vergrößerung: der Maßstabsbalken (1 cm) links unten in den Abbildungen entspricht bei Abbildung A – E 25 μ m.

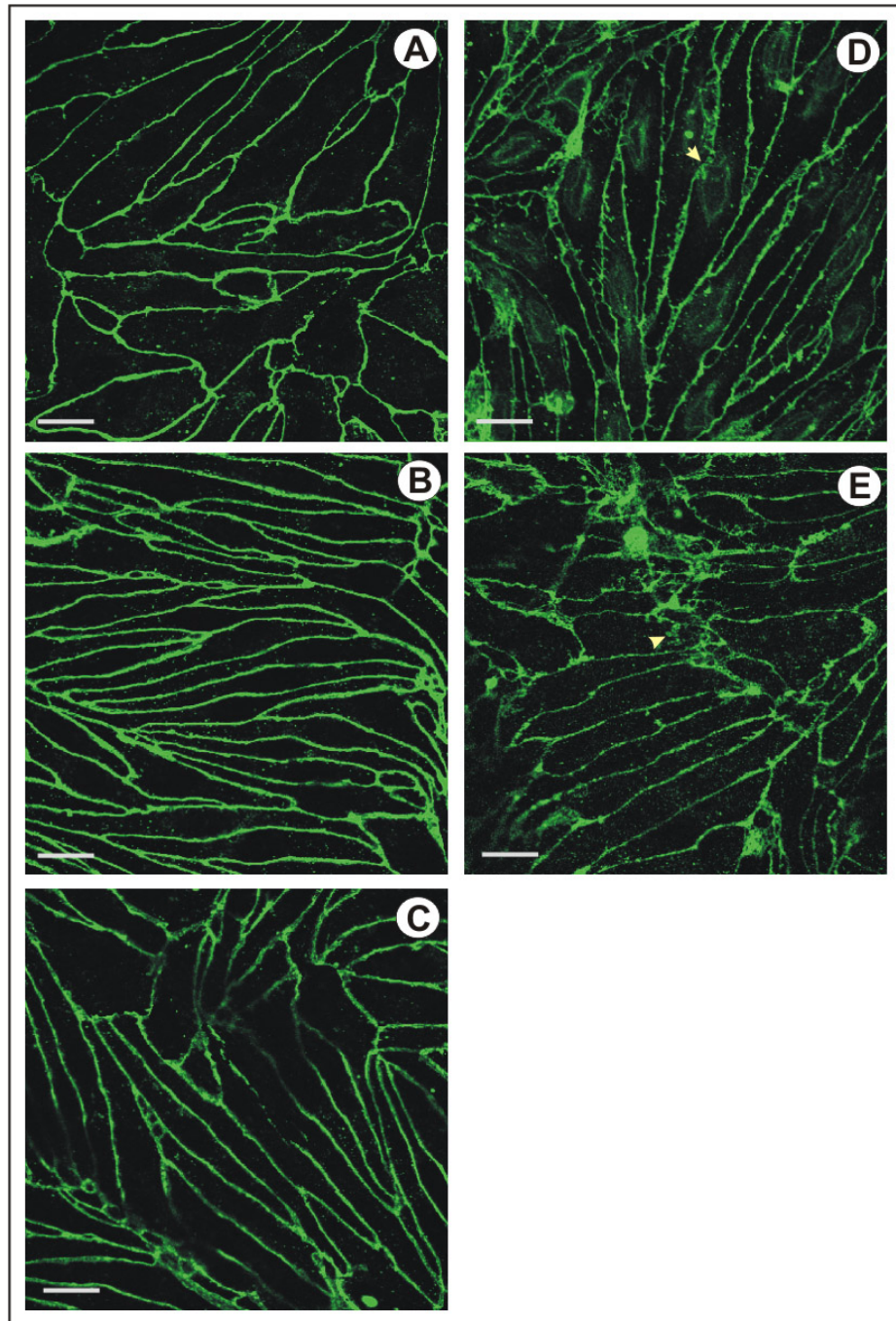


Abb. 3.37 A-E:

Einfluss des TNF- α auf die Expression des tight junction-assoziierten Proteins Claudin-5 der PBCEC.

4-stündige Inkubation der Endothelzellen mit 2 bzw. 20 ng/ml TNF- α .

A: ohne TNF- α (CDM mit Zusatz von 55 nM HC).

B: 2 ng/ml TNF- α , apikales Filterkompartiment (CDM mit Zusatz von 55 nM HC).

C: 2 ng/ml TNF- α , basolaterales Filterkompartiment (CDM mit Zusatz von 55 nM HC).

D: 20 ng/ml TNF- α , apikales Filterkompartiment (CDM mit Zusatz von 55 nM HC).

E: 2 ng/ml TNF- α , apikales Filterkompartiment (CDM ohne HC).

Die immunzytochemische Analyse erfolgte am 7. DIV der PBCEC. Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC).

Vergrößerung: der Maßstabsbalken (1 cm) links unten in den Abbildungen entspricht bei Abbildung A – E 25 μ m.

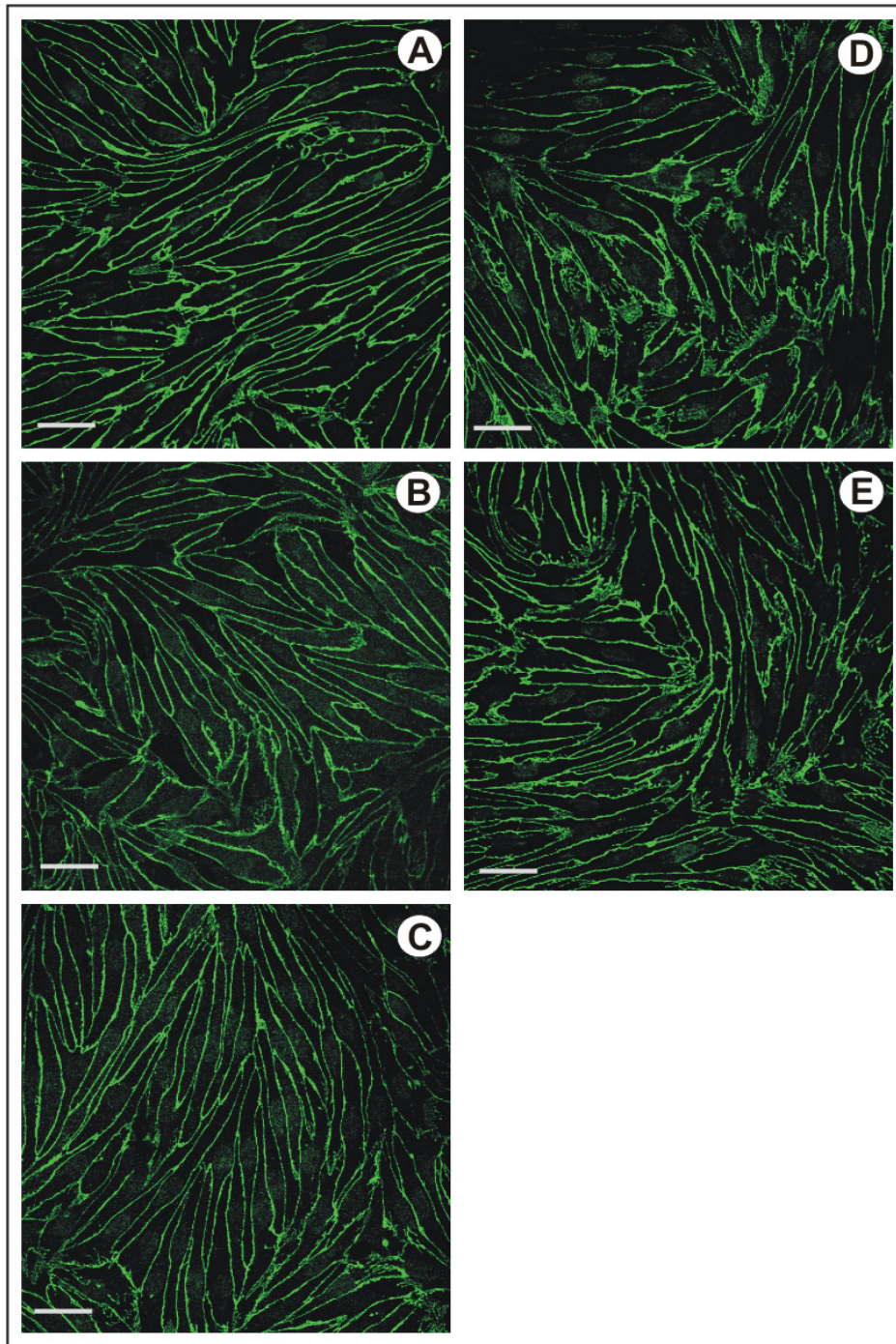


Abb. 3.38 A-E:

Einfluss des TNF- α auf die Expression des tight junction-assoziierten Proteins Occludin der PBCEC.

4-stündige Inkubation der Endothelzellen mit 2 bzw. 20 ng/ml TNF- α .

A: ohne TNF- α (CDM mit Zusatz von 55 nM HC).

B: 2 ng/ml TNF- α , apikales Filterkompartiment (CDM mit Zusatz von 55 nM HC).

C: 2 ng/ml TNF- α , basolaterales Filterkompartiment (CDM mit Zusatz von 55 nM HC).

D: 20 ng/ml TNF- α , apikales Filterkompartiment (CDM mit Zusatz von 55 nM HC).

E: 2 ng/ml TNF- α , apikales Filterkompartiment (CDM ohne HC).

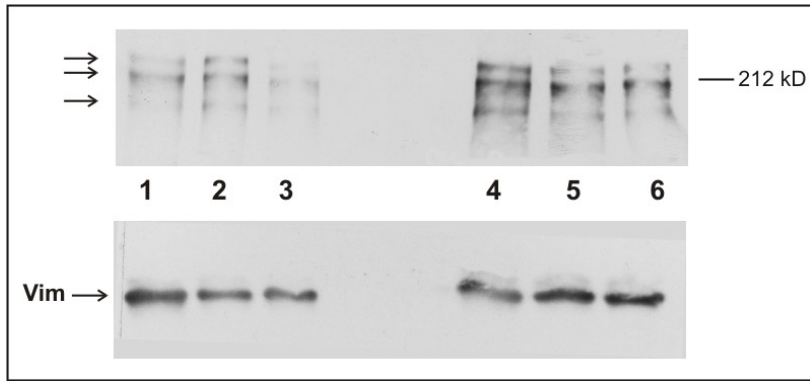
Die immunzytochemische Analyse erfolgte am 7. DIV der PBCEC. Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC).

Vergrößerung: der Maßstabsbalken (1 cm) links unten in den Abbildungen entspricht bei Abbildung A – E 25 μ m.

Zur Bestimmung der quantitativen Veränderung der Expression der *tight junction*-assoziierten Proteine ZO-1, Occludin und Claudin-5 durch die Inkubation der PBCEC mit TNF- α , wurden parallel zu den Immunfluoreszenzen Immunoblot-Analysen durchgeführt (s. Abb. 3.39 A-C).

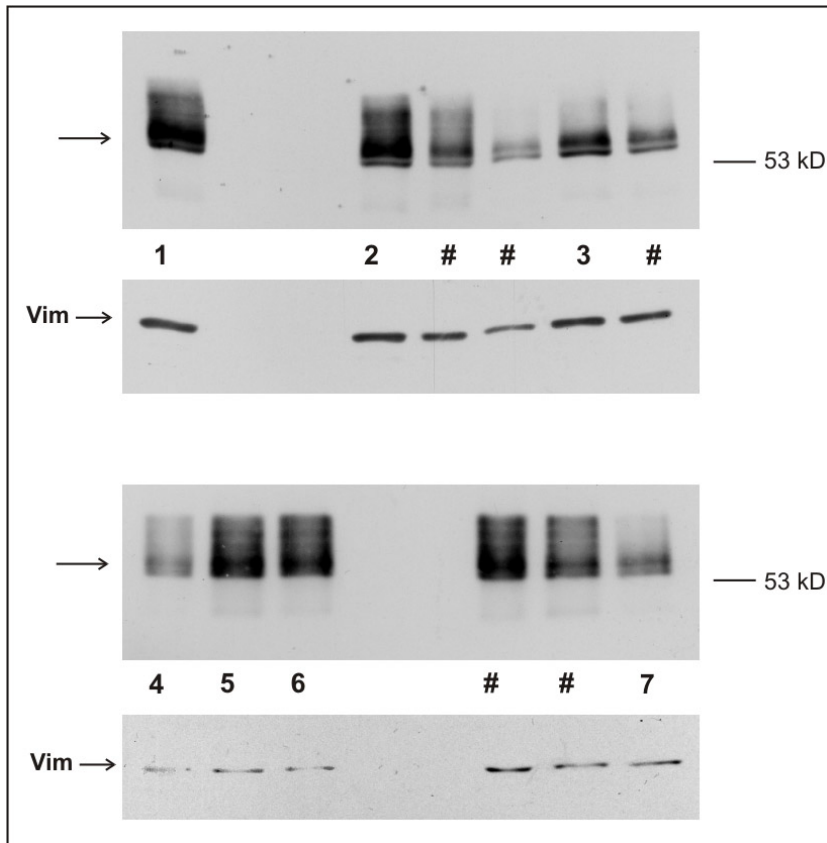
Die Western-Blot-Analysen, dargestellt in Abbildung 3.39 A-C zeigten, dass weder die Expression des Occludins noch die des ZO-1 und des Claudin-5 nach der Inkubation der PBCEC mit 2 ng/ml TNF- α in Hydrocortison-haltigem CDM quantitativ verändert wurde. In Abwesenheit von Hydrocortison im Kulturmedium der PBCEC und Zugabe von 2 ng/ml TNF- α kam es dagegen zu einer Schwächung der Ausprägung des oberen Teils der breitflächigen Bande des Occludins. Auch die Expression des ZO-1 wurde unter dieser Kulturbedingung verringert. Die Inkubation mit 20 ng/ml TNF- α der in Hydrocortison-haltigem CDM kultivierten PBCEC, führte ebenfalls zu einer schwächeren Ausprägung der Occludin-Bande. Die Claudin-5- und ZO 1-Expression der Endothelzellen wurde dagegen durch 20 ng/ml TNF- α nicht beeinflusst.

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit u. a. der Einfluss der Endothelzell-Leukozyten-Interaktion auf die Expression der *tight junction*-assoziierten Proteine untersucht werden sollte, musste sichergestellt sein, dass die barrierebildenden *tight junction*-Proteine nicht schon durch die Entzündungsaktivierung der PBCEC beeinträchtigt wurden. Sowohl die Ergebnisse der immunzytochemischen als auch die der Immunoblot-Analysen bestätigten, dass die an der Barrierefunktion beteiligten *tight junction*-assoziierten Proteine der PBCEC durch die mit 2 ng/ml TNF- α induzierte entzündliche Reaktion nicht beeinflusst wurden.



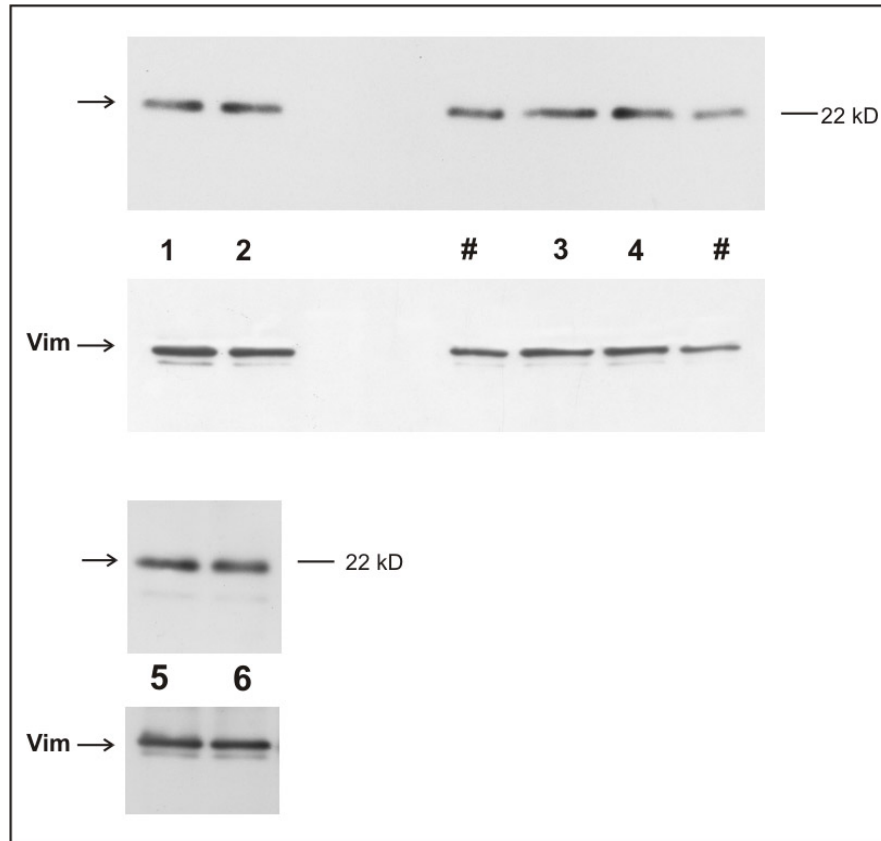
3.39 A: ZO-1

- 1: PBCEC, kultiviert in CDM ohne HC-Zusatz.
- 2: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC.
- 3: PBCEC, kultiviert in CDM ohne HC-Zusatz, Inkubation mit 2 ng/ml TNF- α .
- 4: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM H, Inkubation mit 0,2 ng/ml TNF- α .
- 5: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC, Inkubation mit 2 ng/ml TNF- α .
- 6: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC, Inkubation mit 20 ng/ml TNF- α .



3.39 B: Occludin

- 1: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC.
- 2: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC, Inkubation mit 2 ng/ml TNF- α .
- 3: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC, Inkubation mit 20 ng/ml TNF- α .
- 4: PBCEC, kultiviert in CDM ohne HC-Zusatz.
- 5: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC.
- 6: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC, Inkubation mit 2 ng/ml TNF- α .
- 7: PBCEC, kultiviert in CDM ohne HC-Zusatz, Inkubation mit 2 ng/ml TNF- α .



3.39 C: Claudin-5

- 1: PBCEC, kultiviert in CDM Zusatz von 55 nM HC.
- 2: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC, Inkubation mit 2 ng/ml TNF- α .
- 3: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC, Inkubation mit 2 ng/ml TNF- α .
- 4: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC, Inkubation mit 20 ng/ml TNF- α .
- 5: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC.
- 6: PBCEC, kultiviert in CDM ohne Zusatz von HC, Inkubation mit 2 ng/ml TNF- α .

Abb. 3.39 A-C:

Western-Blot-Analyse der tight junction-assoziierten Proteine ZO-1, Occludin und Claudin-5 der PBCEC nach der Inkubation der Endothelzellen mit TNF- α .

Die Inkubation der PBCEC mit TNF- α erfolgte jeweils 4 h. Da die PBCEC auf Kulturflaschen kultiviert wurden, erfolgte die Inkubation mit TNF- α grundsätzlich von der apikalen Seite. Die Probengewinnung der PBCEC erfolgte am 7. DIV. Gesamtproteinmenge/Geltasche: 2 μ g.

Der Pfeil markiert das jeweilige Protein (ZO-1, Occludin und Claudin-5). Die mit einer Raute (#) versehenen Blot-Banden betreffen nicht die Themenstellung dieses Kapitels und sind aus diesem Grund nicht nummeriert. Der Vimentin-Nachweis dient dem Abgleich der aufgetragenen Proteinmenge, da Vimentin unter allen Versuchsbedingungen von den PBCEC auf gleichem Niveau exprimiert wird.

Chemisch definiertes Medium(CDM), Hydrocortison (HC), Vimentin (Vim).

Zur morphologischen Detail-Analyse der Leukozyten-Transmigration war es notwendig zunächst der alleinige Einfluss des TNF- α auf die PBCEC-Morphologie zu untersuchen.

Die REM-Aufnahmen zeigten deutlich, dass durch die Zugabe von 2 ng/ml TNF- α zu den PBCEC die morphologische Zelloberflächenstruktur, insbesondere der *marginal folds* nicht verändert wurde. Dabei war es unerheblich, ob die TNF- α -Applikation in

das apikale oder basolaterale Filterkompartiment der Endothelzellen erfolgte (s. Abb. 3.40).

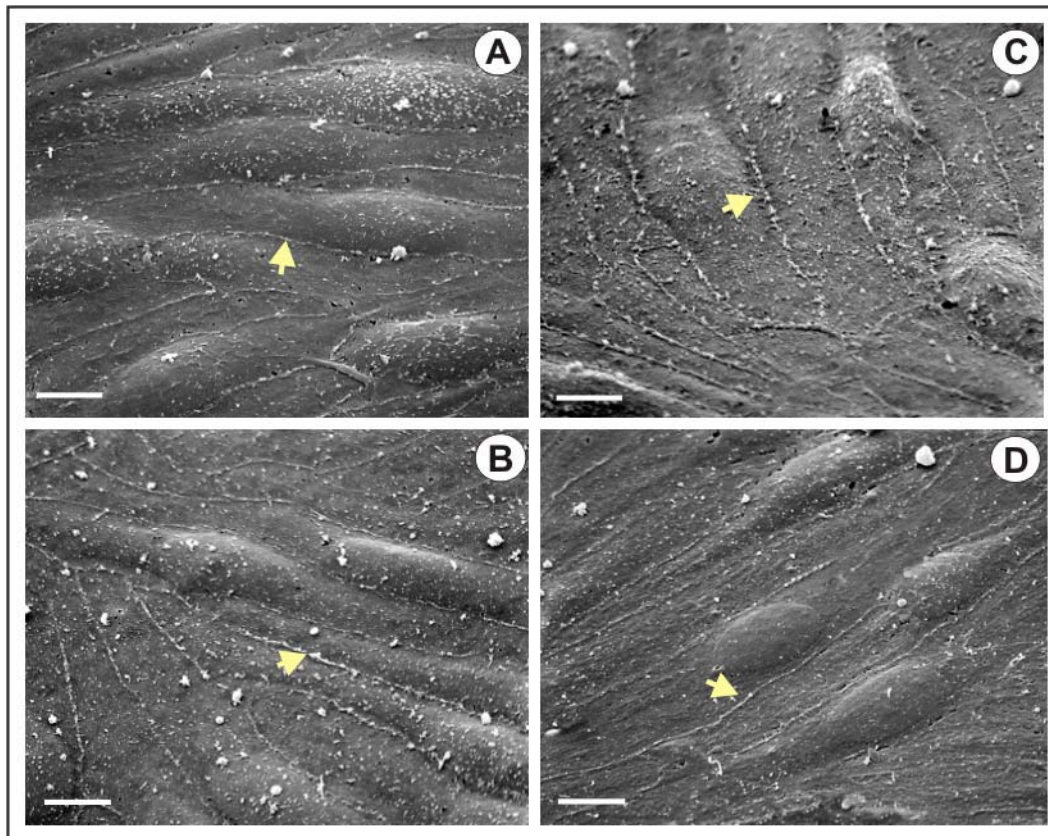


Abb. 3.40 A-D:

Der Einfluss von TNF- α auf die Morphologie der PBCEC.

REM-Aufnahmen der PBCEC, kultiviert in chemisch definiertem Medium mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison.

A: PBCEC ohne TNF- α .

B: Zugabe des TNF- α (2 ng/ ml) in das apikales Filterkompartiment.

C: Zugabe des TNF- α (2 ng/ ml) in das basolaterales Filterkompartiment.

D: Zugabe des TNF- α (2 ng/ ml) in das apikales und basolaterales Filterkompartiment

Inkubationsdauer der PBCEC mit TNF- α : 4 h. Die Fixierung der PBCEC zwecks der REM-Analyse erfolgte am 7. DIV. Der Pfeil zeigt die Zellgrenzen der PBCEC.

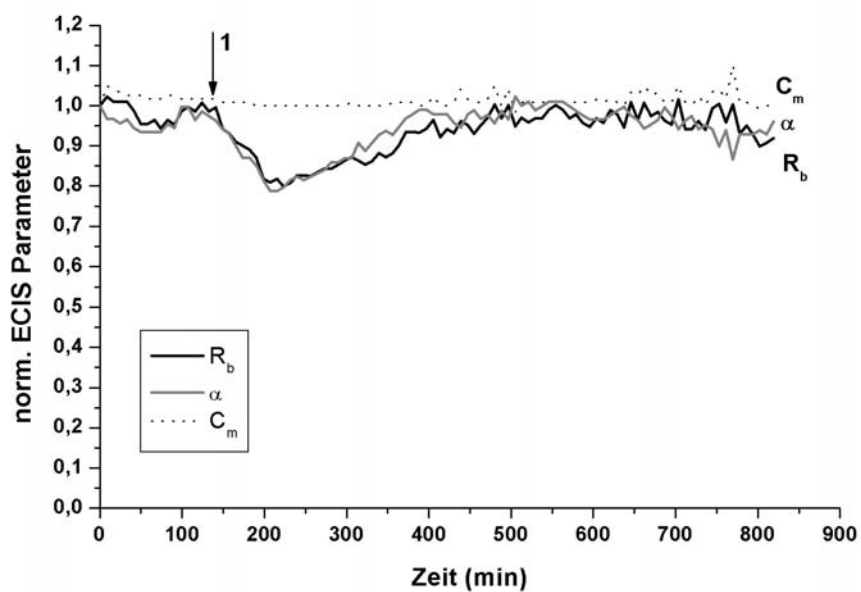
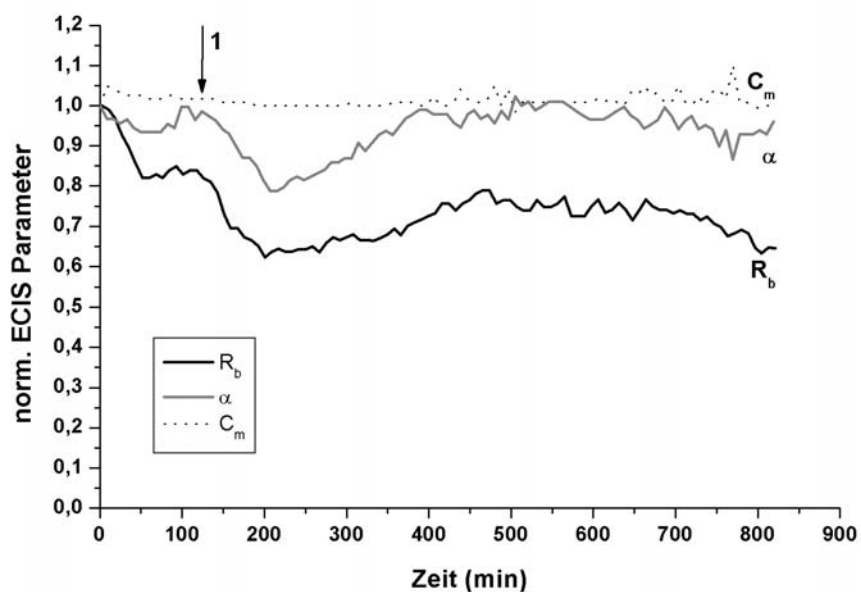
Vergrößerung: Der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m.

Parallel zu den REM-Untersuchungen wurde mit Hilfe der ECIS-Technik die funktionelle morphologische Veränderung der Zell-Zell-Kontakte (R_b), der Membrankapazität (C_m) und des Zell-Substrat-Kontakts (α) des PBCEC-Monolayers nach Applikation von 2 ng/ml TNF- α analysiert. Da speziell mit der ECIS-Technik die PBCEC-Leukozyten-Interaktion unter entzündlichen Bedingungen analysiert werden sollte, musste zunächst der alleinige Einfluss des TNF- α auf die cerebralen Endothelzellen ermittelt werden.

In Abbildung 3.41 ist der Verlauf der Messwerte der drei ECIS-Parameter, R_b , C_m und α nach Zugabe von 2 ng/ml TNF- α am 7. DIV der PBCEC dargestellt. Da der Kurvenverlauf der ECIS-Parameter nach der TNF- α -Zugabe zu den aus unterschied-

lichen Präparationen stammenden PBCEC, die den Primärkultur-typischen Unregelmäßigkeiten unterworfen waren nicht konstant einheitlich war, wurden exemplarisch zwei ECIS-Messungen unterschiedlicher PBCEC-Präparationen dargestellt (vergl. Abb. 3.41 A und B).

Am 7. DIV war die Barrierefunktion der PBCEC üblicherweise maximal ausgeprägt (s. Kap. 3.1.1.1), weshalb zur Standardisierung der ECIS-Experimente dieser Kulturtag gewählt wurde. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 3.42 der Einfluss des TNF- α auf die PBCEC eines späteren Kulturtages (9. DIV) exemplarisch dargestellt, an dem der TER der Endothelzellen noch ausreichend gut entwickelt war.

A**B**

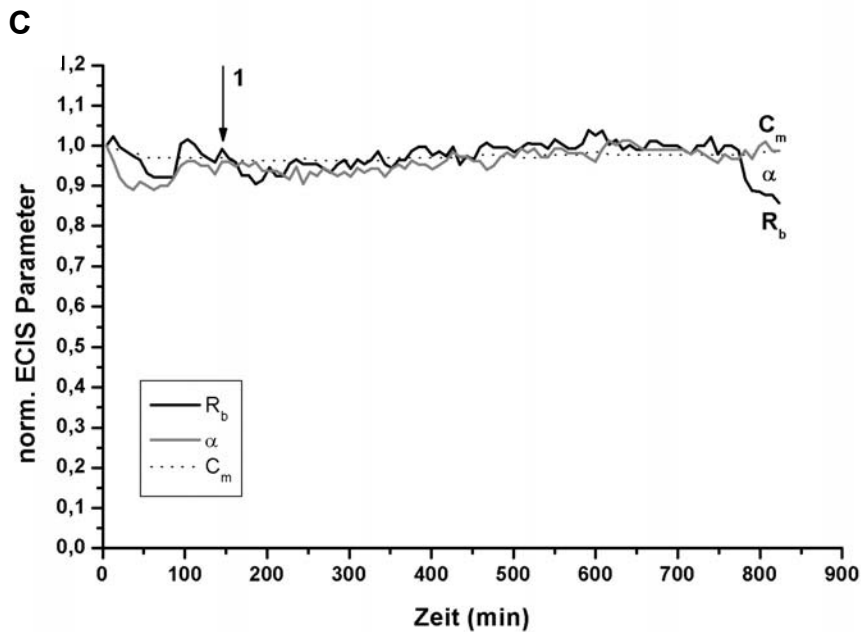


Abb. 3.41 A-C:

Der Einfluss des TNF- α auf die ECIS-Parameter R_b , α und C_m der PBCEC unterschiedlicher Präparationen (7. DIV).

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Werte des Zell-Zell-Kontakts (R_b), der Membrankapazität (C_m) und des Zell-Substrat-Kontakts (α) nach Zugabe von TNF- α .

A: Zugabe von 2 ng/ml TNF- α in 300 μ l CDM (1); PBCEC (Präp. I)

B: Zugabe von 2 ng/ml TNF- α in 300 μ l CDM (1); PBCEC (Präp. II)

C: Zugabe von 300 μ l CDM (1)

Die Messungen erfolgten am 7. DIV. Der eingezeichnete mit 1 versehene Pfeil markiert die Zugabe des TNF- α bzw. des chemisch definierten Mediums (CDM).

$R_b(0) = 216 \Omega \times \text{cm}^2$ (A), $317 \Omega \times \text{cm}^2$ (B), $229 \Omega \times \text{cm}^2$ (C); $\alpha(0) = 52 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ (A), $58 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ (B), $57 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ (C) und $C_m(0) = 1,2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (A), $1,17 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (B), $1,33$ (C) geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$, $\alpha(0)$ und $C_m(0)$ normiert.

Die ECIS-Studie in Abbildung 3.41 A zeigt, dass es nach der Applikation von 2 ng/ml TNF- α zu den PBCEC zunächst zu einer reversiblen Senkung der Werte für R_b und α kam, die nach ca. 2 Stunden wieder ihre Ausgangswerte erreichten. Wie der Kurvenverlauf der beiden Parameter zeigte, war das Maß der reversiblen Reduzierung von R_b und α identisch und erfolgte zeitgleich. Direkt nach der TNF- α -Zugabe kam es zunächst zu einer gemeinsamen Schwächung der interendothelialen Zell-Kontakte und des Zell-Matrix-Kontakts. Eine etwas verzögerte Reduzierung des Werts von α im Vergleich zu R_b konnte teilweise beobachtet werden, war jedoch aufgrund des großen Zeitfensters und der Primärkultur-bedingten Schwankungen der PBCEC nicht konstant bei den ECIS-Experimenten detektierbar. Nach der ca. 80-minütigen Schwächung des Zell-Matrix- und des Zell-Zell-Kontakts kam es zeitgleich während der Regenerationsphase zur Festigung der beiden Parameter. Allerdings stieg der Wert von α schneller an als der von R_b , so dass α ca. 2 Stunden früher als R_b sein

Ausgangsniveau wieder erreichte. Die der Widerstandssenkung nach der TNF- α -Applikation folgende Regenerationsphase erfolgte konstant durch den initialen Anstieg des Parameters α , dem der Anstieg von R_b verzögert folgte. Insgesamt erreichten die ECIS-Werte des Zell-Matrix- und des Zell-Zell-Kontakts, in Abhängigkeit vom Kulturzustand der primär kultivierten PBCEC, ca. 4-5 Stunden nach der TNF- α Zugabe wieder ihr Ausgangsniveau. Der Wert der Membrankapazität (C_m) änderte sich durch das TNF- α generell nicht.

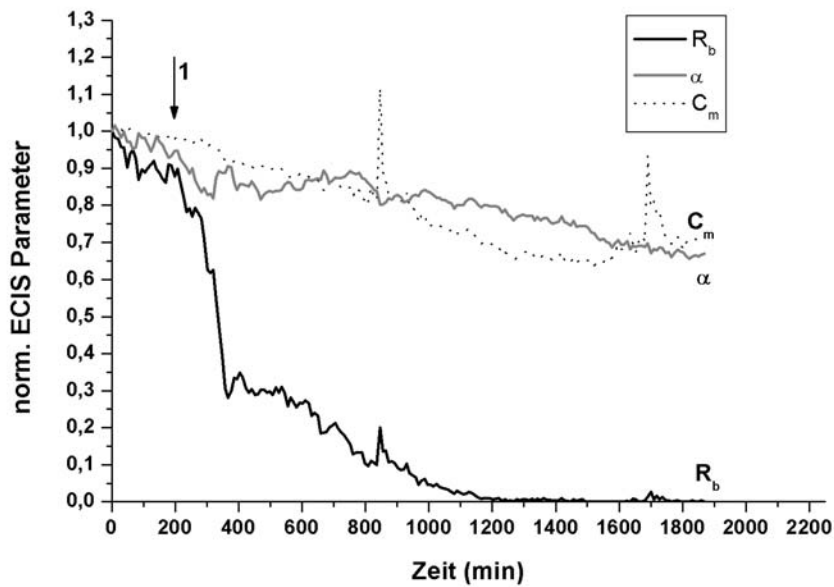
Die ECIS-Analyse des TNF- α -Effekts auf die PBCEC verdeutlichte, dass der Zeitpunkt der Leukozyten-Applikation zu den Endothelzellen entsprechend der Regeneration der Werte für R_b und α gewählt werden musste. Eine Trennung des Leukozyten- vom TNF- α -Effekt auf die PBCEC wäre ansonsten nicht durchführbar..

Im Gegensatz zum Kurvenverlauf der Werte von R_b und α der PBCEC des 7. DIV, verliefen die ECIS-Messwerte der PBCEC des 9. DIV trotz der Zugabe der gleichen Substanz in identischer Konzentration völlig unterschiedlich. So wurde der Zell-Zell-Kontakt (R_b) der Endothelzellen durch die Applikation von 2 ng/ml TNF- α innerhalb von 1,5 Stunden um ca. 70 % irreversibel gesenkt und erreichte schließlich nach 20 Stunden seinen Nullwert. Der Wert für α wurde durch den TNF- α -Zusatz zu den PBCEC des 9. DIV nicht zeitgleich mit R_b gesenkt, wie dies bei den PBCEC des 7. DIV der Fall war. Vielmehr nahm der Messwert sowohl von α als auch von C_m über den gesamten gemessenen Zeitraum geringfügig aber stetig und irreversibel ab.

Wie die Gegenüberstellung der ECIS-Analyse des TNF- α -Effekts auf die PBCEC des 7. DIV und des 9. DIV verdeutlichte, stellte das `Alter` des konfluent gewachsenen PBCEC-Monolayers einen entscheidenden Faktor bezüglich der Antwort von R_b und α auf den externen Stimulus dar.

Zur Optimierung des Entzündungskulturmodells, d. h. zur Induzierung einer maximalen E-Selektin-Expression in Kombination mit einer stark entwickelten Barrierefunktion der PBCEC wurde schließlich das Hydrocortison-haltige Modell mit einer Hydrocortison-Konzentration von 55 nM gewählt, dem zur Entzündungsinduktion 2 ng/ml TNF- α zugesetzt wurde.

A



B

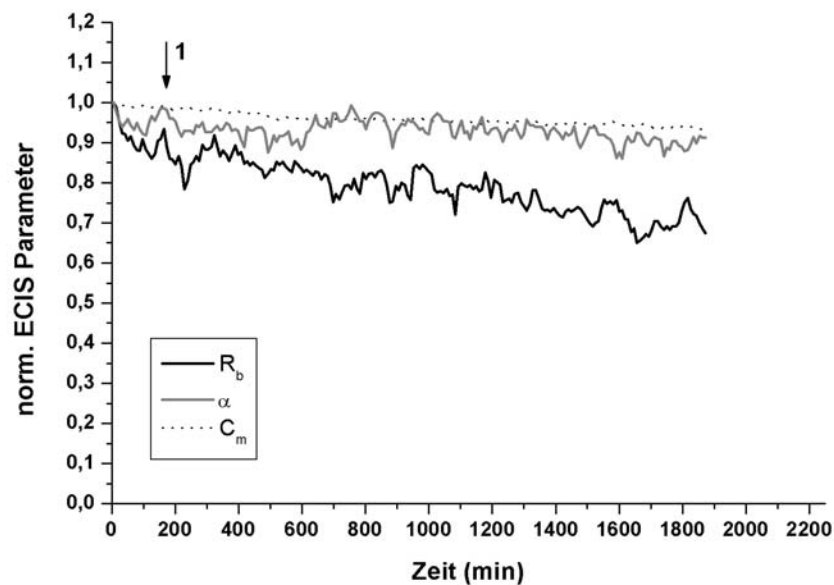


Abb. 3.42 A und B:

Einfluss des TNF- α auf die ECIS-Parameter R_b , α und C_m der PBCEC unter Berücksichtigung des DIV der PBCEC (9. DIV).

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Werte des Zell-Zell-Kontakts (R_b), der Membrankapazität (C_m) und des Zell-Substrat-Kontakts (α) nach Zugabe von TNF- α .

Die Messung erfolgte exemplarisch am 9. DIV. Der eingezeichnete mit 1 versehene Pfeil markiert die Zugabe des TNF- α bzw. des chemisch definierten Mediums (CDM).

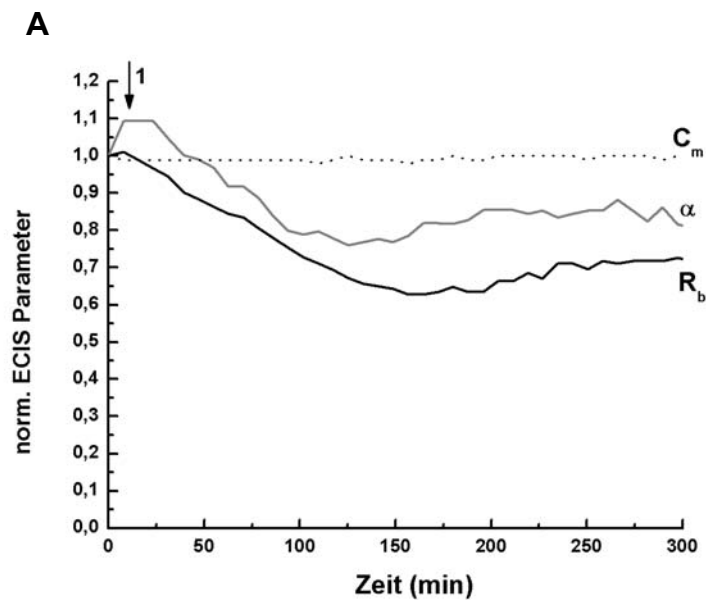
A: Zugabe von 2 ng/ml TNF- α in 300 μ l CDM (1).

B: Zugabe von 300 μ l CDM (1)

$R_b(0) = 90 \Omega \times \text{cm}^2$ (A), $124 \Omega \times \text{cm}^2$ (B); $\alpha(0) = 41 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ (A), $47 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ (B) und $C_m(0) = 1,4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (A), $1,5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (B) geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$, $\alpha(0)$ und $C_m(0)$ normiert.

3.1.2.3 LPS

Mit Hilfe der ECIS-Technik war es möglich, effizient und schnell den Einfluss unterschiedlicher Substanzen wie z. B. verschiedener Entzündungsmediatoren auf den Zell-Zell- und Zell-Substrat-Kontakt der PBCEC zu bestimmen. So wurde bei der Ermittlung eines geeigneten Entzündungsmediators der PBCEC parallel zum TNF- α der Einfluss des Lipopolysaccharids (LPS) untersucht. LPS ist ein bakterielles Endotoxin, das zur Induzierung und Analyse entzündlicher Prozesse am Endothel verwendet wird. Wie aus der Abbildung 3.43 ersichtlich wird, verursachte die Applikation einer in der Literatur üblicherweise eingesetzten Konzentration von 1 bis 5 $\mu\text{g/ml}$ LPS eine erhebliche Beeinträchtigung bis hin zum Zusammenbruch der Barrierefunktion der PBCEC, was sich in einer signifikanten Abnahme der Werte für R_b und α äußerte.



B

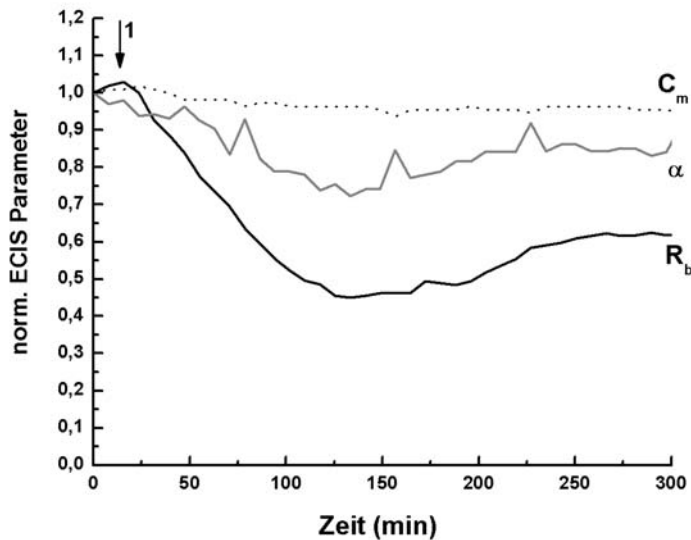


Abb. 3.43 A und B:

Der Einfluss des LPS auf die ECIS-Parameter R_b , α und C_m der PBCEC.

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Werte des Zell-Zell-Kontakts (R_b), der Membrankapazität (C_m) und des Zell-Substrat-Kontakts (α) nach Zugabe von LPS

A: Zugabe von 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS in 300 μl CDM (1)

B: Zugabe von 5 $\mu\text{g/ml}$ LPS in 300 μl CDM (1).

Die Messungen erfolgten am 7. DIV. Der eingezeichnete mit 1 versehene Pfeil markiert die Zugabe des LPS.

$R_b(0) = 120 \Omega \times \text{cm}^2$ (A), $110 \Omega \times \text{cm}^2$ (B); $\alpha(0) = 51 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ (A), $48 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ (B) und $C_m(0) = 1,2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (A), $1,6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (B) geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$, $\alpha(0)$ und $C_m(0)$ normiert.

Die immunzytochemischen Studien der Expression des *tight junction*-assoziierten Proteins ZO-1 der PBCEC zeigten, dass durch die Inkubation der Endothelzellen mit LPS die Expression des ZO-1 beeinträchtigt wurde. Allerdings war das Maß der Beeinträchtigung der ZO-1-Expression der PBCEC durch die Inkubation mit LPS nicht konstant. In der Abbildung 3.44 ist die maximale Beeinflussung der ZO-1-Ausprägung nach der Inkubation der PBCEC mit LPS dargestellt.

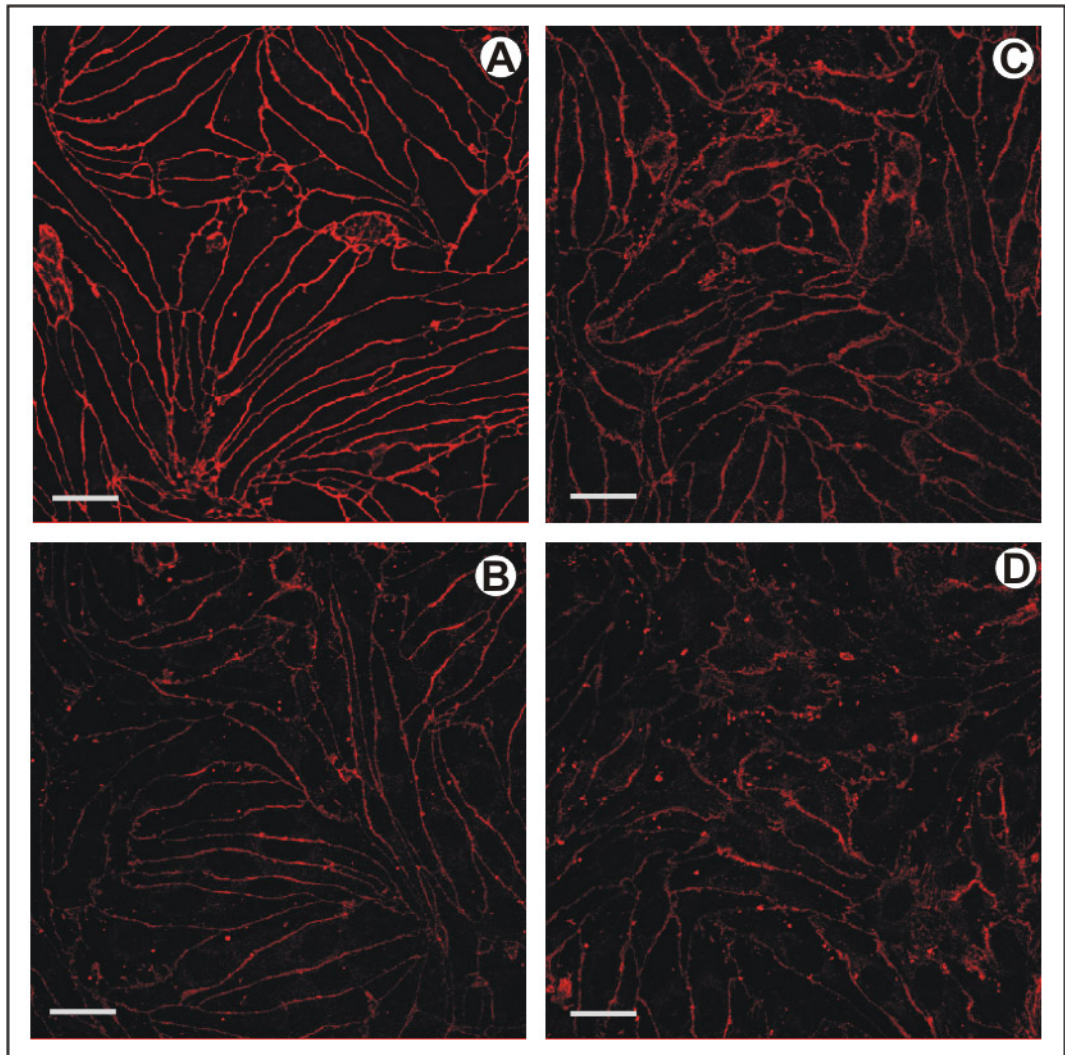


Abb. 3.44 A-D:

Immunzytochemischer Nachweis des tight junction-assoziierten Proteins ZO-1 nach der Inkubation der PBCEC mit LPS.

4-stündige Inkubation der Endothelzellen mit 1 bzw. 2 µg/ml LPS. Die immunzytochemische Analyse der PBCEC erfolgte am 7. DIV.

A: PBCEC ohne LPS

B: Inkubation mit 1 µg/ml LPS, Zugabe in das apikale Filterkompartiment.

C: Inkubation mit 1 µg/ml LPS, Zugabe in das basolaterale Filterkompartiment.

D: Inkubation mit 2 µg/ml LPS; Zugabe in das basolaterale Filterkompartiment.

Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison.

Vergrößerung: der Maßstabsbalken links unten in den Abbildungen entspricht 20 µm.

Aufgrund der Beeinträchtigung sowohl der Barrierefunktion als auch der ZO-1-Expression der PBCEC durch LPS wurde auf diesen Entzündungsaktivator im PBCEC-Modell verzichtet.

3.1.2.4 Die Matrixmetalloproteasen-Sekretion

Matrixmetalloproteasen (MMPs), insbesondere die MMP-9 und MMP-2, spielen eine wichtige Rolle bei der Leukozyten-Endothelzell-Wechselwirkung und sind am Durch-

tritt der Leukozyten durch die Basalmembran des Endothels beteiligt (Kubes and Ward, 2000). Welchen Einfluss die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion auf die Exozytose spezifischer Matrixmetalloproteasen ausübte und welchen Effekt die MMPs dabei auf die Barriereigenschaften der Blut-Hirn-Schranke ausübten, war ein weiterer wichtiger Aspekt zur Charakterisierung der Leukozyten-Transmigration durch den cerebralen Endothelzell-Monolayer.

Vor der MMP-Analyse der PBCEC-Leukozyten-Interaktion wurde zunächst überprüft, inwieweit durch die alleinige Inkubation der Endothelzellen mit TNF- α Matrixmetalloproteasen von den PBCEC sezerniert wurden.

Die Abbildung 3.45 zeigt, dass die unbehandelten PBCEC in Anwesenheit von Hydrocortison (ohne TNF- α -Zugabe), kultiviert auf Transwell[®]-Filtersystemen bzw. ECIS-Goldelektroden, keine MMPs sezernierten (s. Abb. 3.45 / Spur 0 und 1). MMP-2 wurde aufgrund unvermeidlicher, minimaler Serum-Restrückstände in dem apikalen Filterkompartiment nach Umstellung der PBCEC von serumhaltigen auf serumfreie Kulturbedingungen nachgewiesen. Die Proben, die dem basolateralen Filterkompartiment entnommen wurden, wiesen keine MMP-2 auf. Allerdings konnte das serumhaltige CDM zur Umstellung der PBCEC auf serumfreie Kulturbedingungen aus der basolateralen Filterkammer vollständig entfernt werden. Auch nach Zusatz von 2 ng/ml TNF- α in das basolaterale Filterkompartiment der PBCEC und der Probenentnahme aus demselbigen, konnten keine zusätzlichen Matrixmetalloproteasen nachgewiesen werden. Lediglich nach der Zugabe des TNF- α in das apikale Filterkompartiment, wurde zusätzlich zu MMP-2 (s. o.) eine minimale Menge MMP-9 nachgewiesen, die allerdings für die folgende Untersuchung der Neutrophilen-Endothelzell-Interaktion unerheblich war.

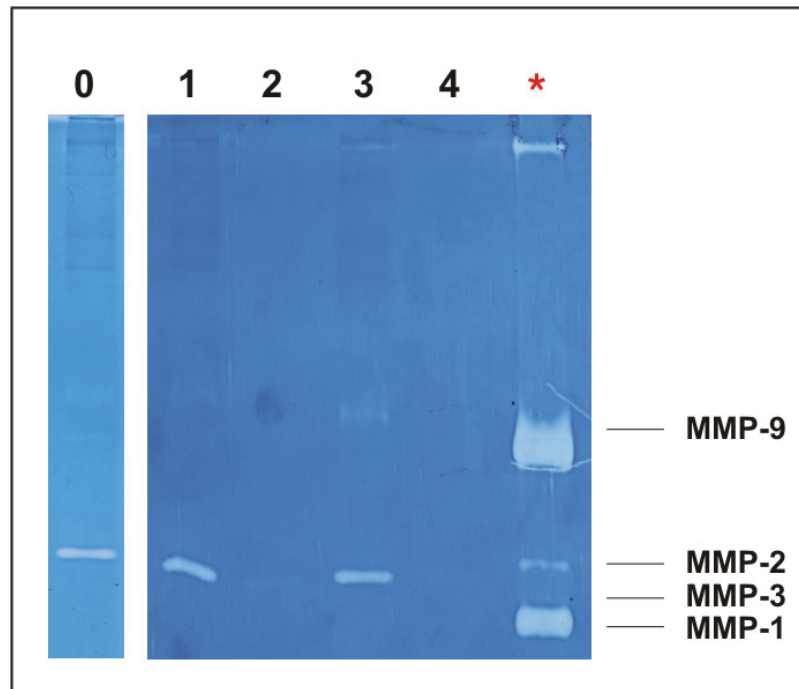


Abb. 3.45:

Die MMP-Sekretion entzündungsaktivierter bzw. nicht aktivierter PBCEC.

0: MMP-Sekretion der PBCEC kultiviert auf ECIS-Goldelektroden, kurz vor Zugabe der Neutrophilen.

1 - 4: MMP-Sekretion der PBCEC, kultiviert auf Transwell®-Filtern:

1: Medien-Überstand der PBCEC aus der apikalen Filterkammer.

2: Medien-Überstand der PBCEC aus der basolateralen Filterkammer.

3: Inkubation (6h) der PBCEC mit 2 ng/ml TNF- α (TNF- α Zugabe in das apikale Filterkompartiment), Probenentnahme aus der apikalen Filterkammer.

4: Inkubation (6h) der PBCEC mit 2 ng/ml TNF- α (TNF- α Zugabe in das apikale Filterkompartiment), Probenentnahme aus der basolateralen Filterkammer.

* MMP-Control-1 (Fa. Sigma)

Die Entnahme des Medienüberstands zur Durchführung der Zymographie erfolgte am 7.DIV der PBCEC. Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison.

3.2 Die Endothelzell-Leukozyten-Interaktion

Im gesunden Organismus sorgt die Blut-Hirn-Schranke (BHS) für ein konstantes Hirnmilieu (Homöostase), das als Voraussetzung für eine normale Hirnfunktion gilt. Darüber hinaus nimmt die Blut-Hirn-Schranke eine besondere Stellung in der Immunüberwachung ein, indem sie den Durchtritt von Leukozyten in das zentrale Nervensystem (ZNS) verhindert. Dieses sogenannte Immunoprivileg des ZNS ist unter bestimmten pathologischen Bedingungen gestört und kann zum Durchtritt der Entzündungszellen durch die endotheliale Barriere führen, was mit zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht wird. Die Etablierung eines Entzündungs-Kulturmodells der BHS, das bezüglich seiner Zellmorphologie und Barrierefunktion die BHS *in vivo* widerspiegelt und eine Entzündungsaktivierung unter kontrollierten Bedingungen erlaubte, ohne dabei die Barriereeigenschaft oder die Morphologie der cerebralen Endothelzellen zu modifizieren, ermöglichte erstmals eine Charakterisierung der Leukozyten-Transmigration *in vitro* unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen.

Der Prozess der transendothelialen Leukozyten-Migration ist auf molekularer Ebene wenig verstanden. Insbesondere ist unklar, ob die Leukozyten den cerebralen Endothelzell-Monolayer parazellulär durch die Öffnung oder Zerstörung der *tight junctions*, oder aber transzellulär, durch das Zytoplasma des Endothelzellkörpers hindurch überwinden. Die Lokalisation des Transmigrationsweges der Leukozyten durch das Endothel der Blut-Hirn-Schranke stand im Fokus der Untersuchungen dieser Arbeit. Um erste wichtige Anhaltspunkte der transendothelialen Migration zu erhalten, wurde mit Hilfe der ECIS-Technik die morphologische Veränderung der Endothelzell-Morphologie in Form der ECIS-Parameter R_b , α und C_m während der Leukozyten-Interaktion bestimmt. Dadurch, dass die ECIS-Technik die morphologischen Veränderungen der PBCEC nicht-invasiv und in einer Zeitauflösung von Minuten verfolgt, war diese Methode hervorragend dafür geeignet, die Änderungen der Barrierefunktion des PBCEC-Monolayers während der Endothelzell-Leukozyten-Interaktion zu analysieren und mit den immunzytochemischen Studien der *tight junction*-assoziierten Proteine und den REM-Analysen zu korrelieren.

3.2.1 Vitalitätsbestimmung der Leukozyten

Zur Kontrolle der Vitalität der in den Transmigrationsstudien verwendeten Leukozyten wurde für die neutrophilen Granulozyten die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und für die T-Lymphozyten die ConA-induzierte Proliferation bestimmt.

Da die Immunzellen während der Inkubation mit den PBCEC und zwecks der Gewinnung des Leukozyten-konditionierten Mediums zur MMP-Analyse serumfreien Kultur-

bedingungen ausgesetzt waren, wurden die Leukozyten vor Einsatz im Entzündungsmodell einige Stunden in CDM kultiviert, bevor ihre Vitalität bestimmt wurde. Die Leukozyten wurden noch am Tag ihrer Präparation in den Transmigrationsstudien eingesetzt.

3.2.1.1 T-Helferzellen

Zur Bestimmung der Vitalität der T-Lymphozyten wurde ein Aliquot der dargestellten Zellen mittels des Mitogens ConA stimuliert und die Proliferation mit Hilfe des BrdU-Assays bestimmt. Während dieses Prozesses wird BrdU (5-Bromo-2'-desoxyuridin) in die sich replizierende DNA eingebaut und im ELISA mittels eines BrdU-spezifischen Antikörpers bestimmt.

Die CD4⁺ T-Helferzellen wurden vor Einsatz im BrdU-Assay 48 Stunden in serumhaltigem Medium kultiviert und durch 5 µg/ml Concanavalin A (ConA) zur Proliferation aktiviert, bevor sie vor ihrer Fixierung für 6 Stunden in CDM mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison inkubiert wurden. Vor der Bestimmung der Extinktionswerte, die in Tabelle 3.2 dargestellt sind, wurden die T-Helferzellen lichtmikroskopisch kontrolliert. Im Vergleich zu den nicht stimulierten Immunzellen hatten die mit ConA aktivierten T-Helferzellen zahlreiche Klone gebildet, die im Mikroskop als Zellhaufen deutlich zu erkennen waren.

Tabelle 3.2:

Extinktionswerte der mit ConA aktivierten T-Lymphozyten nach Durchführung des BrdU-Assays.

Zellzahl/ml CDM	mit ConA (5 µg/ml)	ohne ConA- Stimulation	Δ
5 x 10 ⁴	0,009	0,001	0,008
1 x 10 ⁵	0,055	-0,001	0,056
5 x 10 ⁵	0,079	0,007	0,072
1 x 10 ⁶	0,104	0,023	0,081

Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium (CDM) mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Messung der Extinktionswerte bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Extinktion in Anwesenheit von Zellen wurde als Leerkontrolle von allen Werten subtrahiert.

Wie die Tabelle 3.2 zeigt, induziert ConA eine gut messbare, Zellzahl-abhängige Proliferation der T-Lymphozyten. Die nachgewiesene Proliferationstätigkeit der stimulierten T-Helferzellen und somit ihre Vitalität stellte sicher, dass die T-Lymphozyten unter den gleichen Zellkulturbedingungen wie die PBCEC für eine ausreichende Zeit lebensfähig waren. Eine Kokultur der T-Helferzellen mit den Endothelzellen unter den serumfreien Kulturbedingungen war somit durchführbar.

Zur weiteren Kontrolle wurden die T-Lymphozyten lichtmikroskopisch untersucht. Im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen hatten die mit ConA aktivierten T-Helferzellen zahlreiche Klone gebildet. Eine Trypanblau-Färbung ergab, dass nur ein sehr geringer Prozentsatz der Zellen (2 %) keine intakten Zellmembranen besaßen.

3.2.1.2 Neutrophile Granulozyten

Zur Vitalitätsbestimmung der neutrophilen Granulozyten wurde ein Superoxid-Assay durchgeführt, bei dem die Menge der freigesetzten reaktiven Sauerstoffspezies mittels Reduktion des Cytochrom C photometrisch bestimmt wurde.

Tabelle 3.3:

Superoxid-Assay

+ PMA	-PMA
0,97	0,56

Extinktionswerte der neutrophilen Granulozyten. Eingesetzte Zellzahl je Probe: 5×10^6 Zellen. 80 μ M Cytochrom c, PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; n = 3.

Die Extinktion eines Parallelansatzes in Gegenwart der Superoxiddismutase wurden von allen Werten subtrahiert.

Der Superoxid-Assay zeigte eindeutig, dass die PMA-stimulierten neutrophilen Granulozyten zum „oxidative burst“ befähigt waren. Allerdings zeigten die nicht stimulierten Zellen eine relativ hohe spontane Superoxid-Produktion. Es ist nicht auszuschließen, dass die Zellen durch die Präparation unspezifisch aktiviert wurden.

Zur weiteren Kontrolle wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop mit Trypanblau gefärbt. Die Prozentsatz der nicht gefärbten Zellen, d.h. derjenigen Zellen mit funktionsfähiger Zellmembran betrug 97 %.

Die Vitalitätsbestimmung sowohl der Neutrophilen als auch der CD4⁺-T-Helferzellen zeigte, dass die Leukozyten, die im gleichen Medium wie das der PBCEC inkubiert wurden, kurz vor deren Einsatz im PBCEC-Entzündungsmodell vital waren.

3.2.2 Die Neutrophilen-Endothelzell-Interaktion

Zur Untersuchung des Einflusses der Neutrophilen auf die PBCEC-Barrierefunktion wurden impedanzspektroskopische Untersuchungen durchgeführt.

In Abbildung 3.46 dargestellt, sind die mit der ECIS-Technik ermittelten Werte der Parameter R_b , α und C_m , die die morphologische Veränderung der entzündungsaktivierten bzw. nicht aktivierten PBCEC während der Interaktion mit den neutrophilen Granulozyten aufzeigen.

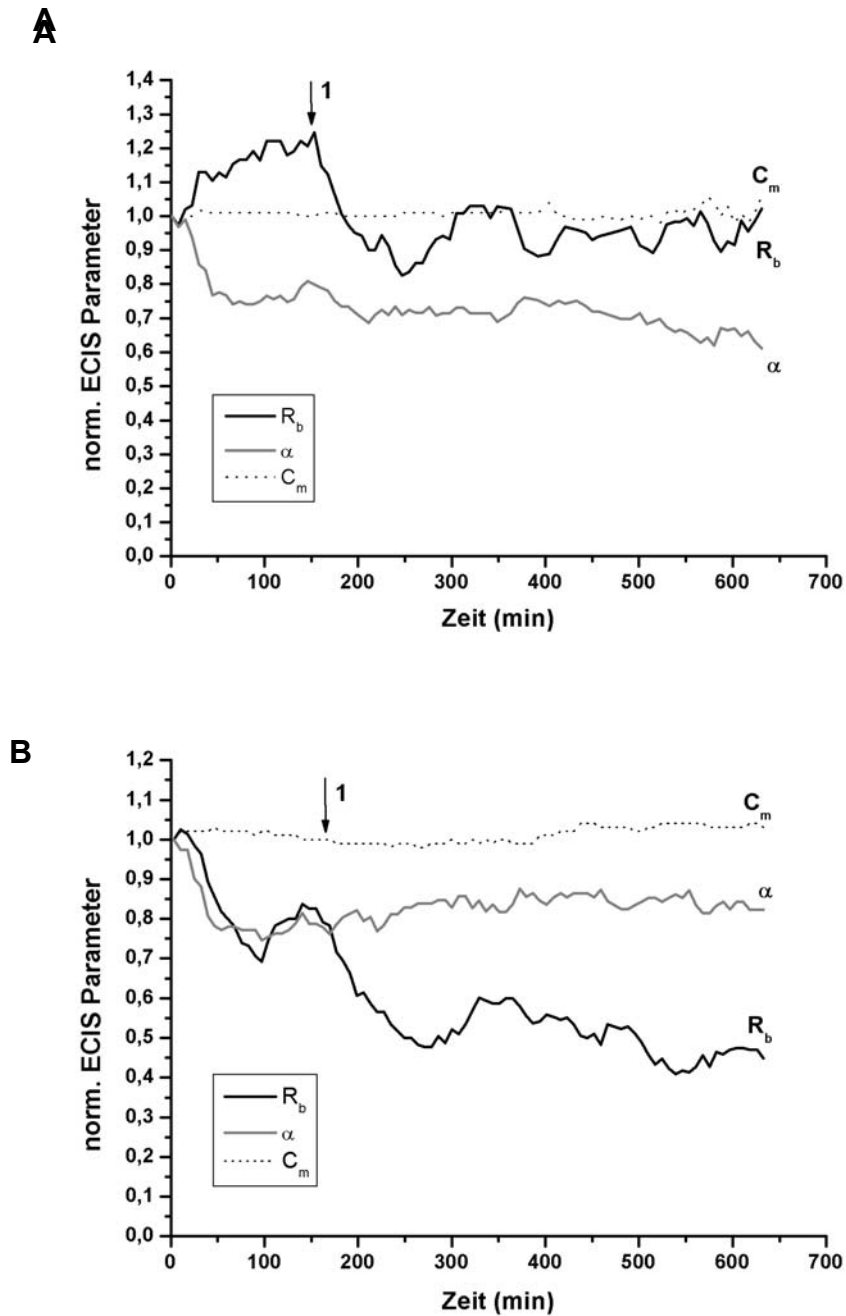


Abb. 3.46 A und B:

Der Einfluss neutrophiler Granulozyten auf die ECIS-Parameter R_b , α und C_m der PBCEC.

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Werte des Zell-Zell-Kontakts (R_b), der Membrankapazität (C_m) und des Zell-Substrat-Kontakts (α) nach der Zugabe der neutrophilen Granulozyten.

A: Zugabe von 300 μl chemisch definiertes Medium 8 h vor der ECIS-Messung und anschließende Zugabe der neutrophilen Granulozyten in 300 μl CDM (1).

B: Vorstimulation der Endothelzellen durch 2 ng/ml TNF- α in 300 μl CDM 8 h vor der ECIS-Messung und anschließende Zugabe der neutrophilen Granulozyten in 300 μl CDM (1).

Die Messungen erfolgten am 7. DIV. Der eingezeichnete mit 1 versehene Pfeil markiert die Zugabe der Immunzellen.

$R_b(0) = 163 \Omega \times \text{cm}^2$ (A), $221 \Omega \times \text{cm}^2$ (B); $\alpha(0) = 49 \Omega^{0,5} \times \text{cm}$ (A), $59 \Omega^{0,5} \times \text{cm}$ (B) und $C_m(0) = 1,0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (A), $1,0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (B) geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$, $\alpha(0)$ und $C_m(0)$ normiert.

Wie die Abbildung 3.46 A zeigt, beeinträchtigte die Interaktion der neutrophilen Granulozyten ohne vorherige Aktivierung der PBCEC mit TNF- α den Wert des den Zell-Zell-Kontakt beschreibenden Parameters R_b nur sehr geringfügig. Der Zell-Substrat-Kontakt (α) und die Membrankapazität (C_m) wurden nicht beeinträchtigt. Die Interaktion der Neutrophilen mit den entzündungsaktivierten PBCEC, dargestellt in Abbildung 3.46 B, verursachte dagegen eine deutliche Schwächung der interendothelialen Kontakte (R_b) und eine sehr geringfügige Senkung des ECIS-Parameter-Wertes α . Allerdings kam es auch hier zu den Primärkultur-typischen Schwankungen, so dass häufig die vor-Aktivierung der PBCEC mit TNF- α keinen verstärkenden Effekt auf die Neutrophilen-bedingte Beeinträchtigung der Parameter R_b und α zeigte (hier nicht dargestellt). Eine definitive Aussage bezüglich des Effekts der Neutrophilen-Interaktion auf die Barrierefunktion der PBCEC unter entzündlichen bzw. nicht entzündlichen Bedingungen ist aus diesem Grund problematisch.

Generell zeigten die ECIS-Messungen, dass die PBCEC-Neutrophilen-Interaktion hauptsächlich die Zell-Zell-Kontakte (R_b) der Endothelzellen beeinflusste. Basierend auf dieser Beobachtung wurden korrelierend immunzytochemische Untersuchungen durchgeführt, die zeigen sollten, inwiefern sich die Beeinträchtigung der interendothelialen Zell-Kontakte (R_b) in der Umstrukturierung einzelner *tight junction*-assoziiierter Proteine widerspiegelte.

Die vergleichende Analyse der ZO-1-Expression, dargestellt in Abbildung 3.47 zeigte, dass weder nach einer 30-minütigen noch nach einer zweistündigen Inkubation der Neutrophilen mit den entzündungsaktivierten bzw. nicht aktivierten PBCEC eine Veränderung der ZO-1-Expression auftrat. Auch die vor der Zugabe der Neutrophilen induzierte Entzündungsaktivierung durch TNF- α von der apikalen oder basolateralen Zellseite ließ keinen Unterschied in der ZO-1-Expression erkennen (s. Abb. 3.47).

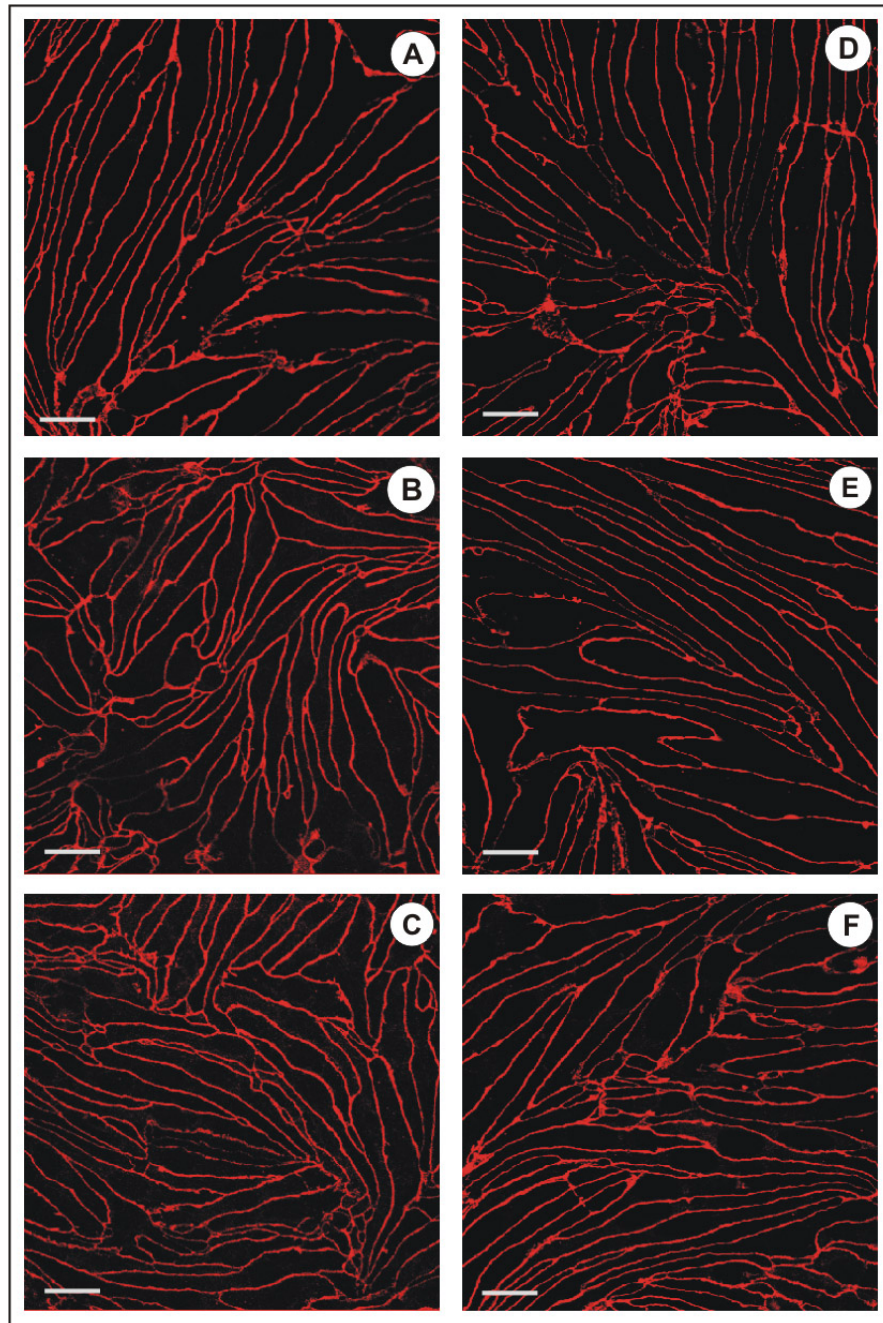


Abb. 3.47 A-F:

Der Einfluss der PBCEC-Neutrophilen-Interaktion auf die ZO-1-Expression der PBCEC.

Einsatz von 1,5 Millionen Neutrophilen je Transwell®-Filter. Die Entzündungsaktivierung der Endothelzellen erfolgte durch eine 4-stündige Inkubation mit 2 ng/ml TNF- α vor Zugabe der neutrophilen Granulozyten.

A: Entzündungsaktivierte PBCEC (2 ng/ml TNF- α / apikale Filterkammer) ohne Neutrophile.

B: Inkubation (30 min) der Neutrophilen mit den nicht aktivierten PBCEC.

C: Inkubation (30 min) der Neutrophilen mit den entzündungsaktivierten PBCEC (2 ng/ml TNF- α , apikale Filterkammer).

D: Inkubation (2 h) der Neutrophilen mit den nicht aktivierten PBCEC.

E: Inkubation (2 h) der Neutrophilen mit den entzündungsaktivierten PBCEC (2 ng/ml TNF- α , apikale Filterkammer).

F: Inkubation (2 h) der Neutrophilen mit den entzündungsaktivierten PBCEC (2 ng/ml TNF- α , basolaterale Filterkammer).

Die immunzytochemische Analyse der PBCEC erfolgte am 7. DIV. Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht 25 μ m.

Die REM-Untersuchungen der Neutrophilen-Interaktion mit den PBCEC, dargestellt in der Abbildung 3.48 und 3.49 zeigten allerdings, dass die *marginal folds* der Endothelzellen im Vergleich zu den PBCEC, die nicht mit den Neutrophilen inkubiert wurden, eine blasenförmig veränderte Struktur aufwiesen (vergl. Abb. 3.48 D-F mit Abb. 3.48 A und B). Die Dauer der Inkubation der Neutrophilen mit den PBCEC ließ dabei keinen zusätzlichen Unterschied in der Ausprägung der Endothelzellgrenzen erkennen. Die vor der Immunzellen-Zugabe durchgeführte Entzündungsaktivierung der PBCEC durch TNF- α von der apikalen oder basolateralen Zellseite beeinträchtigte die morphologische Veränderung der PBCEC nicht zusätzlich (vergl. Abb. 3.48 C-F mit Abb. 3.49 A-D). Die Membranintegrität der Endothelzellen wurde durch den Leukozytenkontakt generell nicht beeinträchtigt und es kam nicht zu einem Ablösen der Endothelzellen vom Substrat, was mit den in Abbildung 3.46 dargestellten ECIS-Analysen des Parameters α in Übereinstimmung steht.

Die Befunde der Endothelzell-Leukozyten-Interaktion der in der ECIS-Analyse dargestellten Parameter R_b , α und C_m und der REM-Untersuchungen der Endothelzell-Morphologie unter denselben Bedingungen wiesen somit eine hohe Übereinstimmung auf, die sich in der ausschließlichen Beeinträchtigung der interendothelialen Zell-Kontaktzone (*marginal folds* / ECIS-Parameter R_b) manifestierte.

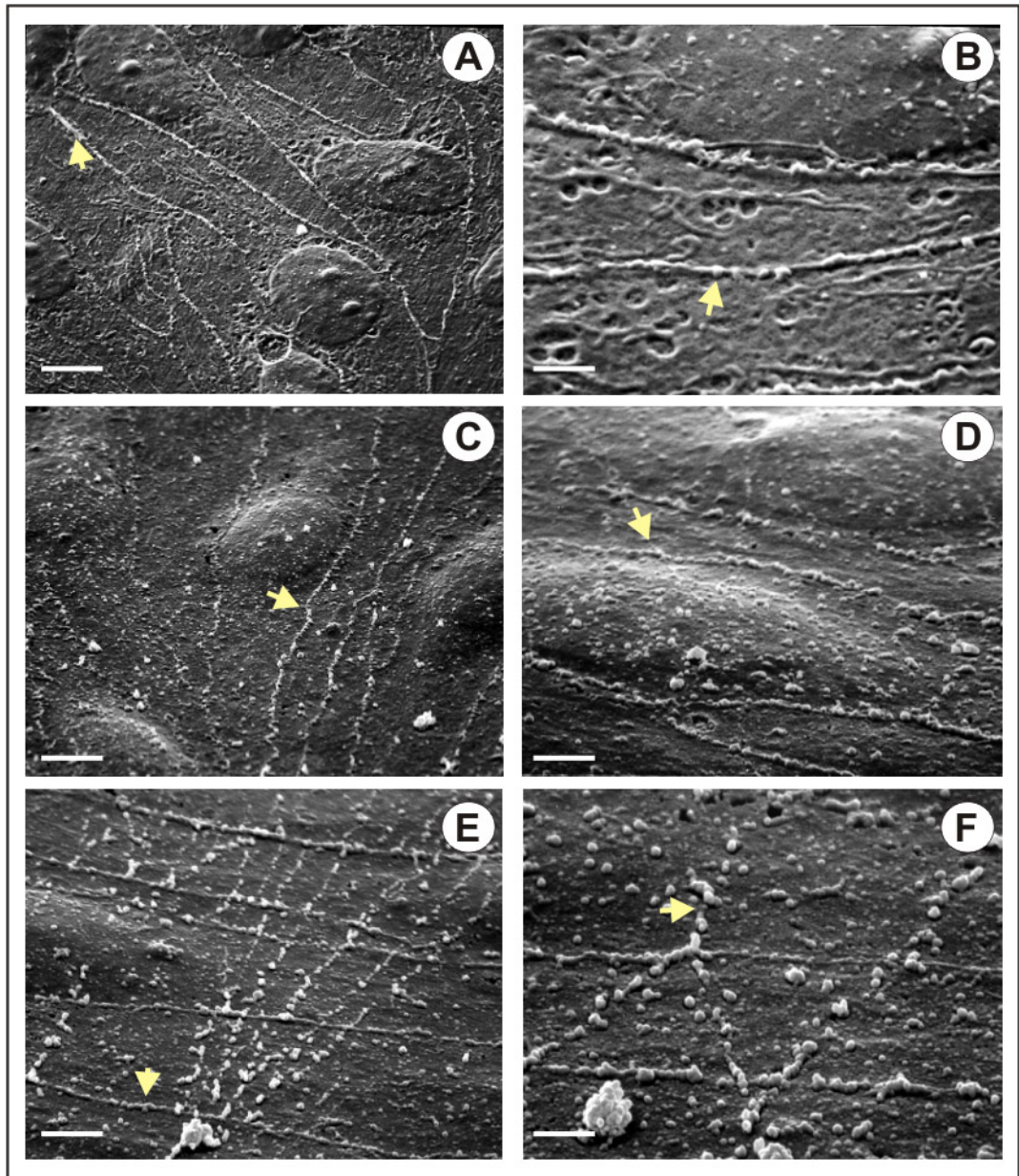


Abb. 3.48 A-F:

REM-Analyse der nicht entzündungsaktivierten PBCEC während der Interaktion mit den Neutrophilen.

Zur Hervorhebung der Endothelzellgrenzen wurden Bildausschnitte ausgewählt, auf denen keine Neutrophilen adhärerten.

A u. B: PBCEC ohne Kontakt mit den neutrophilen Granulozyten.

C u. D: PBCEC nach 20-minütiger Interaktion mit neutrophilen Granulozyten.

E u. F: PBCEC nach 2-stündiger Interaktion mit neutrophilen Granulozyten.

Die Fixierung der PBCEC zwecks der REM-Analysen erfolgte am 7. DIV. Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Die Pfeile verdeutlichen die marginal folds an den Zellgrenzen.

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht in Abbildung A, C und E 3 μm , in Abbildung B, D und F 1,7 μm .

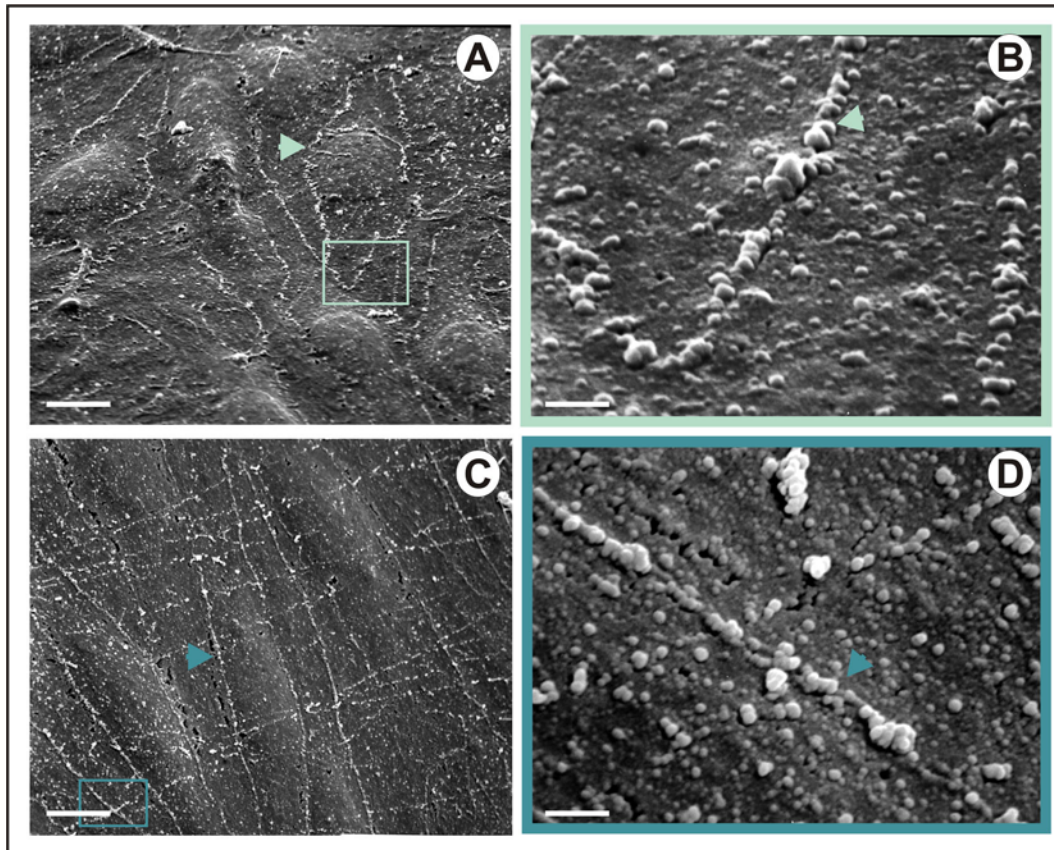


Abb. 3.49 A-D:

REM-Analyse der entzündungsaktivierten PBCEC während der Interaktion mit den Neutrophilen.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der PBCEC während der Interaktion mit neutrophilen Granulozyten. Zur Hervorhebung der Endothelzellgrenzen wurden jeweils Bildausschnitte ohne Neutrophile ausgewählt.

A u. B: PBCEC nach 2-stündiger Interaktion mit neutrophilen Granulozyten. (Entzündungsaktivierung durch TNF- α von der apikalen Filterseite).

C u. D: PBCEC nach 2-stündiger Interaktion mit neutrophilen Granulozyten. (Entzündungsaktivierung durch TNF- α von der basolateralen Filterseite).

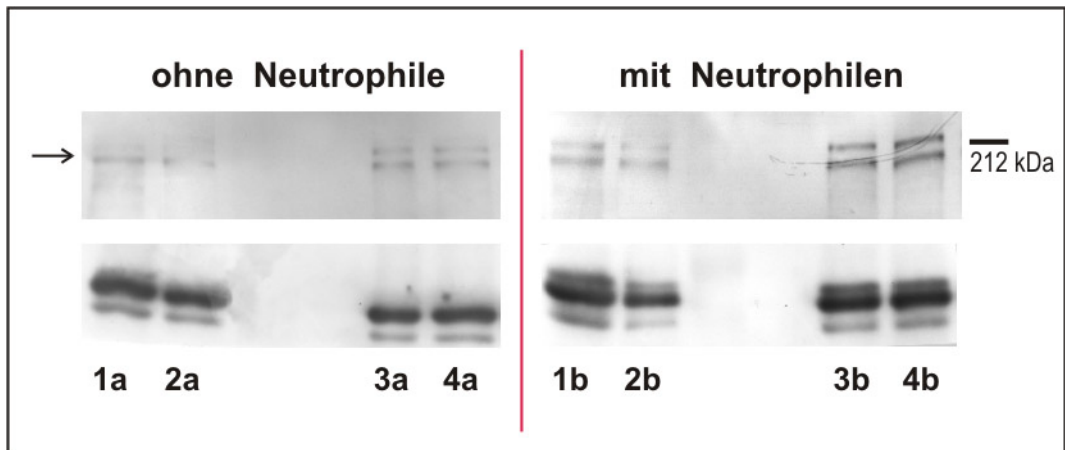
Die Fixierung der PBCEC zwecks der REM-Analyse erfolgte am 7. DIV. Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Die Entzündungsaktivierung der PBCEC erfolgte durch eine 4-stündige Inkubation der Endothelzellen mit 2 ng/ml TNF- α . (PBCEC ohne Neutrophilen-Kontakt, s. Abbildung 38A und B). Die Pfeile verdeutlichen die marginal folds an den Zellgrenzen.

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht in Abbildung A und B 6 μ m, in Abbildung C und D 0,7 μ m.

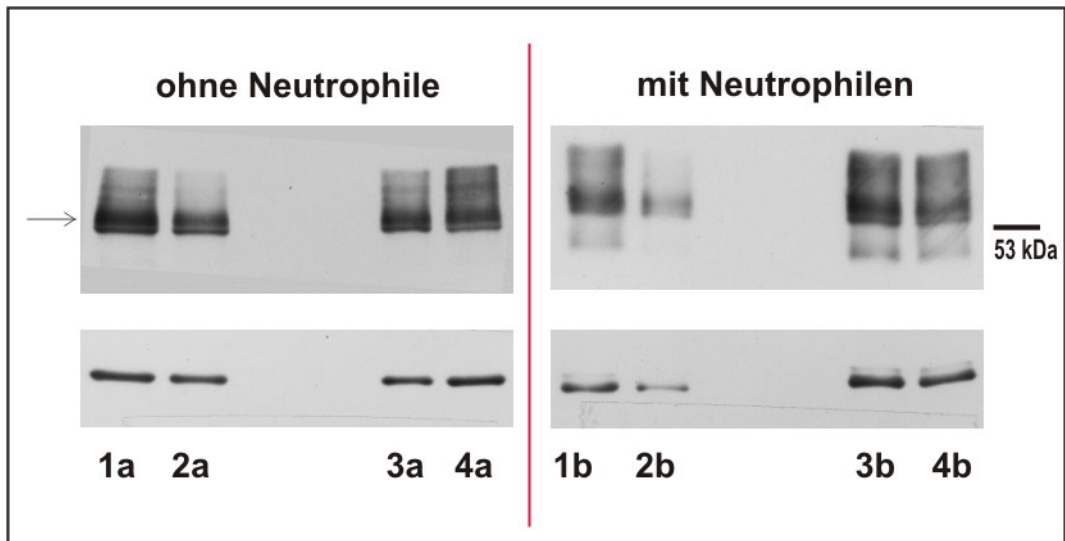
Inwiefern die durch die Neutrophilen-Interaktion der in den REM- und den ECIS-Untersuchungen nachgewiesene Beeinträchtigung der interendothelialen Zell-Kontakte der PBCEC, auch quantitativ bestätigt werden konnte, sollte mit Hilfe von Immunoblot-Analysen gezeigt werden.

Wie in Abbildung 3.50 zu sehen ist, wurde durch die Inkubation der neutrophilen Granulozyten mit den entzündungsaktivierten bzw. nicht aktivierten PBCEC die Expression des ZO-1 und des Claudin-5-Proteins quantitativ nicht verändert (s. Abb. 3.50 A und C). Das Occludin-Protein der PBCEC wurde dagegen unabhängig von der Entzündungsaktivierung der Endothelzellen durch die Interaktion mit den Neutrophilen

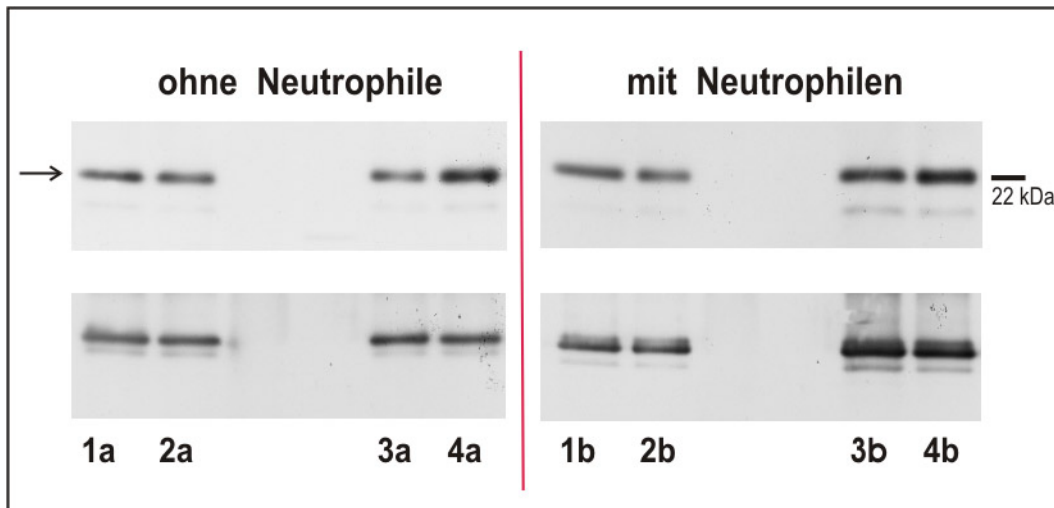
proteolysiert, was die Abtrennung der Occludin-Banden leichteren Molekulargewichts, dargestellt in der Abbildung 3.50 B (Blot-Spur1b-4b) zu sehen ist. Aufgrund der hohen Proteasen-Aktivität der Neutrophilen, die sogar speziellen Proteasen-Inhibitoren standhalten und noch nach der Fixierung der Zellen aktiv sein können, ist die Beobachtung einer proteolytischen Spaltung der untersuchten Proteine generell mit Vorsicht zu interpretieren.



A: ZO-1;



B: Occludin:



C: Claudin-5:

Abb 3.50 A-C:

Western-Blot-Analyse der tight junction-assoziierten Proteine ZO-1, Occludin und Claudin-5 nach Inkubation der aktivierten bzw. nicht aktivierten PBCEC mit neutrophilen Granulozyten.

1a-4a: ohne Neutrophile:

1a: PBCEC kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC, ohne TNF- α und ohne Neutrophile.

2a: PBCEC kultiviert in CDM ohne HC, 2 ng/ml TNF- α , ohne Neutrophile.

3a: PBCEC kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC, 2 ng/ml TNF- α , ohne Neutrophile.

4a: PBCEC kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC, 10 ng/ml TNF- α , ohne Neutrophile.

1b-4b: mit Neutrophilen:

1b: PBCEC kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC, mit Neutrophilen.

2b: PBCEC kultiviert in CDM ohne HC, 2 ng/ml TNF- α , mit Neutrophilen.

3b: PBCEC kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC, 2 ng/ml TNF- α , mit Neutrophilen.

4b: PBCEC kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC, 10 ng/ml TNF- α , mit Neutrophilen.

Die Western-Blot-Analyse erfolgte am 7. DIV der PBCEC. Die Inkubation mit TNF- α erfolgte 4 h vor der Neutrophilen-Zugabe. Die Inkubation der Neutrophilen mit den PBCEC erfolgte 2 h. Der Vimentin-Nachweis (Pfeil) diente dem Abgleich der aufgetragenen Proteinmenge, da Vimentin unter allen Versuchsbedingungen von den PBCEC auf gleichem Niveau exprimiert wird. Gesamtproteinmenge / Geltasche: 2 μ g. Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC).

Wie die immunzytochemischen Analysen der *tight junction*-assoziierten Proteine Claudin-5, Occludin und ZO-1, als auch die impedanzspektroskopischen Untersuchungen und REM-Aufnahmen zeigten, schien es keine Rolle zu spielen, ob die PBCEC vor der Applikation der neutrophilen Granulozyten entzündungsaktiviert wurden oder nicht. Interessanterweise ergab der immunzytochemische Nachweis des Entzündungsmarkers E-Selektin, dargestellt in der Abbildung 3.51, dass der alleinige Kontakt der Neutrophilen mit den Endothelzellen eine Entzündungsreaktion in den PBCEC auslöste.

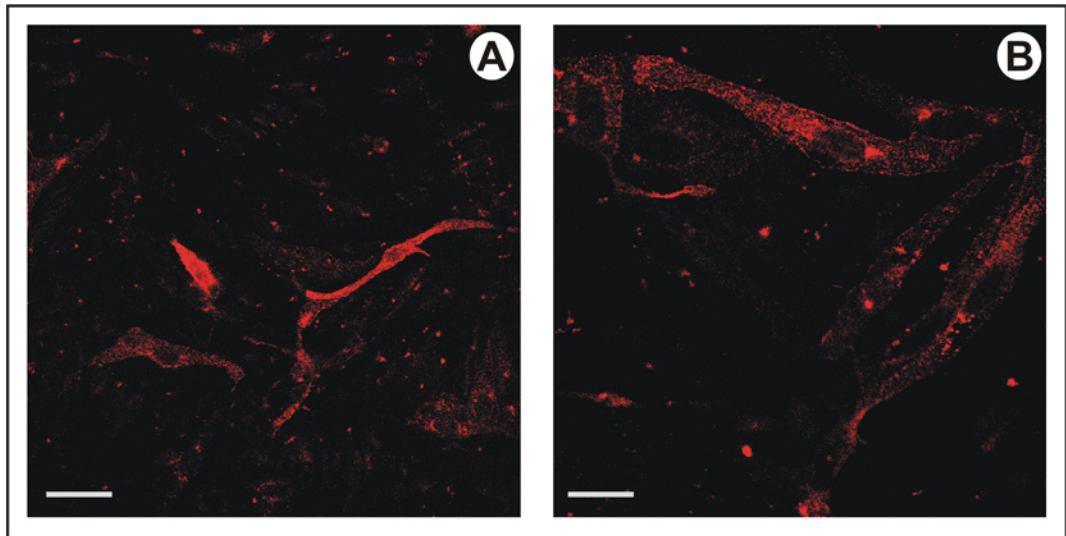


Abb. 3.51 A und B:

Immunzytochemischer Nachweis des E-Selektins der PBCEC nach der Interaktion mit neutrophilen Granulozyten.

A u. B: Applikation von 6 Millionen Neutrophilen je Transwell®-Filter.

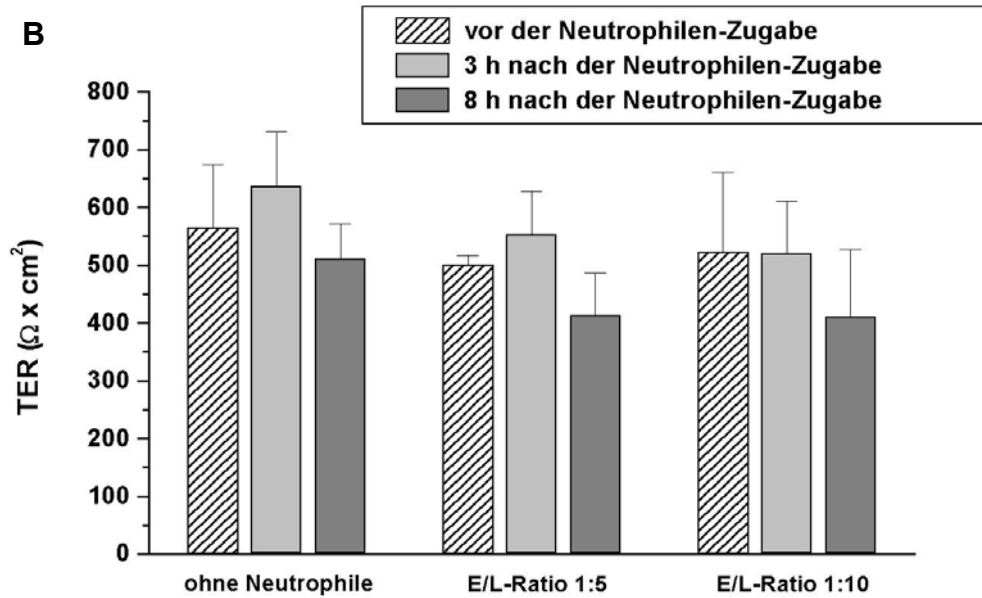
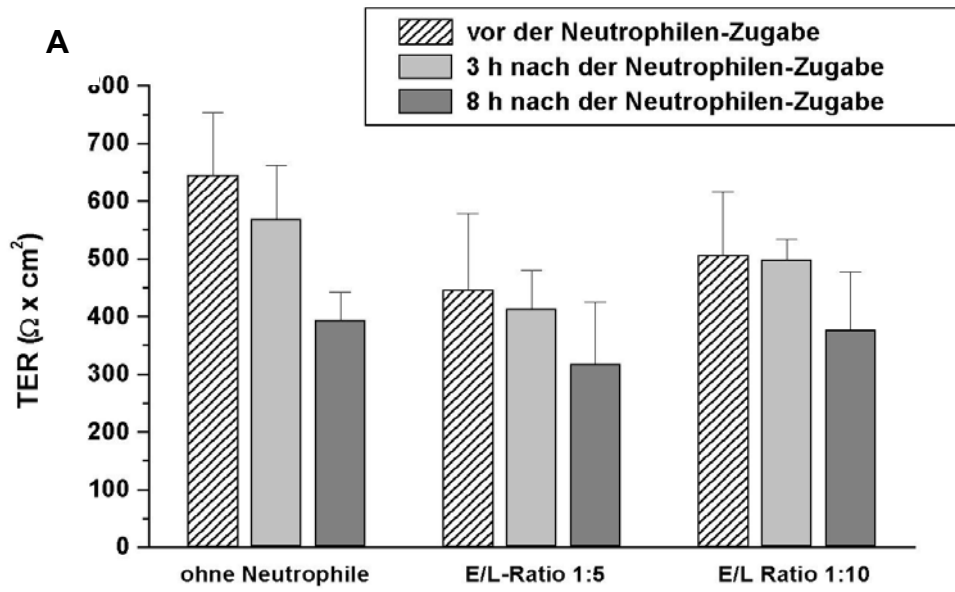
Die immunzytochemische Analyse erfolgte am 7. DIV der PBCEC. Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium mit Zusatz von 55 nM HC. Inkubation der Neutrophilen mit dem Endothelzellen: 2 h.

Vergößerung: der Maßstabsbalken entspricht in Abbildung A 25 µm und in B 15 µm.

3.2.2.1 Der Einfluss der E/L-Ratio (Endothelzell/ Leukozyten-Ratio)

In den bisher aufgeführten Experimenten wurde der Einfluss der Neutrophilen auf die PBCEC ungeachtet ihrer eingesetzten Zellzahl untersucht. Im Folgenden sollte gezielt geprüft werden, inwiefern die applizierte Leukozyten-Zellzahl einen Effekt auf die PBCEC ausübte.

Die in Abbildung 3.52 und 3.53 dargestellten transendothelialen Widerstandsmessungen demonstrieren deutlich, dass der Einfluss der E/L-Ratio bei der Untersuchung der Endothelzell-Leukozyten-Interaktion von entscheidender Bedeutung war.



2 ng TNF- α ap

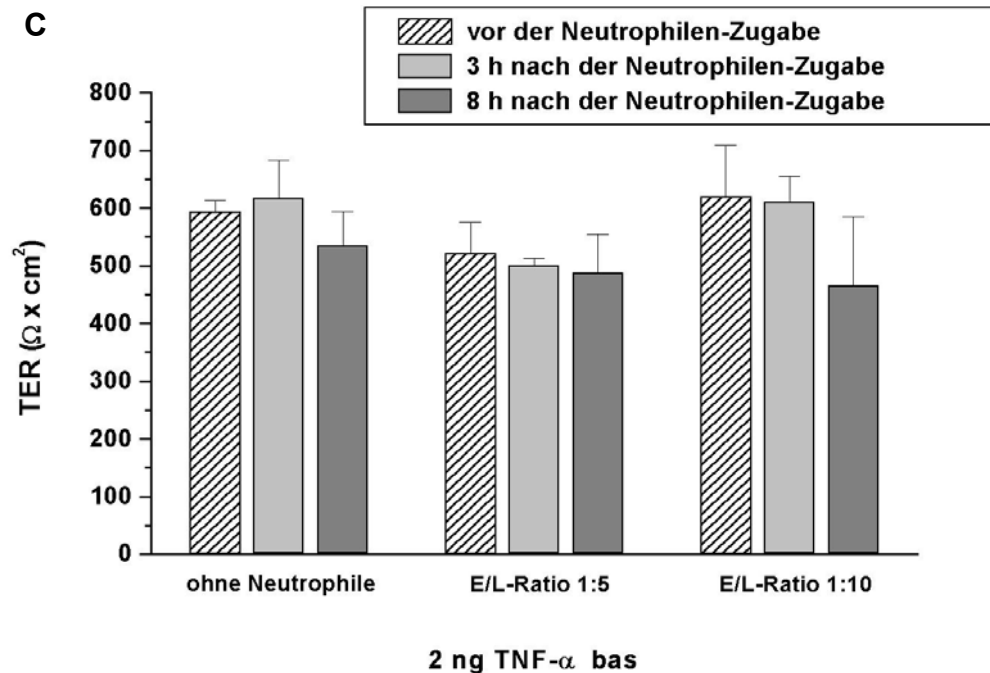


Abb. 3.52 A-C:

Der Einfluss der Neutrophilen auf den TER der entzündungsaktivierten PBCEC in Abhängigkeit von der E/L-Ratio.

A: Bestimmung des TER nach Applikation der Neutrophilen.

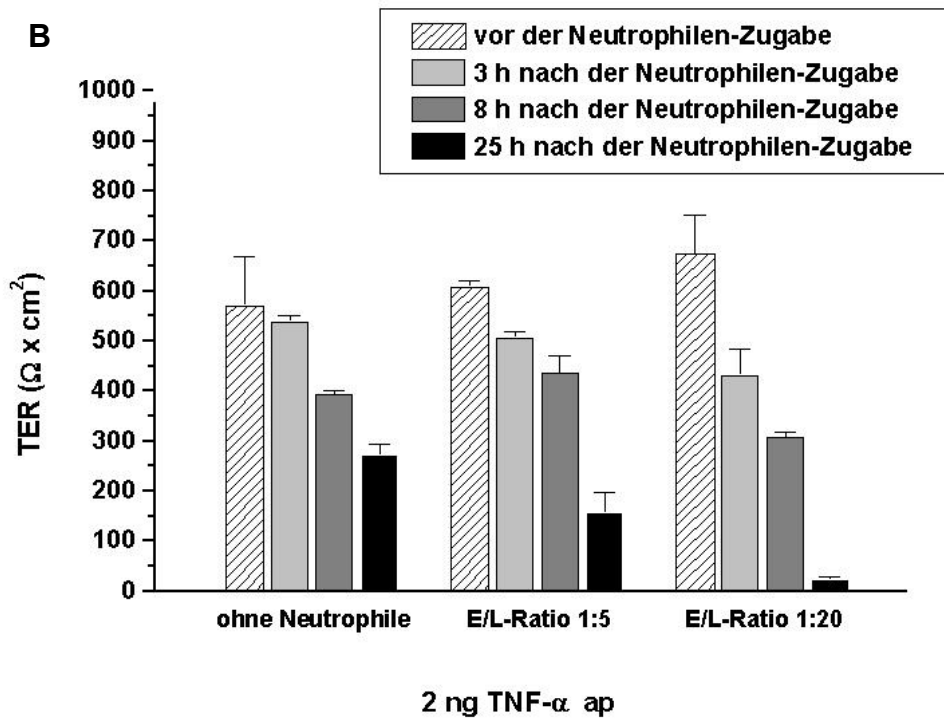
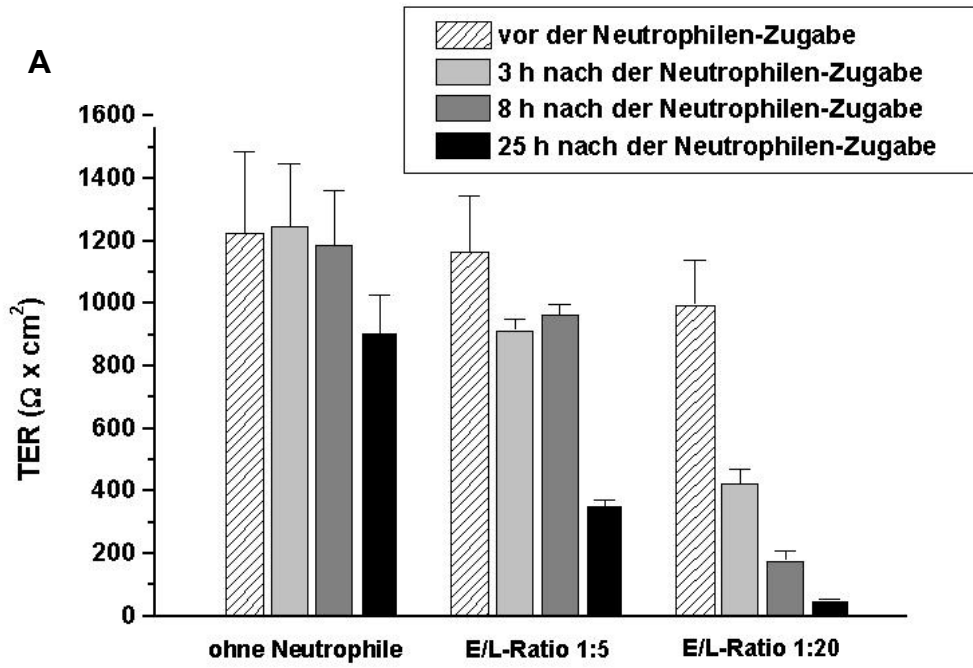
B: Bestimmung des TER der entzündungsaktivierten PBCEC nach Applikation der Neutrophilen. (TNF- α -Zugabe in die apikale (ap) Filterkammer)

C: Bestimmung des TER der entzündungsaktivierten PBCEC nach Applikation der Neutrophilen. (TNF- α -Zugabe in die basolaterale (bas) Filterkammer)

Die Messungen des TERs 3 h und 8 h nach Immunzell-Applikation erfolgten am 7. DIV. Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Die Aktivierung der PBCEC erfolgte durch eine 4-stündige Inkubation mit 2 ng/ml TNF- α , das in das apikale Filterkompartiment appliziert wurde.

Die TER-Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt (n = 10).

Bei einer E/L-Ratio von 1:5 bzw. 1:10 kam es weder nach 3 noch nach 8 Stunden zu einer signifikanten Abnahme des transendothelialen Widerstands (s. Abb. 3.52). Dagegen wurde der Widerstand bei einer E/L-Ratio von 1:20 bereits nach 3 Stunden signifikant gesenkt, gleichgültig, ob die PBCEC zuvor mit TNF- α entzündungsstimuliert wurden oder nicht (s. auch Abb. 3.53).



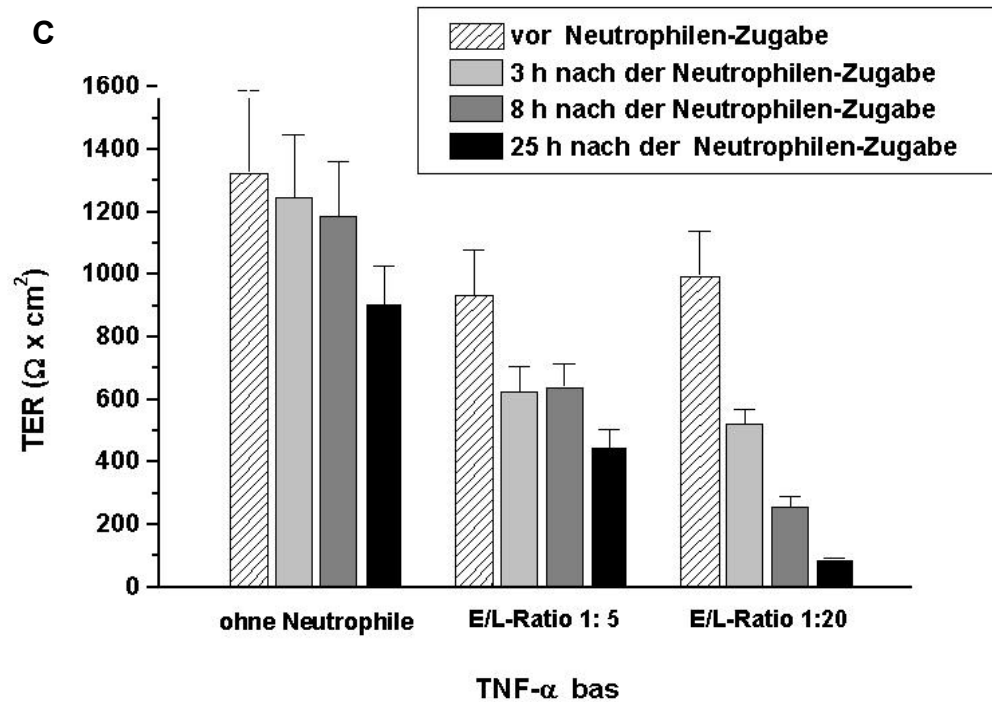


Abb. 3.53:

Einfluss der Neutrophilen auf den TER der aktivierten PBCEC in Abhängigkeit von der E/L-Ratio.

A: Bestimmung des TERs nach Applikation der Neutrophilen.

B: Bestimmung des TERs der entzündungsaktivierten PBCEC nach Applikation der Neutrophilen. (TNF- α -Zugabe in die apikale Filterkammer)

C: Bestimmung des TERs der entzündungsaktivierten PBCEC nach Applikation der Neutrophilen. (TNF- α -Zugabe in die basolaterale Filterkammer)

Die Messungen des transendothelialen Widerstands 3 h und 8 h nach der Immunzell-Applikation erfolgten am 7. DIV. Die Messung 25 h nach der Neutrophilen-Applikation erfolgte am 8. DIV. Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Die Aktivierung der PBCEC erfolgte durch eine 4-stündige Inkubation mit 2 ng/ml TNF- α , das in die apikale (ap) bzw. basolaterale (bas) Filterkammer appliziert wurde.

Die TER-Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt ($n = 10$).

Die Ergebnisse der TER-Messung zeigten eindeutig, dass in Abhängigkeit von der Höhe der E/L-Ratio der TER gesenkt wurde. Dieser offensichtliche Einfluss der applizierten Neutrophilen-Anzahl auf die interendothelialen Zell-Kontakte wurde im Detail durch immunzytochemische Untersuchungen analysiert. Diese sollten Aufschluss darüber geben, inwiefern die E/L-Ratio einen Einfluss auf einzelne *tight junction*-assoziierten Proteine der PBCEC ausübte.

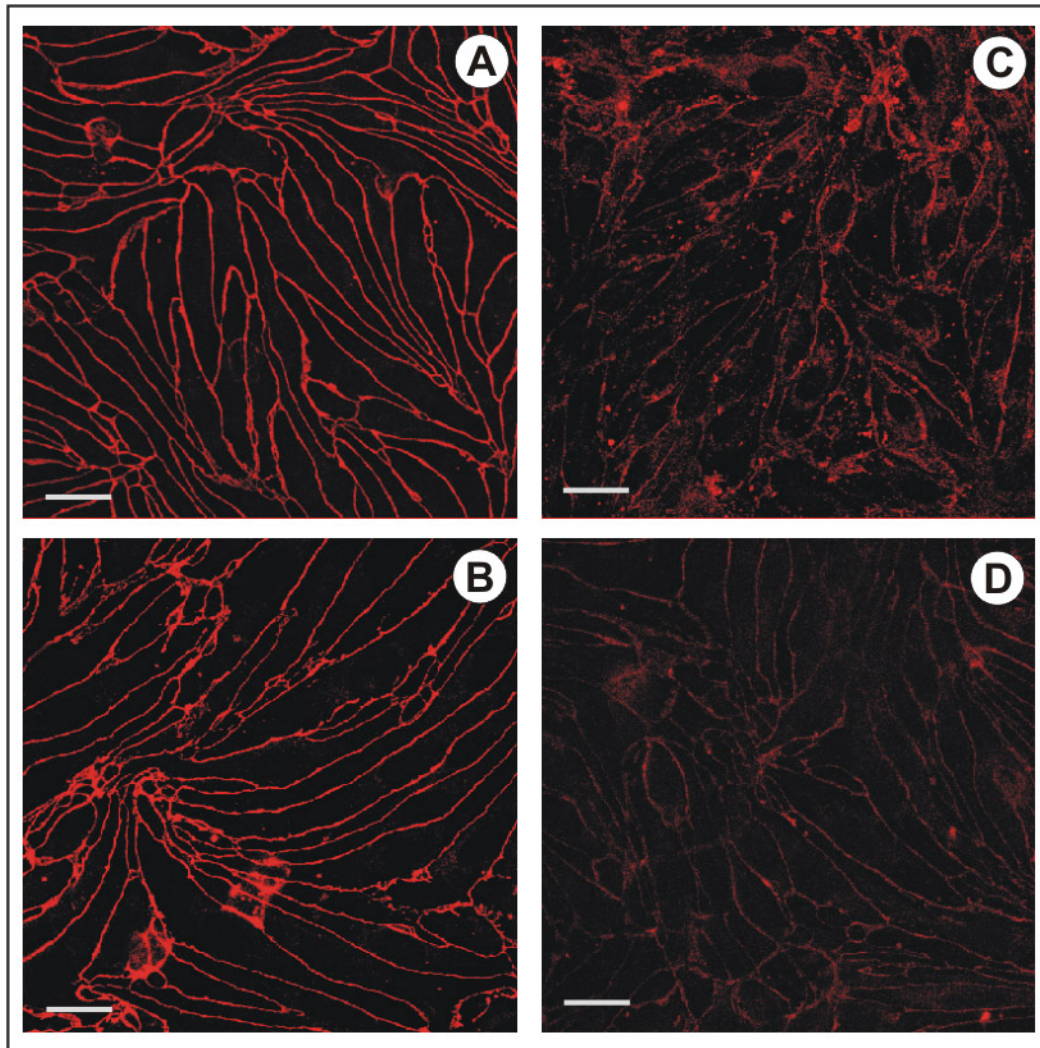


Abb. 3.54 A-D:

Der Einfluss der E/L-Ratio auf das ZO-1-Protein der nicht entzündungsaktivierten PBCEC.

A: PBCEC ohne neutrophile Granulozyten.

B: Applikation von 1,5 Millionen Neutrophile je Transwell®-Filter (E/L-Ratio: 1:5).

C: Applikation von 6 Millionen Neutrophile je Transwell®-Filter (E/L-Ratio: 1:20).

D: Applikation von 6 Millionen Neutrophile je Transwell®-Filter (E/L-Ratio: 1:20).

Die immunzytochemische Analyse der PBCEC wurde am 7. DIV der PBCEC durchgeführt. Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Inkubationsdauer der Neutrophilen mit den PBCEC: 2 h.

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht 25 µm.

Die Abbildung 3.54 demonstriert, dass die ZO-1-Expression der nicht entzündungsaktivierten PBCEC durch eine 2-stündige Inkubation mit den neutrophilen Granulozyten im E/L-Verhältnis von 1:5 nicht beeinflusst wurde (vergl. Abb. 3.54 A und B). Im Vergleich dazu zeigten die cerebralen Endothelzellen nach einer zweistündigen Inkubation mit Neutrophilen im E/L-Verhältnis von 1:20 eine deutlich herabgesenkte ZO-1-Expression, was die schwache Ausprägung der Immunfluoreszenz in Abbildung 3.54 C und D verdeutlicht. Interessant war vor allem die in Abbildung 3.54 C sehr deutlich erkennbare Umverteilung der ZO-1-Expression von den Zellgrenzen in Richtung des Zellkerns.

Nach der Entzündungsaktivierung der PBCEC mit 2 ng/ml TNF- α wurde ebenfalls erst durch die Neutrophilen-Endothelzell-Interaktion in einer E/L-Ratio von 1:20 eine deutliche Verringerung der ZO-1-Expression nachgewiesen. Dabei war es unerheblich, ob die Aktivierung der Endothelzellen durch TNF- α von der apikalen oder basolateralen Seite erfolgte (s. Abb. 3.55). Wie besonders in der Abbildung 3.55 F deutlich erkennbar ist, kam es durch die Interaktion der Neutrophilen mit den PBCEC in einer E/L-Ratio von 1:20 unter entzündlichen Bedingungen ebenfalls zu einer Verlagerung der ZO-1-Expression von den Zellgrenzen in Richtung des Zellkerns. Die Fluoreszenzfärbung wurde zudem um ein Erhebliches in ihrer optisch sichtbaren Intensität geschwächt (vergl. Abb. 3.55 A-C mit Abb. 3.55 D-F).

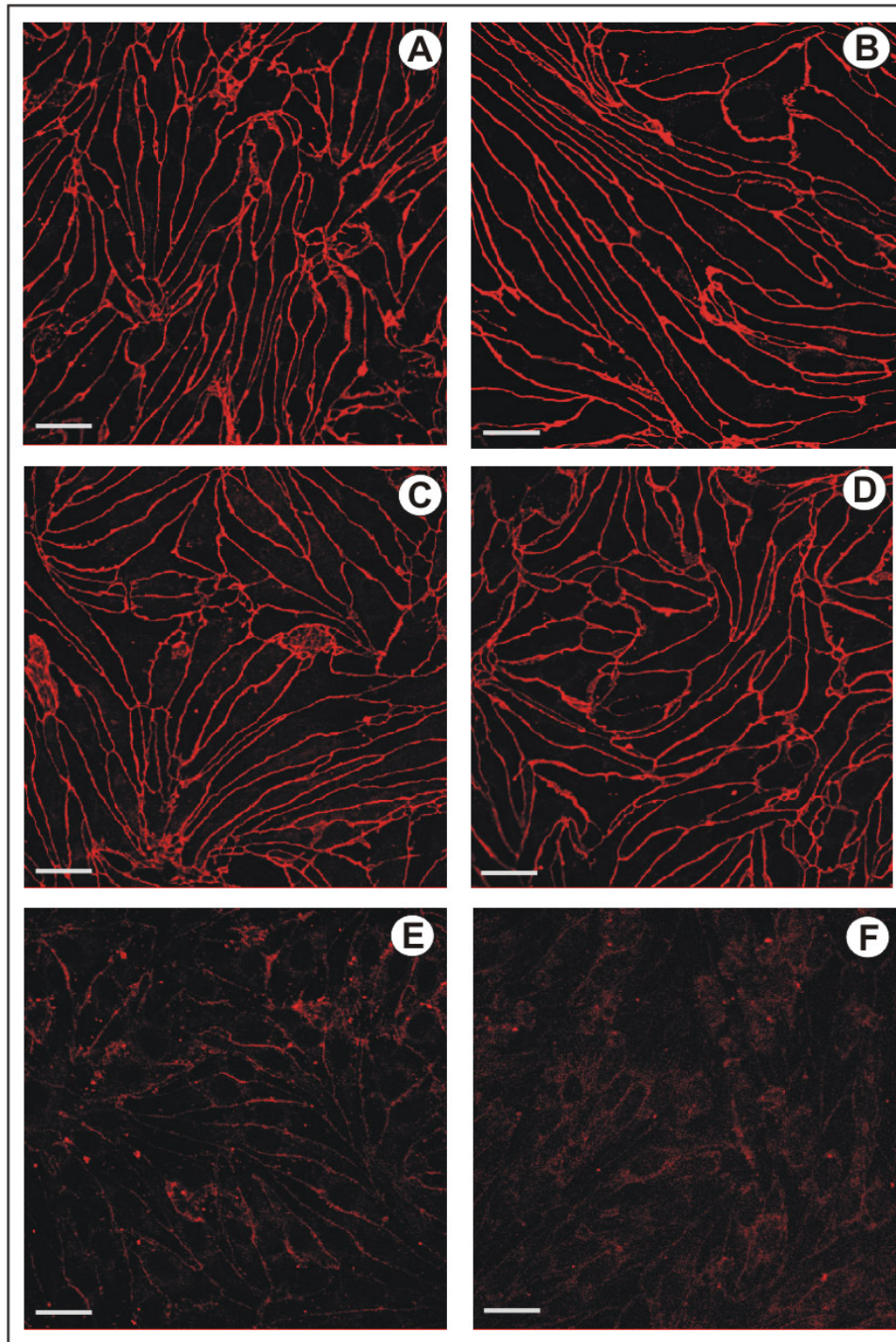


Abb. 3.55 A-F:

Der Einfluss der E/L-Ratio auf die ZO-1-Expression der entzündungsaktivierten PBCEC.

A : PBCEC ohne Neutrophile (TNF- α apikal).

B: PBCEC ohne Neutrophile (TNF- α basolateral).

C: 1,5 Millionen Neutrophile (E/L-Ratio: 1:5), PBCEC entzündungsaktiviert (TNF- α apikal).

D: 1,5 Millionen Neutrophile (E/L-Ratio: 1:5), PBCEC entzündungsaktiviert (TNF- α basolateral).

E: 6 Millionen Neutrophile (E/L-Ratio: 1:20), PBCEC entzündungsaktiviert (TNF- α apikal).

F: 6 Millionen Neutrophile (E/L-Ratio: 1:20), PBCEC entzündungsaktiviert (TNF- α basolateral).

Die immunzytochemische Analyse der PBCEC wurde am 7. DIV der PBCEC durchgeführt. Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Die Entzündungsaktivierung erfolgte durch Applikation von 2ng/ml TNF- α 4 Stunden vor Zugabe der Neutrophilen zu den PBCEC. Inkubation der Neutrophilen mit dem Endothelzellen: 2 h. Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht 25 μ m.

Auch die immunzytochemischen Untersuchungen des *tight junction*-assoziierten Proteins Claudin-5, dargestellt in Abbildung 3.56 zeigten, dass die Inkubation der PBCEC mit den neutrophilen Granulozyten im E/L-Verhältnis von 1:20 eine signifikante Abnahme der untersuchten Proteinexpression bewirkte. Nach der Interaktion der neutrophilen Granulozyten mit dem Endothelzell-Monolayer in einer E/L Ratio von 1:5 wurde die Claudin-5-Expression dagegen nicht reduziert. Auch hier war es unerheblich, ob das cerebrale Endothel zuvor von der apikalen oder basolateralen Seite mit TNF- α entzündungsstimuliert wurde (s. Abb. 3.57).

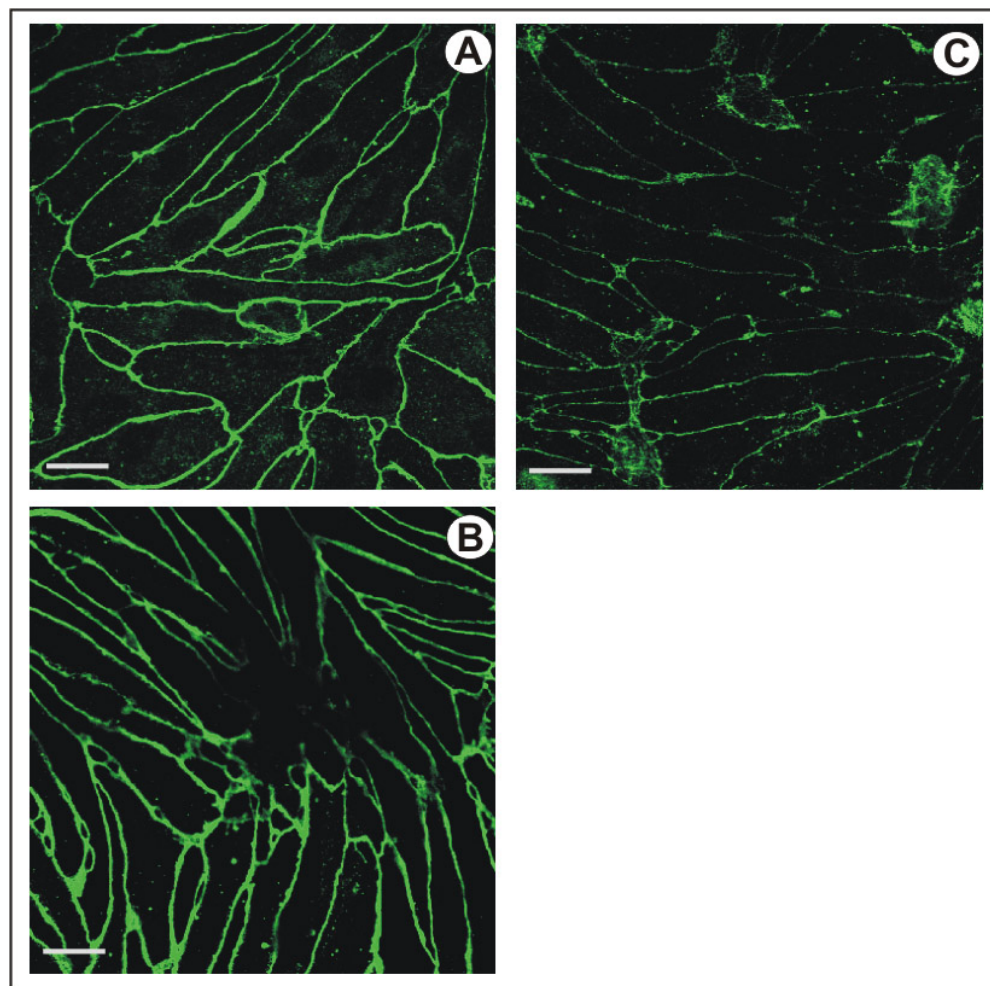


Abb. 3.56 A-C:

Der Einfluss der E/L-Ratio auf die Claudin-5-Expression der nicht entzündungsaktivierten PBCEC.

A: PBCEC ohne neutrophile Granulozyten.

B: Applikation von 1,5 Millionen Neutrophilen je Transwell®-Filter (E/L-Ratio: 1:5).

C: Applikation von 6 Millionen Neutrophilen je Transwell®-Filter (E/L-Ratio: 1:20).

Die immunzytochemische Analyse der PBCEC erfolgte am 7. DIV. Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Inkubationsdauer der Neutrophilen mit den PBCEC: 2 h.

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht 25 μ m.

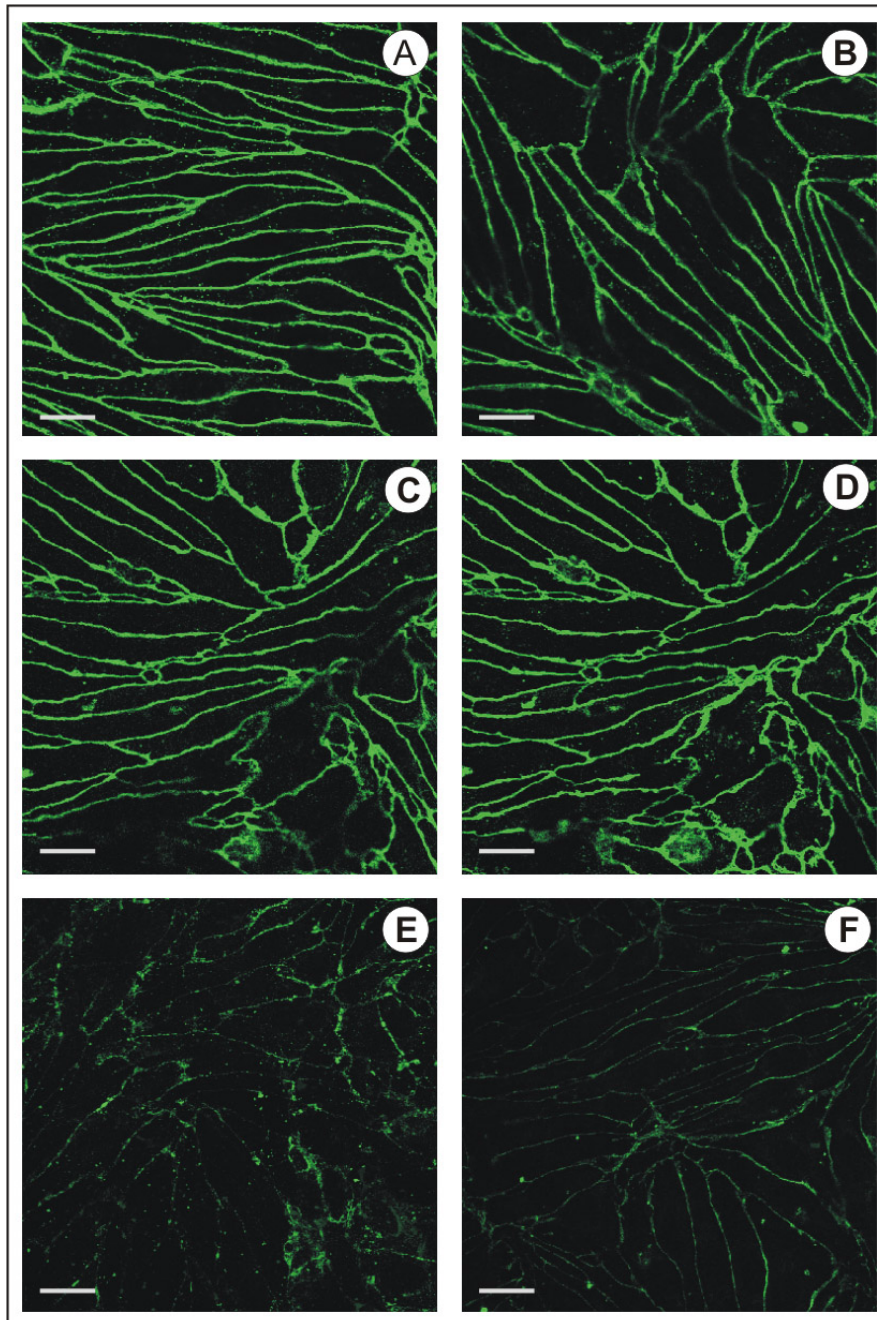


Abb. 3.57 A-F:

Der Einfluss der E/L-Ratio auf die Claudin-5-Expression der entzündungsaktivierten PBCEC.

A: PBCEC ohne Neutrophilen-Kontakt, (TNF- α *apikal*).

B: PBCEC ohne Neutrophilen-Kontakt, (TNF- α *basolateral*).

C: Applikation von 1,5 Millionen Neutrophilen (E/L-Ratio: 1:5) zu den entzündungsaktivierten PBCEC (TNF- α *apikal*).

D: Applikation von 1,5 Millionen Neutrophilen (E/L-Ratio: 1:5) zu den entzündungsaktivierten PBCEC (TNF- α *basolateral*).

E: Applikation von 6 Millionen Neutrophilen (E/L-Ratio: 1:20) zu den entzündungsaktivierten PBCEC (TNF- α *apikal*).

F: Applikation von 6 Millionen Neutrophilen (E/L-Ratio: 1:20) zu den entzündungsaktivierten PBCEC (TNF- α *basolateral*).

Die immunzytochemische Analyse der PBCEC erfolgte am 7. DIV. Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Die Entzündungsaktivierung erfolgte durch Applikation von 2 ng/ml TNF- α 4 Stunden vor Zugabe der Neutrophilen zu den PBCEC. Inkubation der Neutrophilen mit dem Endothelzellen: 2 h.

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht 25 μ m.

Die Occludin-Expression wurde durch die Inkubation der PBCEC mit Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:5 weder unter normalen noch unter entzündungsaktivierten Bedingungen gestört. Die Applikation der Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:20 schwächte die Occludin-Expression allerdings wesentlich geringfügiger als die ZO-1 bzw. die Claudin-5-Expression (s. Abb. 3.58 und 3.59).

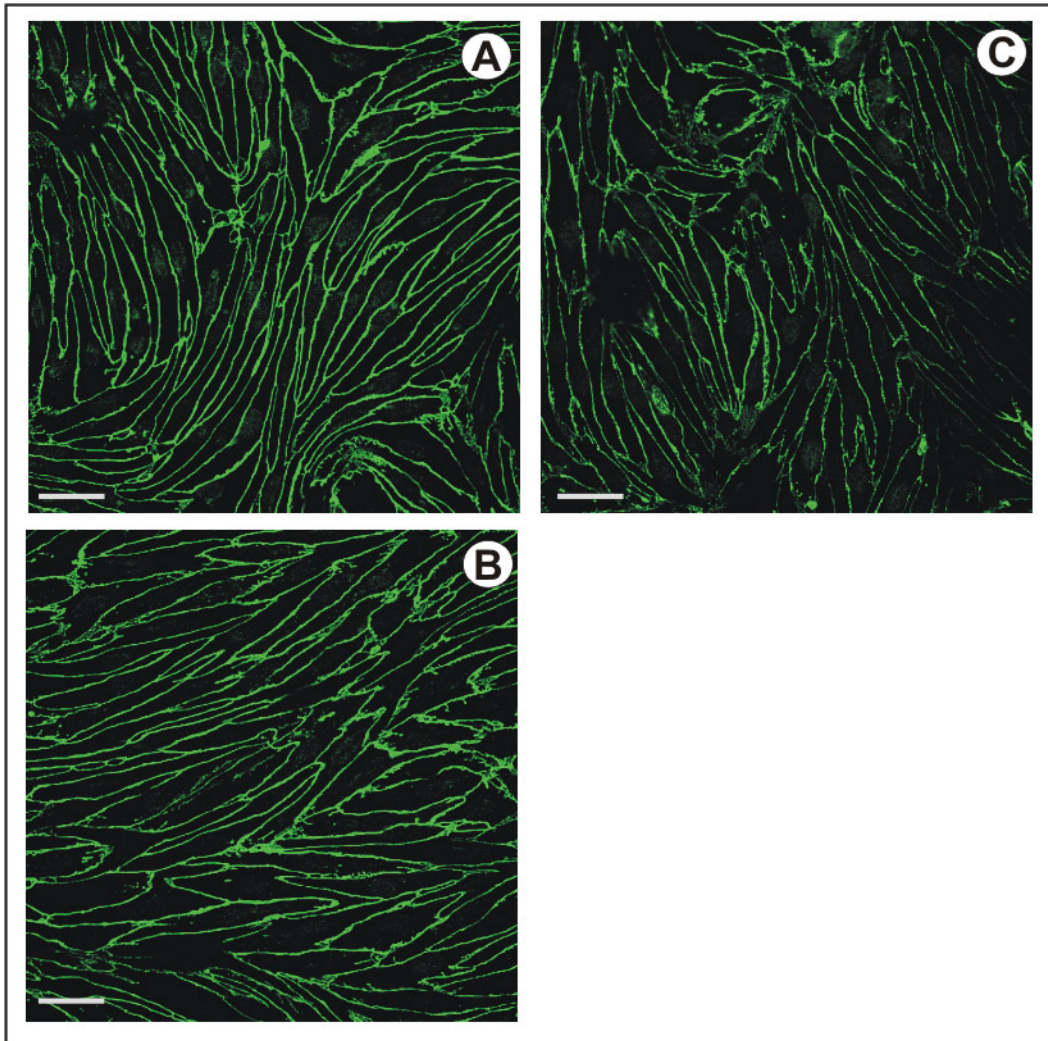


Abb. 3.58 A-C:

Der Einfluss der E/L-Ratio auf die Occludin-Expression der nicht entzündungsaktivierten PBCEC.

A: PBCEC ohne neutrophile Granulozyten.

B: Applikation von 1,5 Millionen Neutrophilen je Transwell®-Filter (E/L-Ratio: 1:5).

C: Applikation von 6 Millionen Neutrophilen je Transwell®-Filter (E/L-Ratio: 1:20).

Die immunzytochemische Analyse der PBCEC erfolgte am 7. DIV. Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Inkubationsdauer der Neutrophilen mit den PBCEC: 2 h.

Vergößerung: der Maßstabsbalken entspricht 25 µm.

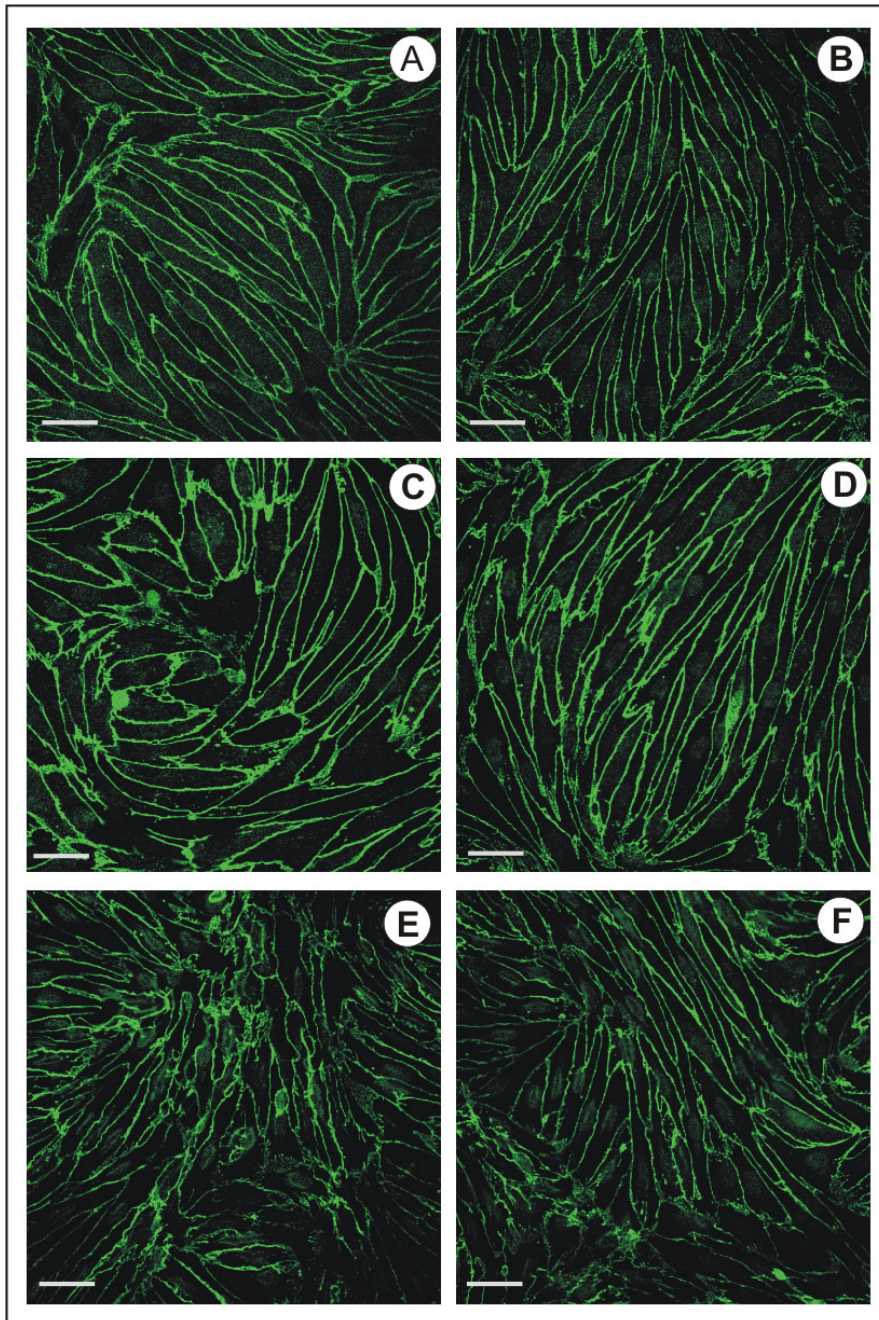


Abb. 3.59 A-F:

Der Einfluss der E/L-Ratio auf die Occludin-Expression der entzündungsaktivierten PBCEC.

A: PBCEC ohne Neutrophilen-Kontakt, (TNF- α apikal).

B: PBCEC ohne Neutrophilen-Kontakt, (TNF- α basolateral).

C: Applikation von 1,5 Millionen Neutrophilen (E/L-Ratio: 1:5) zu den entzündungsaktivierten PBCEC (TNF- α apikal).

D: Applikation von 1,5 Millionen Neutrophilen (E/L-Ratio: 1:5) zu den entzündungsaktivierten PBCEC (TNF- α basolateral).

E: Applikation von 6 Millionen Neutrophilen (E/L-Ratio: 1:20) zu den entzündungsaktivierten PBCEC (TNF- α apikal).

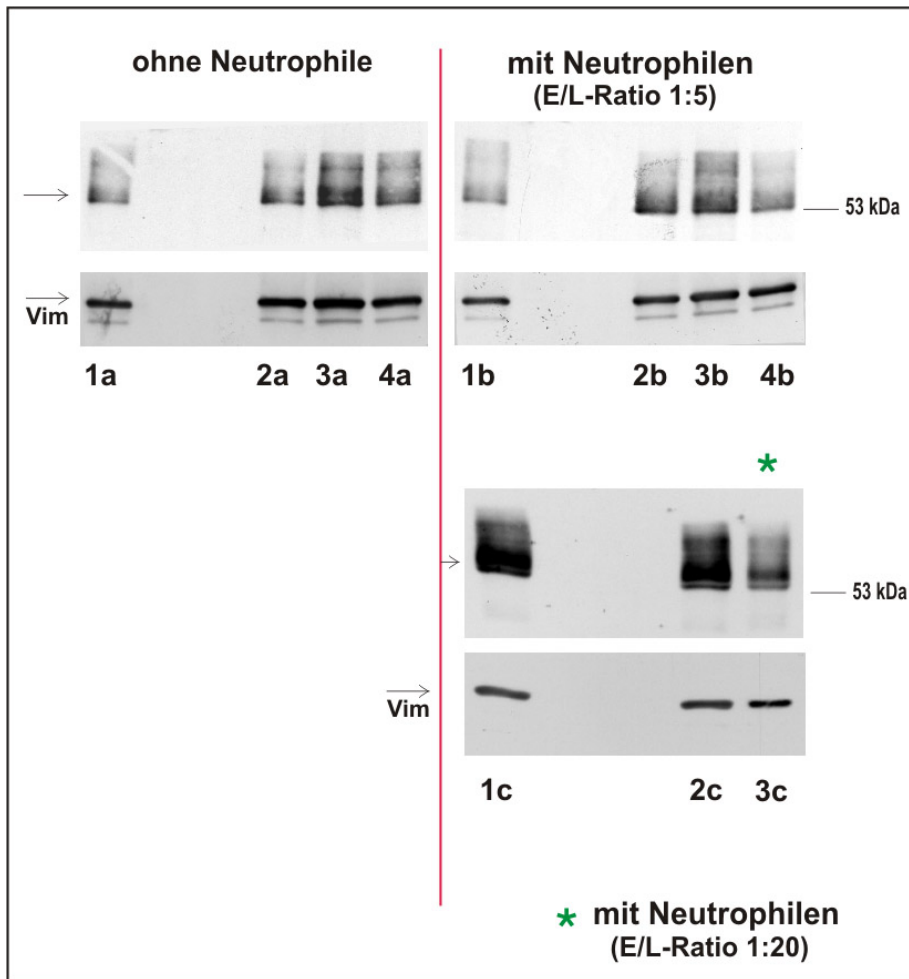
F: Applikation von 6 Millionen Neutrophilen (E/L-Ratio: 1:20) zu den entzündungsaktivierten PBCEC (TNF- α basolateral).

Die immunzytochemische Analyse der PBCEC erfolgte am 7. DIV. Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Die Entzündungsaktivierung erfolgte durch Applikation von 2 ng/ml TNF- α 4 Stunden vor Zugabe der Neutrophilen zu den PBCEC. Inkubation der Neutrophilen mit den Endothelzellen: 2 h.

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht 25 μ m.

Um die immunzytochemischen Befunde des Einflusses der E/L-Ratio auf die PBCEC quantitativ zu bestätigen, wurden Immunoblot-Untersuchungen durchgeführt, in denen die Occludin- und die Claudin-5-Expression nach der Inkubation der Neutrophilen in unterschiedlichen E/L-Ratios analysiert wurden.

Wie die Abbildung 3.60 zeigt, spiegelten sich die durch die Immunfluoreszenzen ermittelten Befunde in der quantitativen Bestimmung des Occludins wieder. Nach einer zweistündigen Inkubation der PBCEC mit neutrophilen Granulozyten in einer E/L-Ratio von 1:5 wurde das Occludin gleichermaßen stark exprimiert, wohingegen nach der Interaktion der Neutrophilen mit den PBCEC im E/L-Verhältnis von 1:20 die Occludin-Expression deutlich reduziert wurde (s. Abb. 3.60 A, Blot-Bande 3c). Claudin-5 wurde dagegen sowohl nach der Inkubation der PBCEC mit Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:5, als auch nach der Neutrophilen-Endothelzell-Interaktion in einer E/L-Ratio von 1:20 quantitativ auf gleichem Niveau exprimiert (s. Abb. 3.60 B).



A: Occludin:

1a - 4a: ohne Neutrophile

1a: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC.

2a: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC, Inkubation mit 0,2 ng TNF- α .

3a: PBCEC, kultiviert in CDM ohne HC-Zusatz, Inkubation mit 2 ng TNF- α .

4a: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC, Inkubation mit 2 ng TNF- α .

1b – 4b: mit Neutrophilen, E/L-Ratio 1:5

1b: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC.

2b: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC, Inkubation mit 0,2 ng TNF- α .

3b: PBCEC, kultiviert in CDM ohne HC, Inkubation mit 2 ng TNF- α .

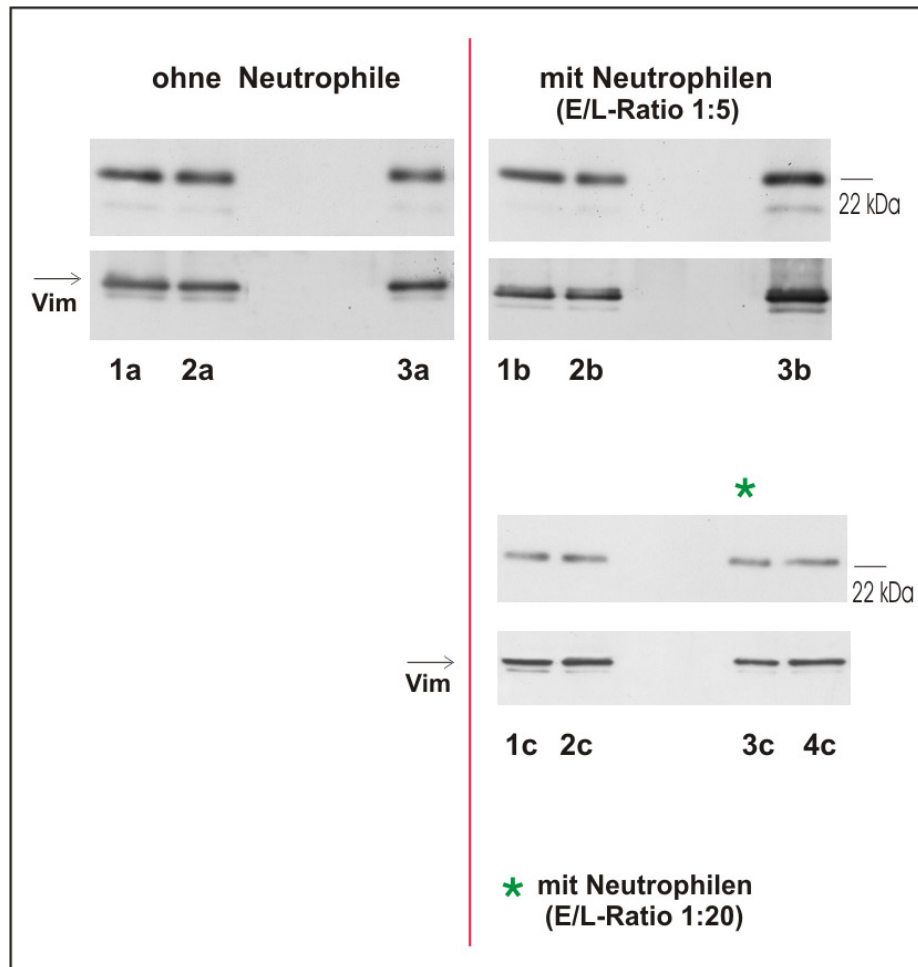
4b: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC, Inkubation mit 2 ng TNF- α .

3c: mit Neutrophilen, E/L-Ratio 1:20

1c: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC.

2c: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC, Inkubation mit 2 ng TNF- α .

3c: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC, Inkubation mit 2 ng TNF- α , Zusatz von Neutrophilen (E/L-Ratio 1:20)



B: Claudin-5:

1a - 3a: ohne Neutrophile

1a: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC.

2a: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC und 0,2 ng TNF- α .

3a: PBCEC, kultiviert in CDM ohne HC-Zusatz von 2 ng/ml TNF- α .

1b – 3b: mit Neutrophilen, E/L-Ratio 1:5

1b: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC.

2b: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC, Inkubation mit 0,2 ng TNF- α .

3b: PBCEC, kultiviert in CDM ohne HC Zusatz, Inkubation mit 2 ng TNF- α .

3c: mit Neutrophilen, E/L-Ratio 1:20

1c: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC.

2c: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC und 2 ng/ml TNF- α .

3c: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC und 2 ng/ml TNF- α ., Zusatz von Neutrophilen (E/L-Ratio 1:20).

Abb. 3.60 A und B:

Western-Blot-Analyse der tight junction-assoziierten Proteine Occludin und Claudin-5 nach der Inkubation der PBCEC mit Neutrophilen in unterschiedlichen E/L-Ratios.

Inkubation der PBCEC mit Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:5 bzw. 1:20. Die Inkubation der PBCEC mit TNF- α erfolgte jeweils 4 h. Inkubationsdauer der Neutrophilen mit den PBCEC: 2 h. Der Pfeil markiert das jeweilige Protein (ZO-1, Occludin und Claudin-5).

Der Vimentin-Nachweis diente dem Abgleich der aufgetragenen Proteinmenge, da Vimentin unter allen Versuchsbedingungen von den PBCEC auf gleichem Niveau exprimiert wird. Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC), Vimentin (Vim). Gesamtproteinmenge/Geltasche: 2 μ g.

Die bisherigen Befunde der Auswirkung der unterschiedlichen E/L-Ratios auf die *tight junction*-assoziierten Proteine ZO-1, Occludin und Claudin-5 der PBCEC zeigten, dass deren Expressionsrate von der eingesetzten Neutrophilen-Anzahl abhängig ist. Auch die TER-Messungen an den auf den Transwell®-Filtern kultivierten PBCEC demonstrierten, dass die E/L-Ratio der entscheidende Faktor war, der die Barrierefunktion der PBCEC beeinträchtigte.

Im Detail wurde der Einfluss der Neutrophilen auf die interendothelialen Zell-Kontakte, den Zell-Substrat-Kontakt und auf die Membrankapazität der Endothelzellen in Abhängigkeit von ihrer eingesetzten Zellzahl mit Hilfe der ECIS-Technik zeitaufgelöst analysiert. Korrelierend zu den ECIS-Untersuchungen, wurden REM-Analysen durchgeführt, die auf morphologischer Ebene den Effekt der E/L-Ratio beleuchten sollten.

In Abbildung 3.61 ist der Verlauf der Parameter R_b , α und C_m zeitaufgelöst während der Interaktion der neutrophilen Granulozyten mit dem entzündungsstimulierten Endothelzell-Monolayer im E/L-Verhältnis von 1:2 dargestellt.

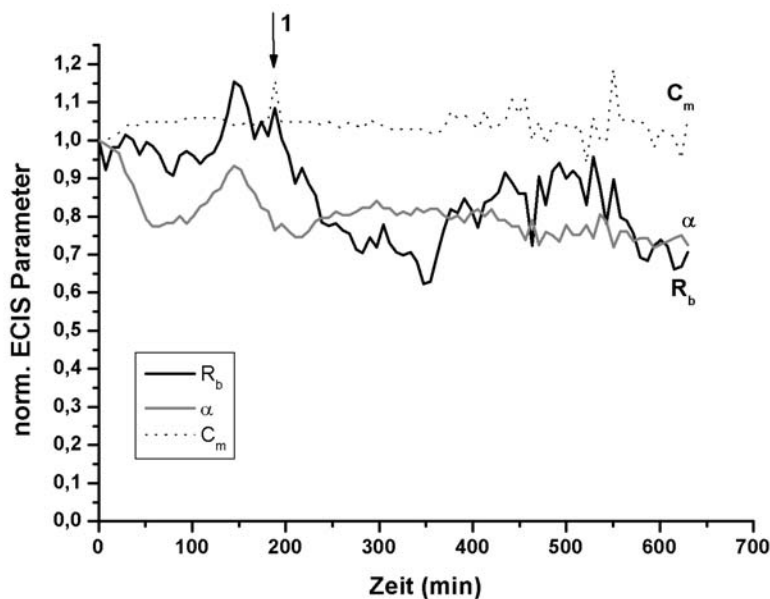


Abb. 3.61:

Interaktion der Neutrophilen mit den entzündungsaktivierten PBCEC (E/L Ratio: 1:2).

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Veränderung der Werte des Zell-Zell-Kontakts (R_b), der Membrankapazität (C_m) und des Zell-Substrat-Kontakts (α) nach Zugabe von 1,4 Millionen neutrophilen Granulozyten.

Die Entzündungsaktivierung der Endothelzellen durch 2 ng/ml TNF- α in 300 μ l CDM (hier nicht dargestellt) erfolgte 8 h vor der Zugabe von 1,4 Millionen neutrophilen Granulozyten in 300 μ l CDM (1). Die Messung erfolgte am 7. DIV. Der eingezeichnete mit 1 versehene Pfeil markiert die Zugabe der Immunzellen.

$R_b(0) = 78 \Omega \times \text{cm}^2$; $\alpha(0) = 41 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ (A), $44 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ und $C_m(0) = 1,0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$, $\alpha(0)$ und $C_m(0)$ normiert.

Die Applikation der neutrophilen Granulozyten in einem E/L-Verhältnis von 1:2 übte kaum einen Einfluss auf den Wert des Parameters α aus, war aber dennoch nachweisbar. Dagegen war der Einfluss der Neutrophilen auf die Zell-Zell-Kontakte deutlicher zu erkennen (s. Abb. 3.61).

Die Beeinträchtigung der ECIS-Parameter des entzündungsaktivierten PBCEC-Monolayers während der Inkubation mit den neutrophilen Granulozyten in einer E/L-Ratio von 1:5 unterschied sich kaum von derjenigen nach Zugabe von Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:2. Allerdings nahm der Wert des Zell-Substrat-Kontakts geringfügig ab (s. Abb. 3.62). Der R_b -Wert der PBCEC wurde durch die Neutrophilen-Inkubation geringfügig und reversibel gesenkt, wie bei dem Einsatz der Immunzellen in einer E/L-Ratio von 1:2 (vergl. Abb. 3.61 und 3.62). Die Membrankapazität wurde nicht beeinträchtigt.

Der Vergleich der ECIS- und der TER-Messung verdeutlichte, dass die TER-Filtermessungen nicht sensitiv genug waren um den Neutrophilen-Effekt auf die Barrierefunktion der Endothelzellen einer E/L-Ratio von 1:5 bis 1:10 nachzuweisen (vergl. Abb. 3.52 und 3.53 sowie 3.61 und 3.62).

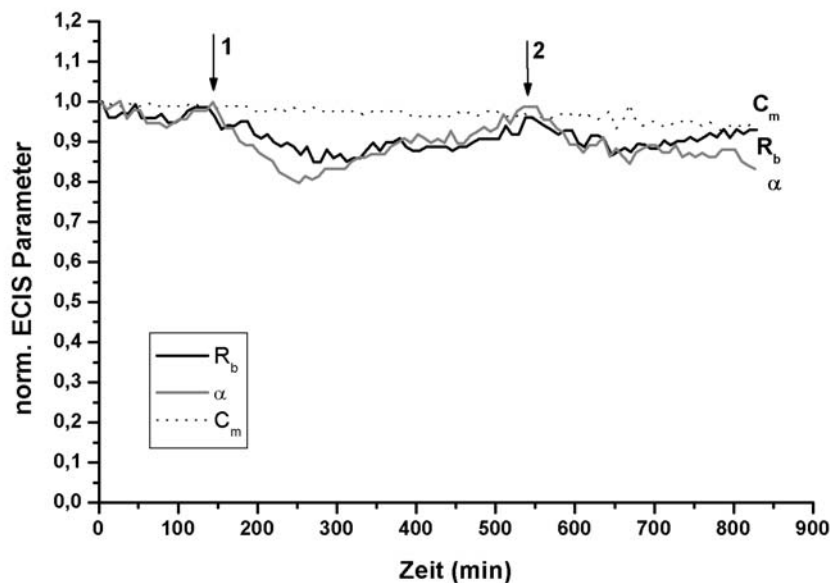


Abb. 3.62:

Interaktion der Neutrophilen mit den entzündungsaktivierten PBCEC (E/L Ratio: 1:5).

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Veränderung der Werte des Zell-Zell-Kontakts (R_b), der Membrankapazität (C_m) und des Zell-Substrat-Kontakts (α) nach Zugabe von 3,2 Millionen neutrophilen Granulozyten.

Die Entzündungsaktivierung der Endothelzellen erfolgte durch 2 ng/ml TNF- α in 300 μ l CDM (1) und die anschließende Zugabe von 3,2 Millionen neutrophilen Granulozyten in 300 μ l CDM (2).

Die Messung erfolgte am 7. DIV. Die Pfeile markieren die Zugabe des TNF- α (1) und der Immunzellen (2).

$R_b(0) = 78 \Omega \times cm^2$; $\alpha(0) = 36 \Omega^{0.5} \times cm$ und $C_m(0) = 2,25 \mu F/cm^2$ geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$, $\alpha(0)$ und $C_m(0)$ normiert.

Im Gegensatz zu der Inkubation der Neutrophilen mit den PBCEC in einer E/L-Ratio von 1:2 bzw. 1:5 verursachte die Interaktion der neutrophilen Granulozyten mit dem entzündungsaktivierten Endothelzell-Monolayer im E/L-Verhältnis von 1:17 bzw. 1:20 eine signifikante Senkung der ECIS-Parameter R_b und α (s. Abb. 3.63 und 3.64). Besonders deutlich manifestierte sich die ausgeprägte Abnahme des Widerstands in dem Wert für R_b , was einer Beeinträchtigung der Zell-Zell-Kontakte und somit der Barrierefunktion der cerebralen Endothelzellen während der Leukozyten-Interaktion entsprach. Die durch die Applikation der Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:17 verursachte Schwächung der Zell-Zell-Kontakte der PBCEC war im Vergleich zur E/L-Ratio von 1:20 weniger stark ausgeprägt und reversibel. Nach der Senkung des R_b -Werts erreichte dieser nach ca. 3 Stunden wieder 70 % seines Ausgangswertes, wohingegen durch eine E/L-Ratio von 1:20 die Schwächung des Zell-Zell-Kontakts der PBCEC zwar ebenfalls reversibel war, allerdings erst nach ca. 8 Stunden wieder 80 % seines Ausgangswertes erreichte.

Der Wert für α wurde nach der Applikation der Neutrophilen in den E/L-Ratios von 1:17 bzw. 1:20 ebenfalls gesenkt. Allerdings festigte sich der Zell-Matrix-Kontakt, der ohnehin schwächer als R_b gesenkt wurde, bei einer E/L-Ratio von 1:17 ca. 1,5 Stunden vor dem Wiederanstieg des Wertes für R_b . Bei einer E/L-Ratio von 1:20 erreichte α nach ca. 8 Stunden wieder annähernd seinen Ausgangswert. Die Zugabe der Neutrophilen zu den PBCEC in einer E/L-Ratio von 1:17 senkte α wesentlich geringfügiger (ca. 15 %) und erreichte im Vergleich zu R_b ca. 1,5 Stunden früher wieder 100 % seines Ausgangswertes.

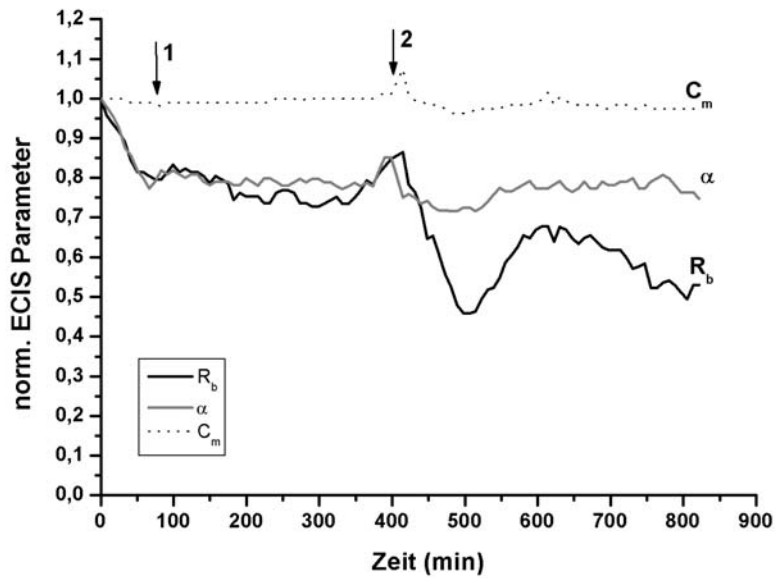


Abb. 3.63:

Interaktion der Neutrophilen mit den entzündungsaktivierten PBCEC (E/L Ratio: 1:17).

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Veränderung der Werte des Zell-Zell-Kontakts (R_b), der Membrankapazität (C_m) und des Zell-Substrat-Kontakts (α) nach Zugabe von 12 Millionen neutrophilen Granulozyten.

Die Entzündungsaktivierung der Endothelzellen erfolgte durch 2 ng/ml TNF- α in 300 μ l CDM (1) und die anschließende Zugabe von 12 Millionen neutrophilen Granulozyten in 300 μ l CDM (2).

Die Messung erfolgte am 7. DIV. Die Pfeile markieren die Zugabe des TNF- α (1) und der Immunzellen (2).

$R_b(0) = 133 \Omega \times \text{cm}^2$; $\alpha(0) = 22 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ und $C_m(0) = 1,89 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$, $\alpha(0)$ und $C_m(0)$ normiert.

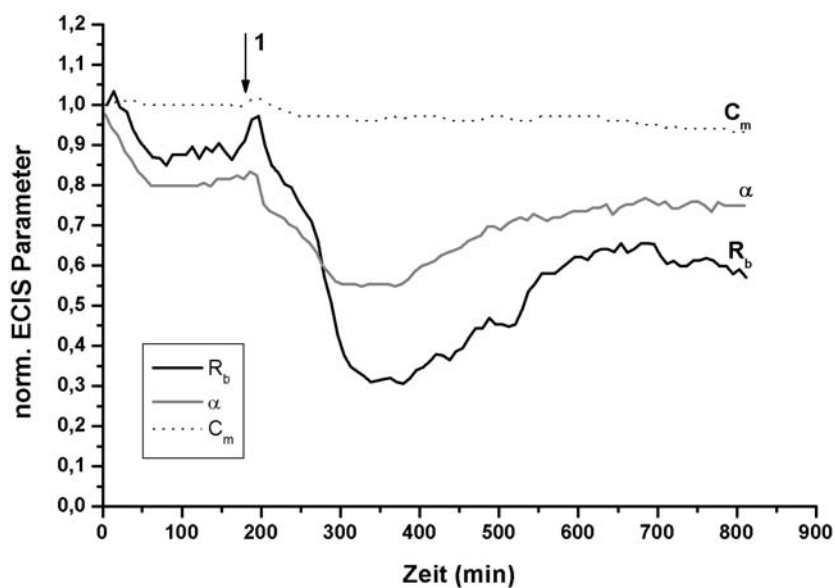


Abb. 3.64:

Interaktion der Neutrophilen mit den entzündungsaktivierten PBCEC (E/L Ratio: 1:20).

Zeitlicher Verlauf der Veränderung der Werte des Zell-Zell-Kontakts (R_b), der Membrankapazität (C_m) und des Zell-Substrat-Kontakts (α) nach Zugabe von 14 Millionen neutrophilen Granulozyten. Die Entzündungsaktivierung der Endothelzellen durch 2 ng/ml TNF- α in 300 μ l CDM (hier nicht dargestellt) erfolgte 8 h vor der anschließenden Zugabe von 14 Millionen neutrophilen Granulozyten in 300 μ l CDM (1).

Die Messung erfolgte am 7. DIV. Der Pfeil markiert die Zugabe der Immunzellen (1).

$R_b(0) = 232 \Omega \times \text{cm}^2$; $\alpha(0) = 57 \Omega^{0,5} \times \text{cm}$ und $C_m(0) = 1,8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$, $\alpha(0)$ und $C_m(0)$ normiert.

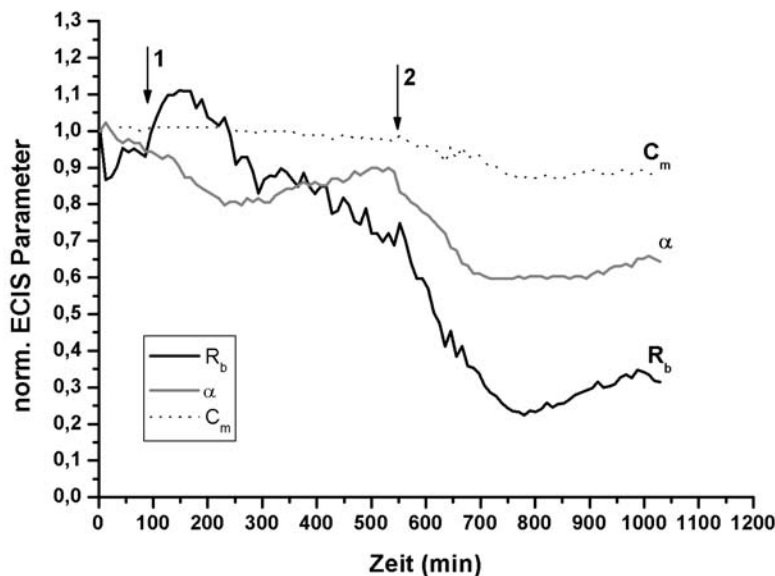


Abb. 3.65

Interaktion der Neutrophilen mit den entzündungsaktivierten PBCEC (E/L Ratio: 1:30).

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Veränderung der Werte des Zell-Zell-Kontakts (R_b), der Membrankapazität (C_m) und des Zell-Substrat-Kontakts (α) nach Zugabe von 22 Millionen neutrophilen Granulozyten.

Die Entzündungsaktivierung der Endothelzellen erfolgte durch 2 ng/ml TNF- α in 300 μ l CDM (1) und die anschließende Zugabe von 22 Millionen neutrophilen Granulozyten in 300 μ l CDM (2).

Die Messung erfolgte am 7. DIV. Die Pfeile markieren die Zugabe des TNF- α (1) und der Immunzellen (2).

$R_b(0) = 124 \Omega \times \text{cm}^2$; $\alpha(0) = 49 \Omega^{0,5} \times \text{cm}$ und $C_m(0) = 1,2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$, $\alpha(0)$ und $C_m(0)$ normiert.

Die Applikation der Neutrophilen zu den PBCEC die einer E/L-Ratio von 1:30 führte zu einer erheblichen Senkung des ECIS-Parameters R_b . Diese war nur geringfügig reversibel. Der Zell-Substrat-Kontakt wurde durch die Neutrophilen-Zugabe in einer E/L-Ratio von 1:30 ebenfalls stark beeinträchtigt, stieg allerdings ca. 1,5 Stunden nach Applikation der Immunzellen wieder auf ca. 70 % seines Ausgangswertes an.

Generell unterschied sich die Auswirkung der Zugabe der Neutrophilen auf R_b und α in einer E/L-Ratio von 1:20 zu derjenigen von 1:30 kaum (vergl. Abb. 3.64 und 3.65).

Die Inkubation der Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:50 dagegen, verursachte einen irreversiblen Abfall von R_b , was einer völligen Schädigung der *tight junctions* und damit der PBCEC-Barrierefunktion entsprach (s. Abb. 3.66). Der Zell-Substrat-Kontakt wurde durch die Applikation der Neutrophilen zu den PBCEC in einer derart hohen Anzahl zwar stark geschwächt, was sich in einer ca. 40%-igen Reduzierung des Wertes des Parameters α manifestierte, wurde allerdings nicht wie die interendothelialen Zell-Zell-Kontakte völlig zerstört. Die Inkubation der PBCEC mit Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:50 führte im Vergleich zu den E/L-Ratios von 1:17, 1:20 und 1:30 zu einer Senkung von C_m , was einer Beeinträchtigung der Membrankapazität entsprach.

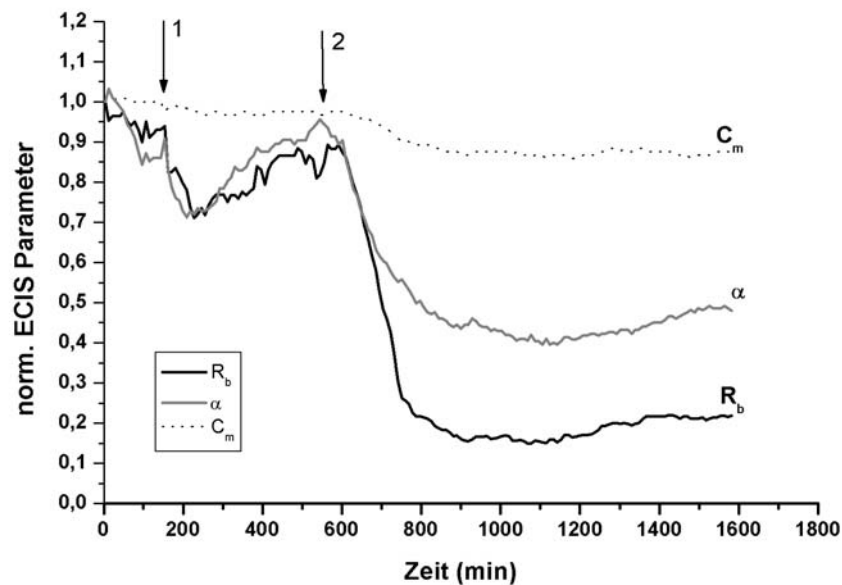


Abb. 3.66:

Interaktion der Neutrophilen mit den entzündungsaktivierten PBCEC (E/L Ratio: 1:50).

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Veränderung der Werte des Zell-Zell-Kontakts (R_b), der Membrankapazität (C_m) und des Zell-Substrat-Kontakts (α) nach Zugabe von 35 Millionen neutrophilen Granulozyten.

Die Entzündungsaktivierung der Endothelzellen erfolgte durch 2 ng/ml TNF- α in 300 μ l CDM (1) und die anschließende Zugabe von 35 Millionen neutrophilen Granulozyten in 300 μ l CDM (2).

Die Messung erfolgte am 7. DIV. Die Pfeile markieren die Zugabe des TNF- α (1) und der Immunzellen (2).

$R_b(0) = 126 \Omega \times \text{cm}^2$; $\alpha(0) = 49 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ und $C_m(0) = 1,2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$, $\alpha(0)$ und $C_m(0)$ normiert.

In der Abbildung 3.67 und 3.68 ist der Einfluss der Neutrophilen in Abhängigkeit ihrer applizierten Zellzahl auf den Zell-Zell-Kontakt (R_b) und den Zell-Substrat-Kontakt (α) der PBCEC, wie in den Abbildungen 3.62 bis 3.66 bereits gezeigt wurde, nochmals zusammenfassend dargestellt. Dabei wurde zur optimalen Vergleichbarkeit ausschließlich der Kurvenverlauf des Parameters R_b der PBCEC zum Zeitpunkt der Neutrophilen-Zugabe in unterschiedlicher E/L-Ratios aufgeführt. Der Abschnitt des Kurvenverlaufs von R_b nach der Zugabe des TNF- α bis zur Zugabe der Neutrophilen wurde hier nicht nochmals gezeigt.

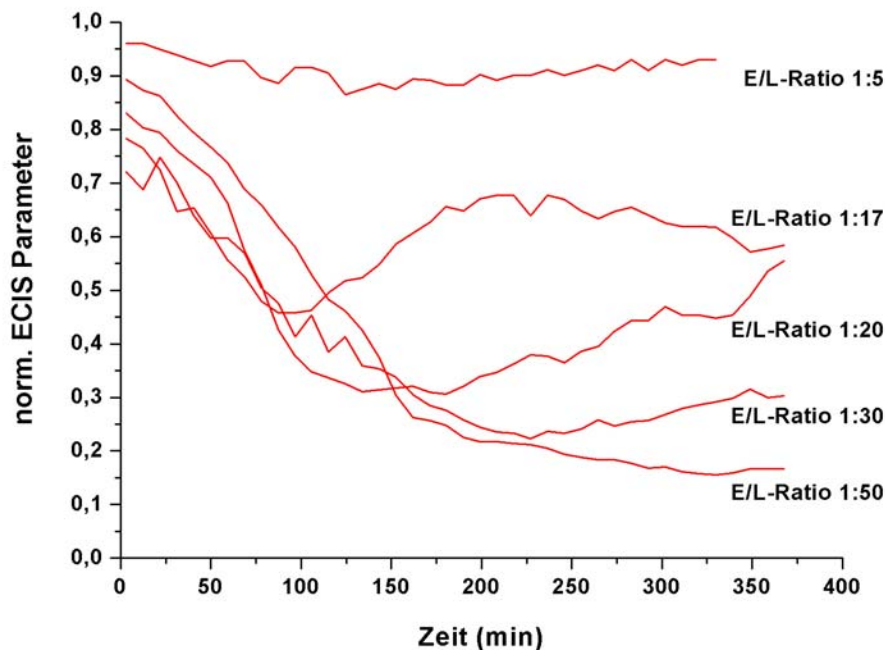


Abb. 3.67:

Zusammenfassende Darstellung des Einflusses der Neutrophilen-Interaktion auf den Zell-Zell-Kontakt (R_b) der PBCEC in Abhängigkeit von der E/L-Ratio.

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Veränderung der Werte des Zell-Zell-Kontakts (R_b) der PBCEC nach der Zugabe von neutrophilen Granulozyten in unterschiedlicher Anzahl (s. Grafik). Die sich daraus ergebenden E/L-Ratios sind in der Grafik aufgeführt.

Die Grafik zeigt die Kurvenverläufe der Parameter-Werte für R_b zum Zeitpunkt der Zugabe der Neutrophilen. Der Kurvenverlauf des zuvor applizierten TNF- α (2 ng/ml in 300 μ l CDM) zwecks der Entzündungsaktivierung der PBCEC wurde hier nicht dargestellt. Die Messung erfolgte am 7. DIV.

Dabei entspricht den unterschiedlichen E/L-Ratios folgende Neutrophilenanzahl:

E/L-Ratio von 1:5 = 3,2 Millionen Neutrophile, E/L-Ratio von 1:17 = 12 Millionen Neutrophile, E/L-Ratio von 1:20 = 14 Millionen Neutrophile, E/L-Ratio von 1:30 = 22 Millionen Neutrophile, E/L-Ratio von 1:50 = 35 Millionen Neutrophile

$R_b(0) = 78 \Omega \times \text{cm}^2$ (E/L-Ratio: 1:5), $R_b(0) = 110 \Omega \times \text{cm}^2$ (E/L-Ratio: 1:17), $R_b(0) = 205 \Omega \times \text{cm}^2$ (E/L-Ratio: 1:20), $R_b(0) = 115 \Omega \times \text{cm}^2$ (E/L-Ratio: 1:30), $R_b(0) = 120 \Omega \times \text{cm}^2$ (E/L-Ratio: 1:50) geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$, $\alpha(0)$ und $C_m(0)$ normiert.

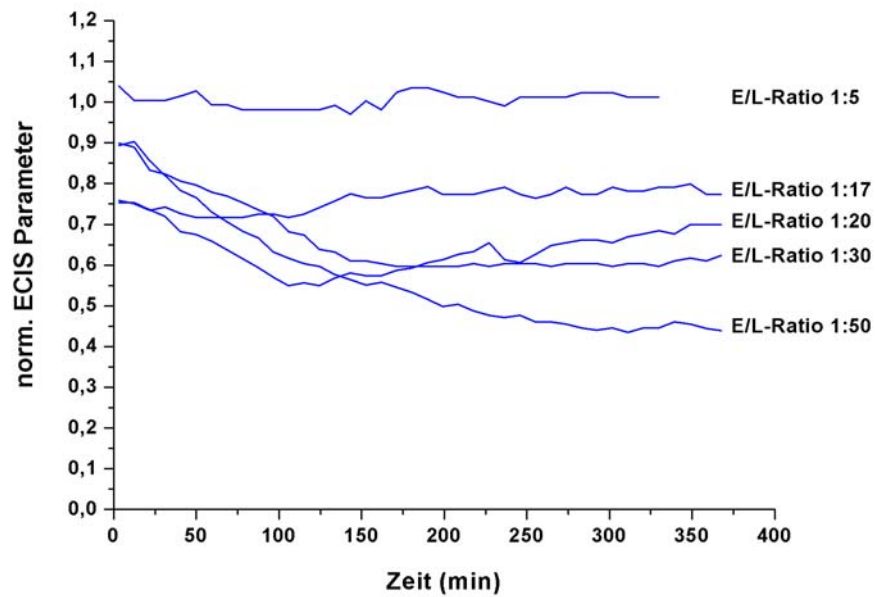


Abb. 3.68:

Zusammenfassende Darstellung des Einflusses der Neutrophilen-Interaktion auf den Zell-Substrat-Kontakt (α) der PBCEC in Abhängigkeit von der E/L-Ratio.

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Veränderung der Werte des Zell-Substrat-Kontakts (α) der PBCEC nach der Zugabe von neutrophilen Granulozyten in unterschiedlicher Anzahl (s. Grafik). Die sich daraus ergebenden E/L-Ratios sind in der Grafik aufgeführt. Die Grafik zeigt die Kurvenverläufe der Parameter-Werte für α zum Zeitpunkt der Zugabe der Neutrophilen. Der Kurvenverlauf des zuvor applizierten TNF- α (2 ng/ml in 300 μ l CDM) zwecks der Entzündungsaktivierung der PBCEC wurde hier nicht dargestellt.

Die Messung erfolgte am 7. DIV. Die Pfeile markieren die Zugabe des TNF- α (1) und der Immunzellen (2).

Dabei entspricht den unterschiedlichen E/L-Ratios folgende Neutrophilenanzahl:

E/L-Ratio von 1:5 = 3,2 Millionen Neutrophile, E/L-Ratio von 1:17 = 12 Millionen Neutrophile, E/L-Ratio von 1:20 = 14 Millionen Neutrophile, E/L-Ratio von 1:30 = 22 Millionen Neutrophile, E/L-Ratio von 1:50 = 35 Millionen Neutrophile

$\alpha(0) = 49 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ (E/L-Ratio: 1:5), $\alpha(0) = 22 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ (E/L-Ratio: 1:17), $\alpha(0) = 55 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ (E/L-Ratio: 1:20), $\alpha(0) = 48 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ (E/L-Ratio: 1:30), $\alpha(0) = 49 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ (E/L-Ratio: 1:50) geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$, $\alpha(0)$ und $C_m(0)$ normiert.

Die Abbildung 3.67 verdeutlicht den enormen Einfluss einer ansteigenden E/L-Ratio auf das Maß der Schwächung der Zell-Zell-Kontakte der cerebralen Kapillarendothelzellen. So wurde durch die Zugabe der Neutrophilen in einer Anzahl, die einer E/L-Ratio von 1:30 entsprach, der interendotheliale Zell-Kontakt irreversibel gestört.

In der Abbildung 3.68 ist in identischer Form der Kurvenverlauf der Parameter-Werte des Zell-Substrat-Kontakts (α) dargestellt. Die vergleichende Darstellung demonstriert, dass durch die Inkubation der PBCEC mit den Neutrophilen der Zell-Matrix-Kontakt der Endothelzellen mit steigender Neutrophilen-Anzahl zunehmend geschwächt wurde (s. Abb. 3.68, E/L-Ratio ab 1:20).

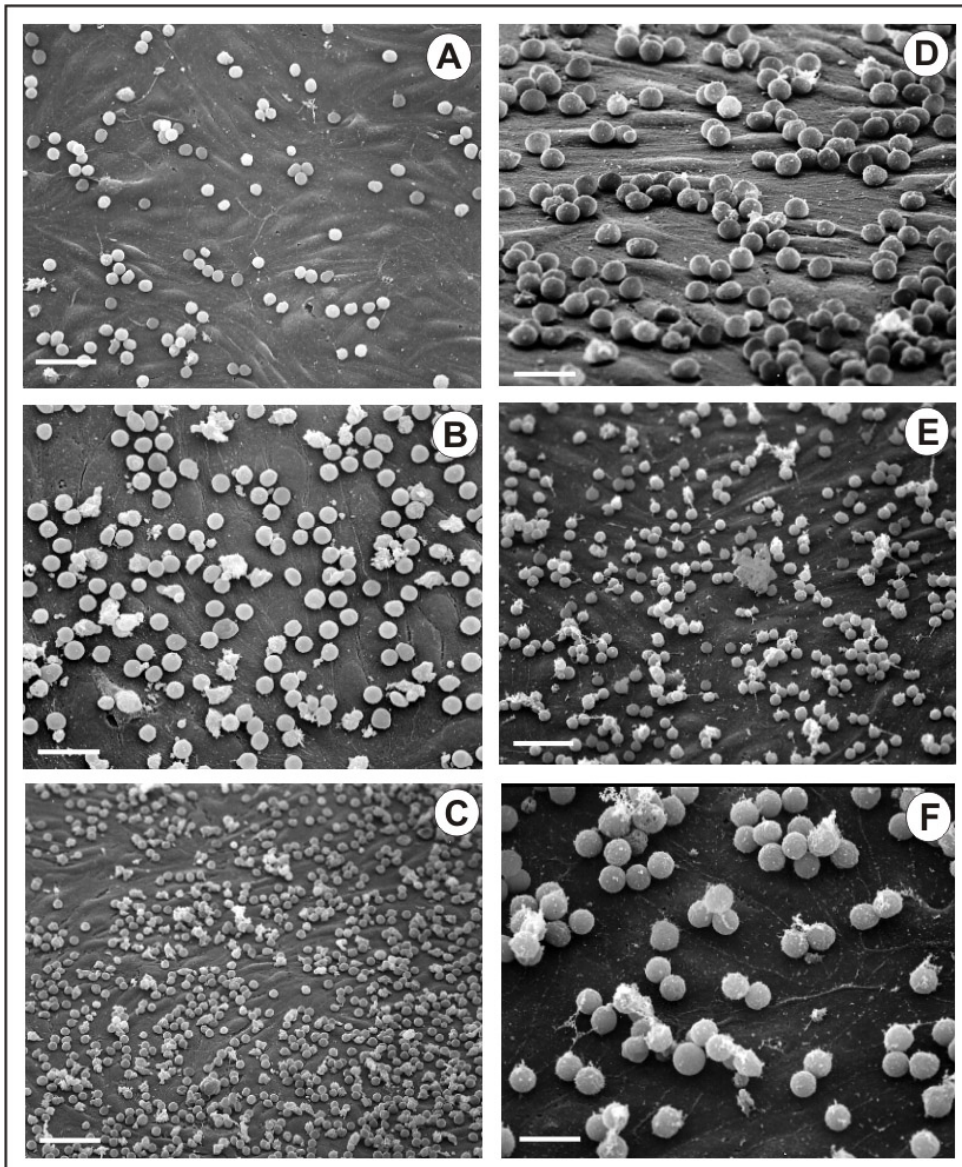


Abb. 3.69 A-F:

REM-Analyse der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion in unterschiedlichen E/L-Ratios.

Dargestellt sind REM-Aufnahmen neutrophiler Granulozyten in Interaktion mit dem entzündungsstimulierten (A-D) und dem nicht aktivierten Endothelzell-Monolayer (E und F).

A: Neutrophilen-PBCEC-Interaktion in einer E/L Ratio von 1:5.

B: Neutrophilen-PBCEC-Interaktion in einer E/L Ratio von 1:20.

C: Neutrophilen-PBCEC-Interaktion in einer E/L Ratio von 1:50.

D: Neutrophilen-PBCEC-Interaktion in einer E/L Ratio von 1:20.

(Ausschnittsvergrößerung zur Verdeutlichung des Neutrophilen-Kontakts mit den Endothelzellen, s. auch Abb. 3.70 A)

E: Neutrophilen-PBCEC-Interaktion in einer E/L Ratio von 1:20

(PBCEC nicht entzündungsstimuliert).

F: Neutrophilen-PBCEC-Interaktion in einer E/L Ratio von 1:20 (PBCEC nicht entzündungsstimuliert; Ausschnittsvergrößerung zur Verdeutlichung des Neutrophilen-Kontakts mit den Endothelzellen).

Die Fixierung der mit den Neutrophilen interagierenden PBCEC erfolgte am 7. DIV. Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Die Entzündungsaktivierung mit 2 ng/ml TNF- α erfolgte 4 h vor der Neutrophilen-Zugabe in die apikale Filterkammer. Inkubationsdauer der Neutrophilen mit den Endothelzellen: 2 h.

Vergrößerung: der Balken im unteren linken Bildausschnitt entspricht in Abbildung A, C, E 50 μ m, in Abbildung D und F 10 μ m und in B 15 μ m.

Durch REM-Analysen wurde die PBCEC-Neutrophilen-Interaktion visualisiert und mit den biophysikalisch ermittelten Befunden verglichen.

Interessanterweise zeigten die REM-Aufnahmen, dass trotz der hohen E/L-Ratio und der großen Anzahl adhärenter Neutrophiler, verhältnismäßig wenige Transmigrations-Ereignisse auftraten. Dabei spielte es keine Rolle, ob die PBCEC zuvor entzündungsstimuliert wurden (s. Abb. 3.69 E und F). Diejenigen Leukozyten, die nicht in Wechselwirkung mit den Endothelzellen standen, wurden durch den Fixierungsvorgang von dem PBCEC-Monolayer gespült, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die auf den PBCEC liegenden Leukozyten auf den Endothelzellen adhärten. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten weiterhin keine speziell durch eine erhöhte E/L-Ratio verursachte morphologische Veränderung des cerebralen Endothelzell-Monolayers.

3.2.2.2 Morphologische Detail-Analyse der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion

Die bisher aufgeführten Befunde der immunzytochemischen und impedanzspektroskopischen Untersuchungen zeigten deutlich, dass durch die Neutrophilen-PBCEC-Interaktion die interendothelialen Zell-Zell-Kontakte beeinträchtigt wurden. Die Ergebnisse der ECIS-Messungen demonstrierten, dass in erster Linie die Zell-Zell-Kontakte der PBCEC geschwächt wurden, was sich in der Senkung des Parameters R_b manifestierte. Die biophysikalisch nachgewiesene Beeinträchtigung der *tight junction*-Region korrelierte mit den immunzytochemischen Beobachtungen, die eine verminderte Expression der *tight junction*-assoziierten Proteine zeigten. Die parallel durchgeführten REM-Studien zeigten allerdings, dass der Transmigrations-Mechanismus der Leukozyten komplexer zu sein scheint, als die bisherigen Studien bisher vermuten ließen und die beobachtete Beeinträchtigung der PBCEC-Barrierefunktion nicht unmittelbar mit einer Neutrophilen-Transmigration korrelierbar ist. Zur Analyse der Leukozyten-Transmigration war somit zunächst eine morphologische Detail-Analyse notwendig.

In der Abbildung 3.70 sind die unterschiedlichen Stadien der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion dargestellt. Beginnend mit dem relativ lockeren Kontakt, dem sogenannten `Rollen` der Leukozyten (s. Abb. 3.70 A und B), bei dem die Neutrophilen in noch kugelförmiger Form auf der Endothelzell-Oberfläche liegen, kommt es im nächsten Schritt zur sogenannten `festen Adhäsion` der Immunzellen (s. Abb. 3.70 C und D) und schließlich zur Abflachung des Leukozyten. Die abschließende Neutrophilen-Transmigration, dargestellt in Abbildung 3.70 E und F stellt das finale Ereignis der sogenannten `Adhäsionskaskade` der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion dar.

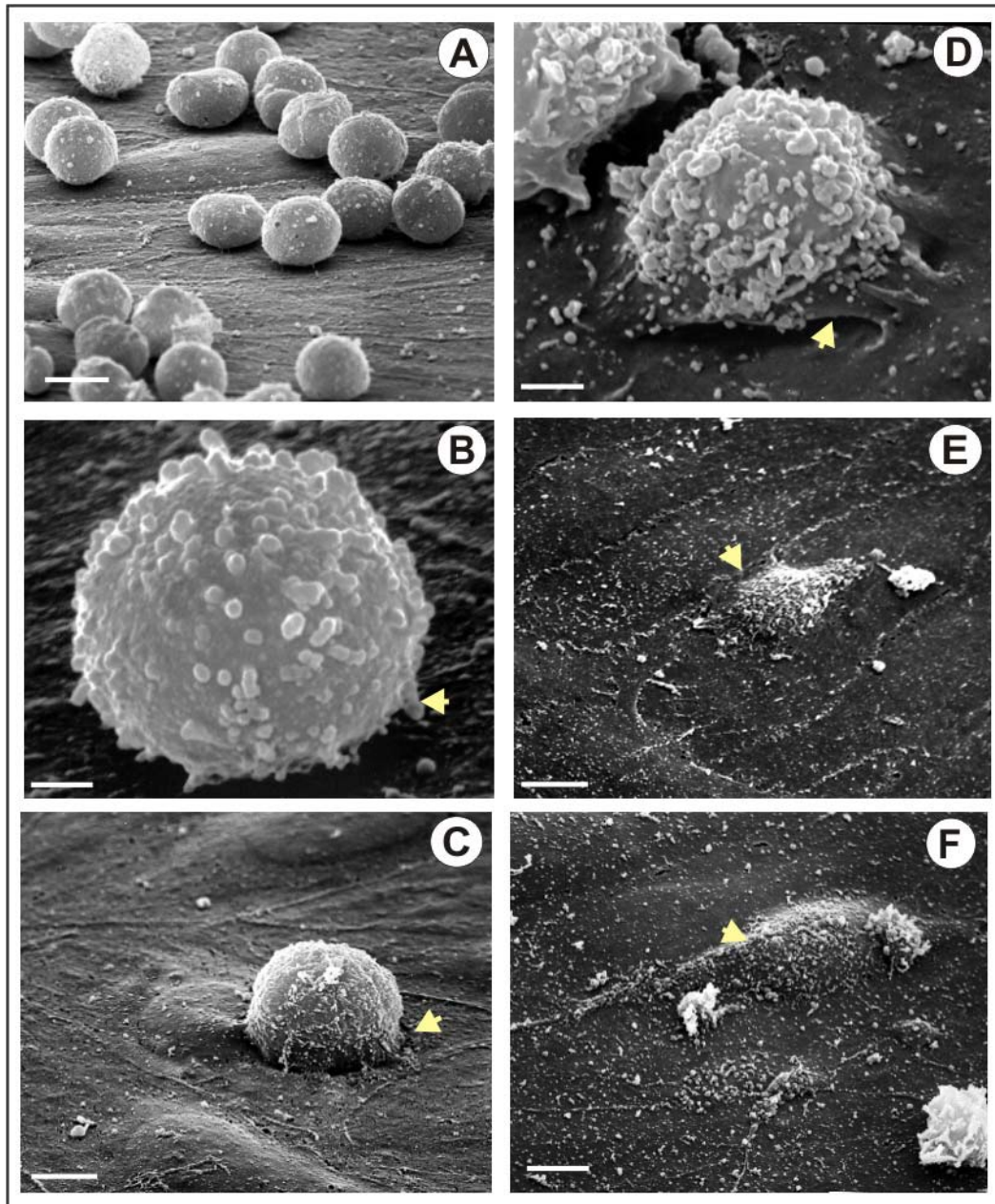


Abb. 3.70 A-F:

REM-Analyse der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion

Dargestellt sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der unterschiedlichen Stadien der Neutrophilen-Endothelzell-Interaktion.

A: `Rollen` der Neutrophilen auf den Endothelzellen.

B: `Rollen`, bzw. erste festere Adhäsion des Neutrophilen (s. Pfeil).

C: Feste Adhäsion des Leukozyten.

D: Feste Adhäsion und beginnende Transmigration.

E: Transmigrierender neutrophiler Granulozyt.

F: Transmigrierender neutrophiler Granulozyt (Endstadium).

Die Fixierung der mit den Neutrophilen interagierenden PBCEC erfolgte am 7. DIV. Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium (CDM) mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Die Pfeile in den Abbildungen verdeutlichen die Kontaktbereiche des Neutrophilen mit dem PBCEC-Monolayer.

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht in Abbildung A u. E 8 µm, in Abbildung C u. F 5 µm und in Abbildung B u. D 1 µm.

In der Abbildung 3.71 ist die Neutrophilen-Transmigration nochmals im Detail dargestellt. Wie die REM-Aufnahmen zeigen, kommt es während der Neutrophilen-Diapedese zu einer Interaktion der Immunzell- mit der Endothelzell-Membran, was in Abbildung 3.71 (s. Pfeil) besonders deutlich zu sehen ist. Interessanterweise zeigen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen, dass die membranvesikelartigen Strukturen der Endothelzellgrenzen mit den Oberflächenausstülpungen der transmigrierenden neutrophilen Granulozyten interagieren, wie die Abbildungen 3.72 A und B nochmals besonders deutlich demonstrieren. Die Aufnahmen zeigen zudem, dass die membranvesikelartigen Strukturen der Neutrophilen und der PBCEC morphologisch identisch aussehen und ausschließlich nach dem Neutrophilen-Kontakt auf der Endothelzell-Oberfläche zu beobachten sind. Auch die *marginal folds* der PBCEC erscheinen nach dem Neutrophilen-Kontakt als Aufreihung einzelner membranvesikelartiger Strukturen, die sich entlang der Zellgrenzen perlenschnur-artig verteilen. Dies zeigt besonders deutlich der Vergleich der Abbildungen 3.75 A und B mit der Abbildung 3.75 D.

Die REM-Aufnahmen der Abbildung 3.72 zeigen zudem, dass die Neutrophilen-Diapedese nicht nur die *tight junction*-Region des Endothelzell-Monolayers involviert, sondern auch Zell-Zell-Wechselwirkungen über eine breitflächige Membraninteraktion beider beteiligter Zelltypen mit einschließt. Insbesondere die Abbildungen 3.72 C und D (weiße Pfeile) demonstrieren sehr deutlich, dass die Membran des Neutrophilen mittig auf der Endothelzelle mit der Endothelzell-Membran interagiert. Die REM-Aufnahme der Abbildung 3.72 E demonstriert am signifikantesten das flächige Einsinken des Leukozyten durch die Endothelzelle. Besonders auffällig in dieser Abbildung ist die Beteiligung der Endothelzell-Membran während der Neutrophilen-Diapedese.

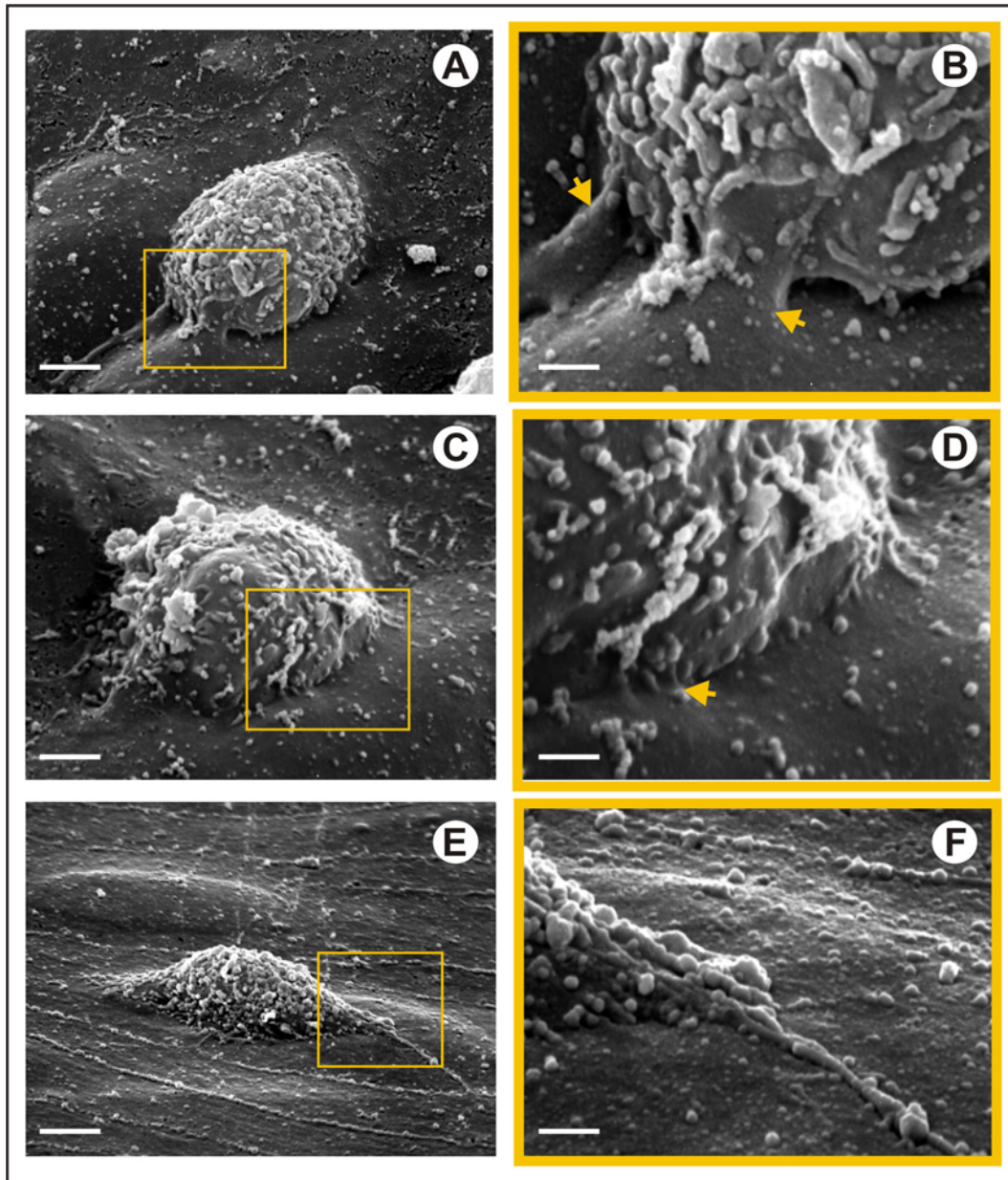


Abb. 3.71 A-F:

Transmigration neutrophiler Granulozyten durch den entzündungsaktivierten PBCEC-Monolayer.

Dargestellt sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen transmigrierender neutrophiler Granulozyten aus unterschiedlichen Präparationen in verschiedenen Vergrößerungen. Die jeweilige Ausschnittsvergrößerung des orange markierten Bildausschnitts ist auf der rechten Seite der Abbildung nochmals dargestellt.

Die Fixierung der mit den Neutrophilen interagierenden PBCEC erfolgte am 7. DIV. Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Die Entzündungsaktivierung der PBCEC erfolgte 4 h vor der Neutrophilen-Zugabe durch 2 ng/ml TNF- α . Inkubationsdauer der Neutrophilen mit den Endothelzellen: 2 h.

Die Pfeile in den Abbildungen verdeutlichen die Kontaktbereiche der Leukozyten mit der Endothelzell-Oberfläche.

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht in Abbildung B, D und F 0,5 μ m, in Abbildung A und C 1,5 μ m und in E 3 μ m.

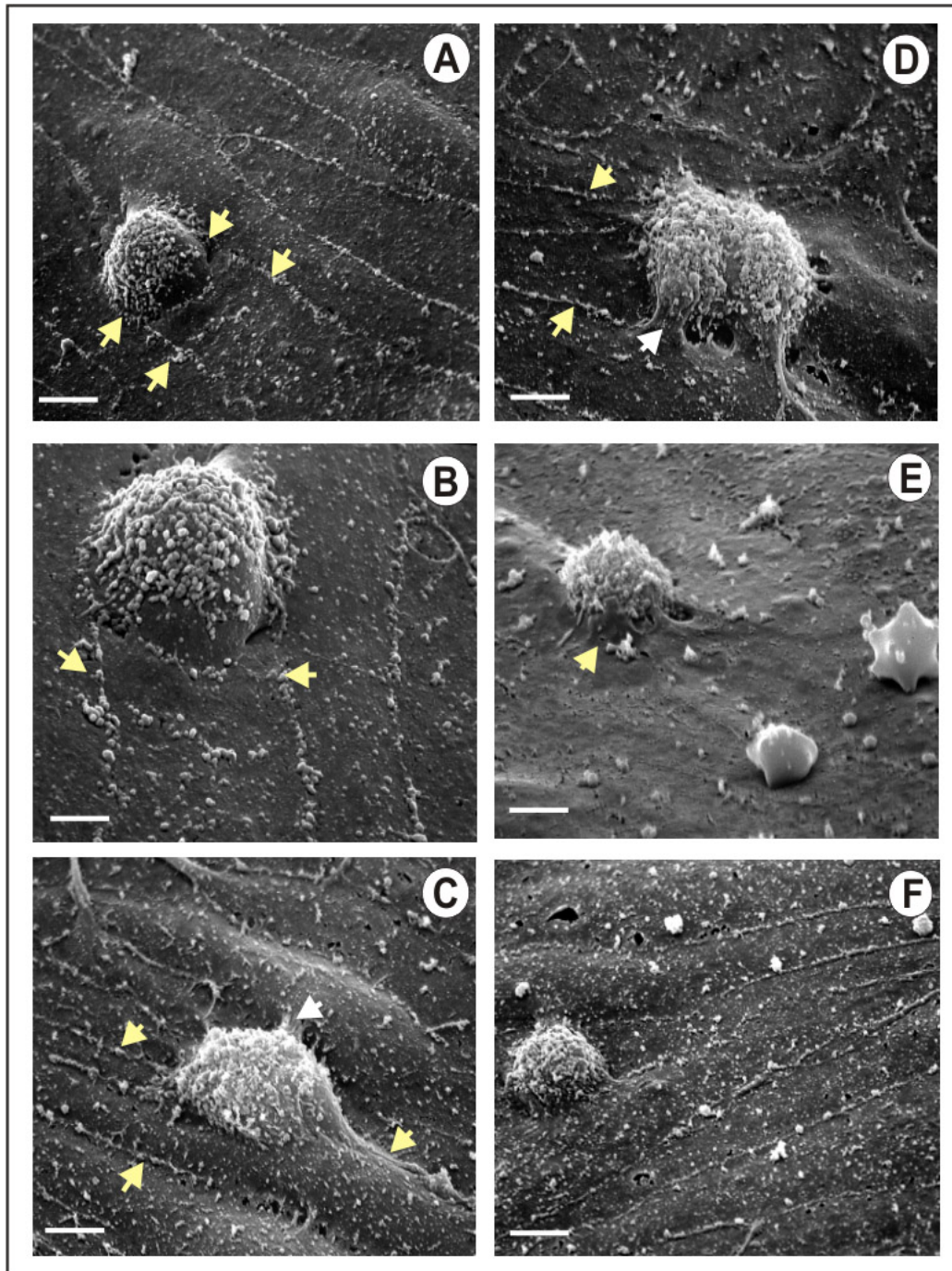


Abb. 3.72 A-D:

Transmigration neutrophiler Granulozyten durch den aktivierten PBCEC-Monolayer.

Dargestellt sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen transmigrierender neutrophiler Granulozyten aus unterschiedlichen Präparationen. Die Aufnahmen zeigen die flächige Aufspreitung der Neutrophilen während der Transmigration. Zu beachten ist jeweils die Entfernung des Leukozyten zu den PBCEC-Zellgrenzen.

Die Fixierung der mit den Neutrophilen interagierenden PBCEC erfolgte am 7. DIV. Inkubationsmedium: CDM mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Die Entzündungsaktivierung der PBCEC erfolgte 4 h vor der Neutrophilen-Zugabe durch 2 ng/ml TNF- α . Inkubationsdauer der Neutrophilen mit den Endothelzellen: 2 h. Die Pfeile in den Abbildungen verdeutlichen die Kontaktbereiche der Leukozyten mit der Endothelzell-Oberfläche.

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht in Abbildung A, E und F 5 μ m und in Abbildung B-D 3 μ m.

Eine unmittelbare Korrelation der Lokalisation der Neutrophilen-Transmigration in bezug auf die *marginal folds* der PBCEC zeigte sich nicht. Dennoch war die Beteiligung der *tight junction*-Region am Neutrophilen-Transmigrationsprozess basierend auf den REM-Aufnahmen nicht auszuschließen, wie die Befunde der immunzytochemischen und impedanzspektroskopischen Untersuchungen der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion in Abhängigkeit von der E/L-Ratio bereits zeigten. Die REM-Studien verdeutlichten allerdings, dass die Neutrophilen-Transmigration flächig auf der gesamten Breite der Endothelzellen erfolgte und zudem dabei deren Zellgrenzen involvierte. Somit demonstrierten die morphologischen Studien, dass während der Neutrophilen-Transmigration nicht ausschließlich die interendothelialen Zell-Kontakte beteiligt waren, wie die immunzytochemischen und biophysikalischen Analysen zunächst vorzugeben schienen.

Die morphologischen Untersuchungen der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion zeigten zudem, dass sich in Abhängigkeit von dem jeweiligem Stadium der Adhäsionskaskade, die Oberflächenstruktur des Leukozyten stark veränderte. So waren während des initialen Kontakts der Leukozyten mit den PBCEC auf der Leukozyten-Oberfläche kaum Ausstülpungen zu sehen (s. Abb. 3.73 A und B). Demgegenüber kam es während der festen Adhäsion bzw. beginnende Transmigration des Neutrophilen zu einer extrem ausgeprägten Entwicklung der Mikrovilli bzw. membranvesikelartigen Strukturen auf seiner Zelloberfläche (s. Abb. 3.73 C und D), die gegen Ende der Transmigration wieder reduziert wurde (s. Abb. 3.73 E). Wie in der Abbildung 3.73 F zu sehen ist, verblieben nach der Neutrophilen-Diapedese zahlreiche der membranvesikelartigen Strukturen auf der Endothelzell-Oberfläche, über deren Ursprung, basierend auf den REM-Analysen allein keine Aussage getroffen werden konnte.

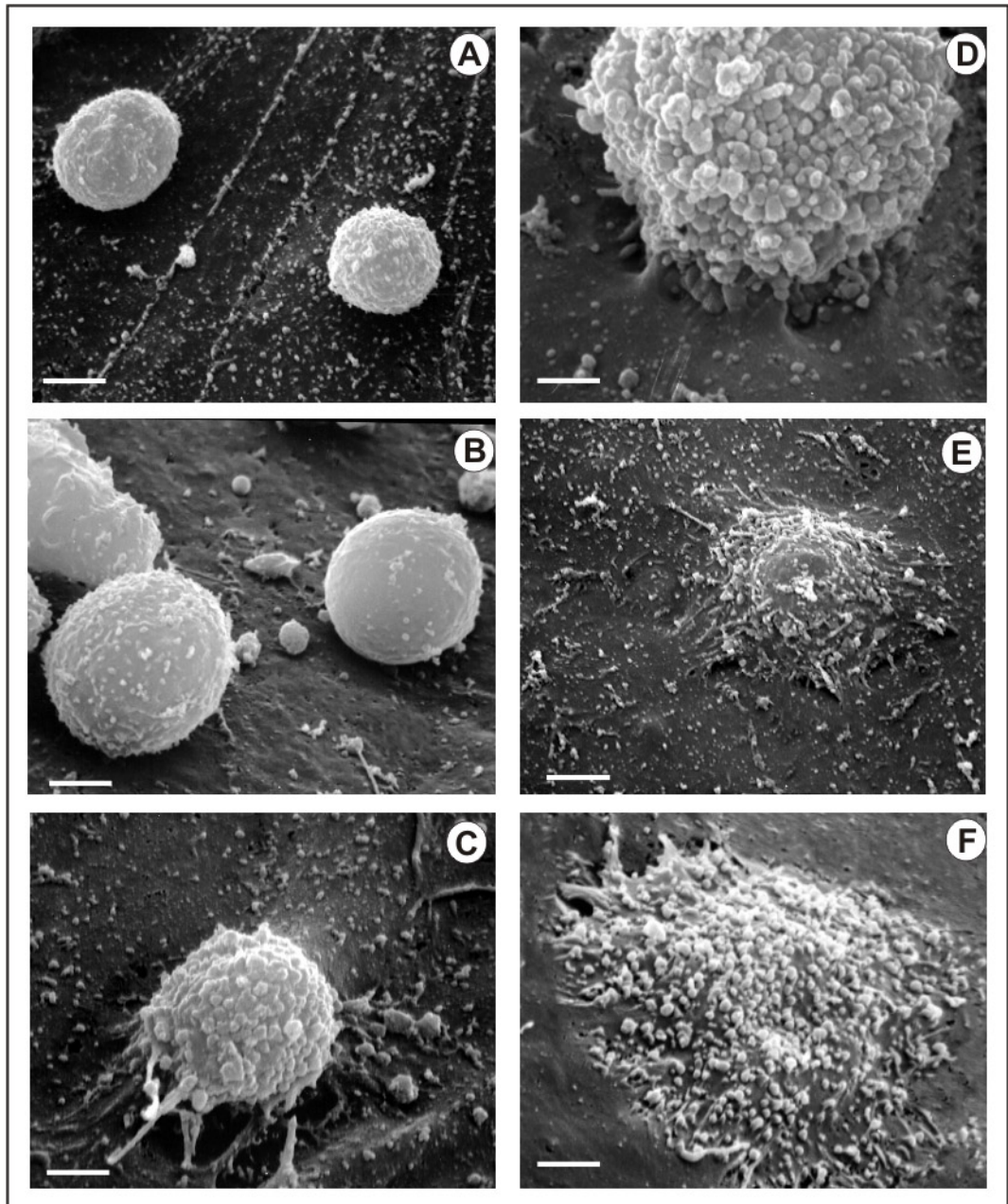


Abb. 3.73 A-F:

REM-Analyse der Mikrovilli-Strukturen auf der Neutrophilen-Oberfläche während der unterschiedlichen Stadien der Adhäsionskaskade.

Dargestellt sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der unterschiedlichen Stadien der Neutrophilen-Endothelzell-Interaktion. Zu beachten ist jeweils die Ausprägung der Mikrovilli-Strukturen auf der Neutrophilen-Oberfläche während der unterschiedlichen Leukozyten-Endothelzell-Interaktionsstadien.

A und B: ‘Rollen’ der Neutrophilen auf den Endothelzellen; Mikrovilli auf der Neutrophilen-Oberfläche kaum entwickelt.

C und D: Feste Adhäsion des Leukozyten; extrem stark ausgeprägte Oberflächen-Ausstülpungen auf der Neutrophilen-Oberfläche.

E und F: Transmigrierter neutrophiler Granulozyt; die membranvesikelartigen Strukturen verteilen sich auf der Endothelzell-Oberfläche.

Inkubationsmedium: Chemisch definiertes Medium (CDM) mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Die Fixierung der mit den Neutrophilen interagierenden PBCEC erfolgte am 7. DIV.

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht in Abbildung B, E und F 2 µm, in Abbildung A 3 µm und in Abbildung C 1,5 µm.

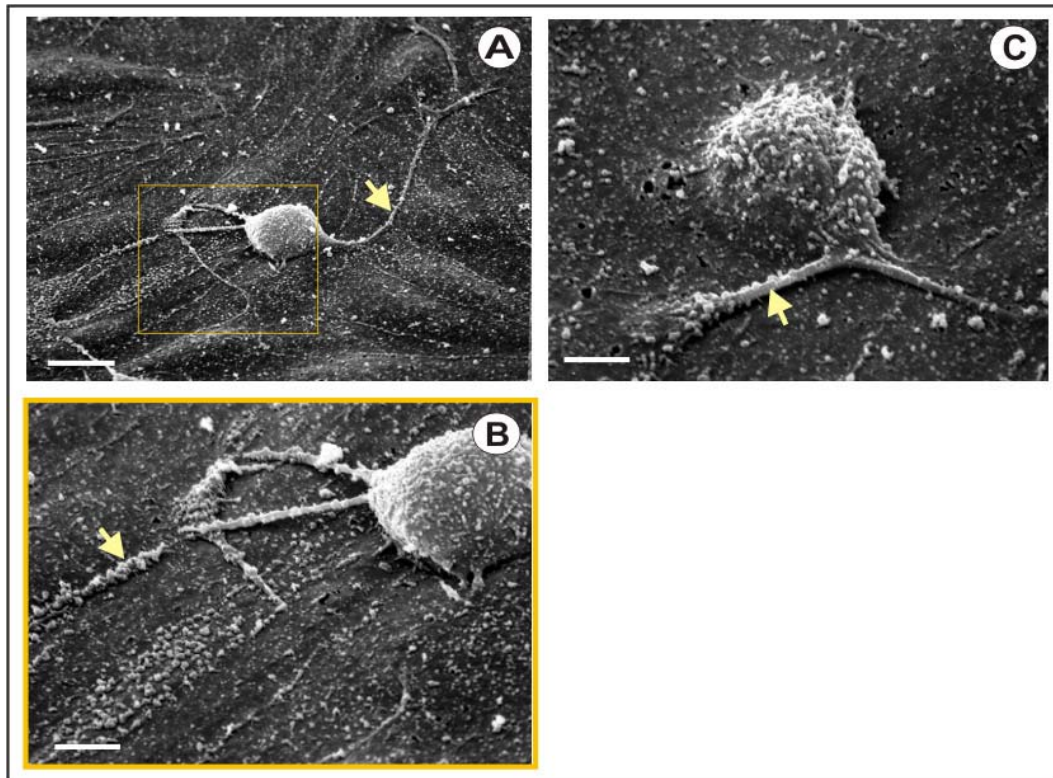


Abb. 3.74 A-C:

REM-Analyse der Neutrophilen-Filipodien während der PBCEC-Neutrophilen-Interaktion.

Dargestellt sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Neutrophilen-Endothelzell-Interaktion. Zu beachten sind jeweils die vom Neutrophilen ausgehenden Filipodien und deren Interaktionsbereiche auf der Endothelzell-Oberfläche.

A und B: Auf den PBCEC adhärrender Neutrophiler, von dem Filipodien ausgehend. Zu beachten sind die membranvesikelartigen Strukturen auf dem Filipodium und in dessen unmittelbarer Nachbarschaft. Die Ausschnittsvergrößerung ist in orange dargestellt.

C: Feste Adhäsion des Neutrophilen und Filipodien-Interaktion mit den PBCEC.

Inkubationsmedium: Chemisch definiertes Medium (CDM) mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Die Fixierung der mit den Neutrophilen interagierenden PBCEC erfolgte am 7. DIV.

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht in Abbildung A 5 µm und in Abbildung B und C 15 µm.

Interessanterweise wurde nicht nur die strukturelle Oberflächen-Beschaffenheit der Neutrophilen-Zellmembran durch die Interaktion mit den PBCEC beeinflusst, sondern auch die Zelloberfläche der Endothelzellen. Die Abbildungen 3.74 A und B zeigen die von einem Neutrophilen ausgehenden Filipodien, die mit der PBCEC-Zelloberfläche interagieren. Interessanterweise befanden sich auf den Filipodien, sowie in unmittelbarer Nachbarschaft zu diesen auf der Endothelzell-Oberfläche zahlreiche membranvesikelartigen Strukturen.

In Abbildung 3.76 sind nochmals im Detail die *marginal folds* und die Endothelzell-Oberflächenstrukturen der mit TNF- α entzündungsaktivierten im Vergleich zu den nicht stimulierten PBCEC, sowie der Endothelzellen während der Interaktion mit den Neutrophilen dargestellt. Die REM-Bilder belegen, dass die nicht entzündungsstimulierten PBCEC, keine Mikrovilli auf ihrer Oberfläche ausbildeten. Dagegen wurden

nach der Inkubation der PBCEC mit TNF- α Mikrovilli-Strukturen auf der Endothelzell-Oberfläche observiert, die eindeutig der Endothelzell-Oberfläche Endothelzellen entstammten (s. Abb. 3.76 C und E, Pfeil). Die *marginal folds* der PBCEC wiesen sowohl unter entzündlichen als auch nicht entzündlichen Bedingungen eine schlauchförmige Struktur auf (s. Abb. 3.76 A und B), die erst nach Kontakt mit den Neutrophilen vesikelförmig umstrukturiert wurden. Die membranvesikelartigen Strukturen waren zudem nach der Neutrophilen-Interaktion auf der gesamten Endothelzell-Oberfläche zu beobachten (s. Abb. 3.76 D). Inwieweit die Vesikel von den Neutrophilen und/oder von den Endothelzellen stammten, konnte anhand der REM-Aufnahmen allerdings nicht eindeutig belegt werden.

Interessanterweise zeigten die REM-Aufnahmen der Neutrophilen-Endothelzell-Interaktion eine Verschmelzungen der PBCEC-Zellgrenzen benachbarter Endothelzellen (s. Abb. 3.75 A und B). Die REM-Aufnahme der Abbildung 3.75 B demonstriert nochmals eindeutig, dass durch die Neutrophilen-Transmigration der PBCEC-Monolayer nicht geschädigt wurde (s. Pfeil).

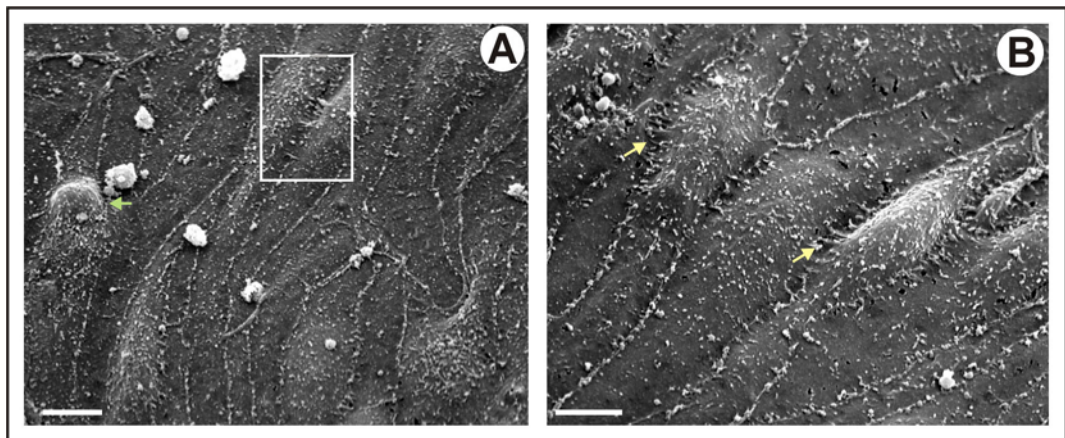


Abb. 3.75 A und B:

Elektronenmikroskopische Darstellung der Zellgrenzen des aktivierten PBCEC-Monolayers während der Neutrophilen-Interaktion.

Dargestellt sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des PBCEC-Monolayers unterschiedlicher Präparationen. Die Aufnahmen zeigen die Verschmelzung der Zellgrenzen zwischen benachbarten Endothelzellen während der Neutrophilen-Endothelzell-Interaktion.

Inkubationsmedium: Chemisch definiertes Medium (CDM) mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Die Entzündungsaktivierung der PBCEC erfolgte 4 h vor der Neutrophilen-Zugabe durch 2 ng/ml TNF- α . Inkubationsdauer der Neutrophilen mit den Endothelzellen: 2 h.

Die Pfeile in den Abbildungen verdeutlichen die Kontaktbereiche zweier benachbarter Endothelzellen.

Vergrößerung: der Maßstabsbalken (1 cm) entspricht in Abbildung A 15 μ m und in Abbildung B 5 μ m.

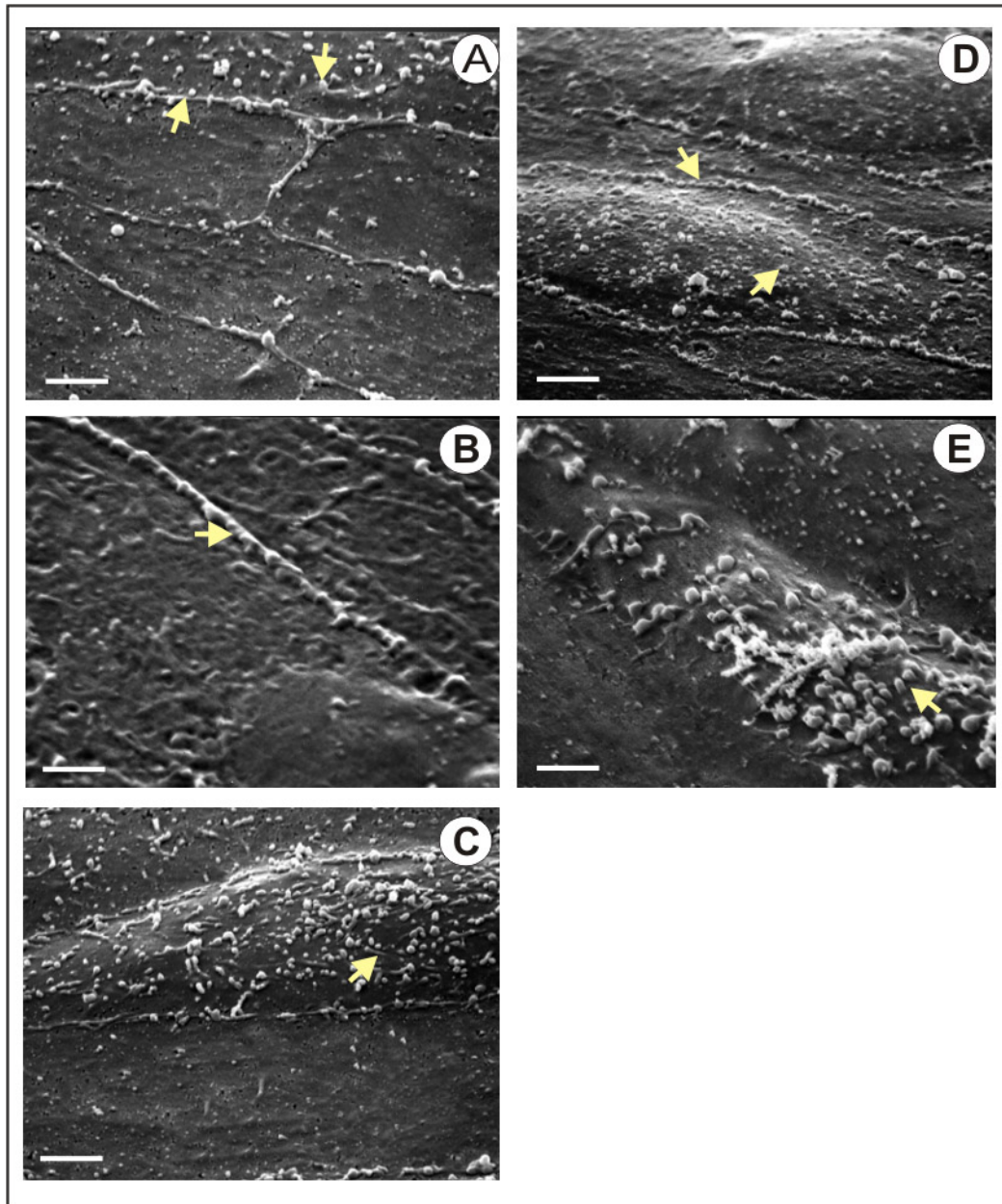


Abb. 3.76 A-E:

REM-Analyse der PBCEC-Zellgrenzen und der Endothelzell-Oberflächenstruktur.

Dargestellt sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des PBCEC-Monolayers unterschiedlicher Präparationen. Die Aufnahmen zeigen die Endothelzellgrenzen und die Endothelzell-Oberfläche der entzündungsaktivierten und nicht aktivierten PBCEC, die mit den Neutrophilen interagierten bzw. nicht.

A: PBCEC nicht entzündungsaktiviert, ohne Kontakt mit den Neutrophilen.

B u. C: PBCEC entzündungsaktiviert, ohne Neutrophilen-Kontakt

D u. E: PBCEC entzündungsaktiviert, nach Kontakt mit den Neutrophilen.

Inkubationsmedium: Chemisch definiertes Medium (CDM) mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Die Entzündungsaktivierung der PBCEC erfolgte 4 h vor der Neutrophilen-Zugabe durch 2 ng/ml TNF- α . Inkubationsdauer der Neutrophilen mit den Endothelzellen: 2 h. Die Fixierung der PBCEC erfolgte am 7. DIV. Die Pfeile in den Abbildungen verdeutlichen die marginal folds und die Oberflächen-Strukturen der PBCEC.

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht in Abbildung A u. E 1,5 μ m und in Abbildung B-D 2 μ m.

3.2.2.3 Der Einfluss des Neutrophilen-konditionierten Mediums

In den bisher aufgeführten Untersuchungen der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion wurde der Effekt der von den Neutrophilen ins Medium sezernierten Substanzen (Neutrophilen-konditioniertes Medium: NkCDM) nicht berücksichtigt. Somit war es nicht möglich nachzuweisen, ob die bisher dargestellten Befunde der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion durch die Neutrophilen allein und/oder durch die von ihnen ins Kulturmedium sezernierten Substanzen stammten. Da dies ein sehr wichtiger Aspekt zur Charakterisierung der Neutrophilen-Transmigration war, wurde der Effekt des NkCDMs auf die PBCEC in An- und Abwesenheit der Neutrophilen sowohl impedanzspektroskopisch als auch immunzytochemisch und elektronenmikroskopisch untersucht. Weiterhin wurde die Matrixmetalloproteasen (MMP)-Zusammensetzung des NkCDMs und des konditionierten Mediums der Neutrophilen und der PBCEC während ihrer Interaktion zymographisch analysiert. Den MMPs wird bei der Leukozyten-Transmigration eine große Rolle zugesprochen (Kubes & Ward, 2000). Die Untersuchungen des Einflusses des NkCDMs auf die PBCEC ermöglichten es, den Effekt der Neutrophilen und ihres NkCDMs differenziert zu analysieren.

In Abbildung 3.77 dargestellt, ist die Matrixmetalloproteasen-Sekretion des NkCDMs vor Zugabe zu den PBCEC. Wie die Abbildung 3.77 zeigt, wurde von den neutrophilen Granulozyten hauptsächlich MMP-9 in hoher Konzentration ins Medium sezerniert. Die Analyse des NkCDMs, das 3, 6 und 10 Stunden von den Neutrophilen konditioniert wurde, wies ein identisches Muster der MMP-9-Sekretion auf (vergl. Spur 2, 4 und 5 in Abb. 3.77). MMP-2 wurde ebenfalls von den Neutrophilen ins Medium sezerniert, allerdings in sehr geringer Konzentration. Dagegen wies das nur 4-minütige NkCDM eine wesentlich geringere Menge der MMP-9 auf und zeigte keine MMP-2-Sekretion (s. Abb. 3.77, Spur 1). Das Neutrophilen-konditionierte frische CDM (NfCDM), das nach dem Waschvorgang der Neutrophilen erneut 16 Stunden von den Leukozyten konditioniert wurde, zeigte eine fast identische MMP-9-Produktion wie das 4-minütige NkCDM (vergl. Spur 1 und 3 in Abb. 3.77).

Die MMP-Sekretion der Neutrophilen

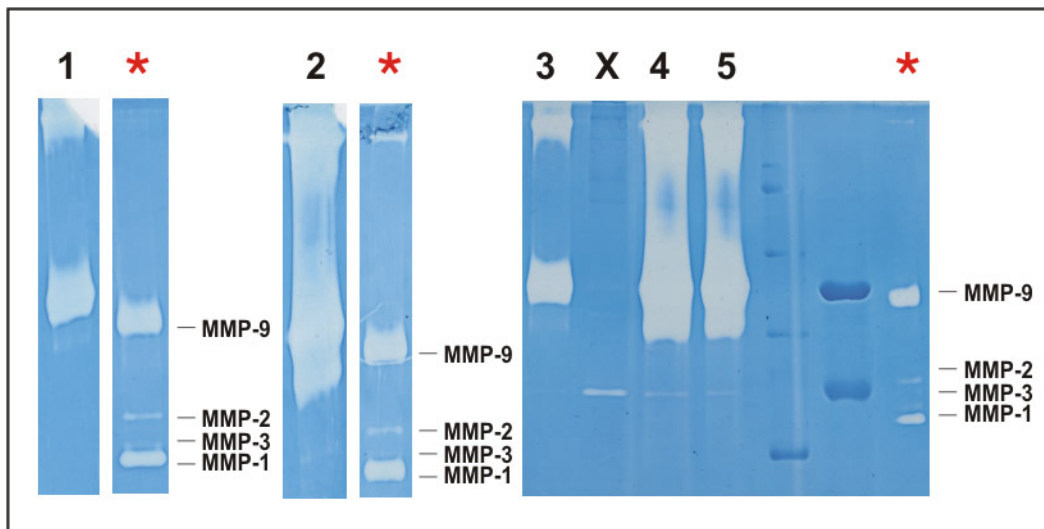


Abb. 3.77:

Zymographische Analyse der MMP-Sekretion der Neutrophilen.

Dargestellt ist die Matrixmetalloproteasen (MMP)–Sekretion der neutrophilen Granulozyten in ihr umgebendes Medium.

- 1: NkCDM, das 4 min von den Neutrophilen konditioniert wurde.
- 2: NkCDM, das 3 h von den Neutrophilen konditioniert wurde.
- 3: NfkCDM, das nach Waschen von den Neutrophilen erneut 16 h konditioniert wurde.
- 4: NkCDM, das 10 h von den Neutrophilen konditioniert wurde.
- 5: NkCDM, das 6 h von den Neutrophilen konditioniert wurde.
- X: PBCEC-konditioniertes CDM.

Die Konditionierung des CDMs durch die Neutrophilen erfolgte am Tag ihrer Präparation. Inkubation der frisch isolierten neutrophilen Granulozyten in chemisch definierten Medium. Neutrophile/ml: 80-100 Millionen. Probenvolumen/Tasche: 5 μ l + 5 μ l Probenpuffer. Chemisch definiertes Medium (CDM), Neutrophilen konditioniertes Medium (NkCDM), CDM, das von den Neutrophilen erneut konditioniert wurde, nachdem sie gewaschen wurden (NfkCDM),

* MMP-Control (Fa. Sigma).

Die PBCEC sezernierten im Gegensatz zu den Neutrophilen kein MMP-9 in ihr umgebendes CDM (s. Abb. 3.77, Spur X). Die nachgewiesene MMP-2-Bande stammte von den präparationsbedingten geringfügigen Serumrückständen im CDM der PBCEC.

Die in der Abbildung 3.77 dargestellte massive MMP-Sekretion der neutrophilen Granulozyten in ihr umgebendes Medium verdeutlichte die Notwendigkeit, die Auswirkung des NkCDMs auf die PBCEC in die Transmigrationsstudien mit einzubeziehen.

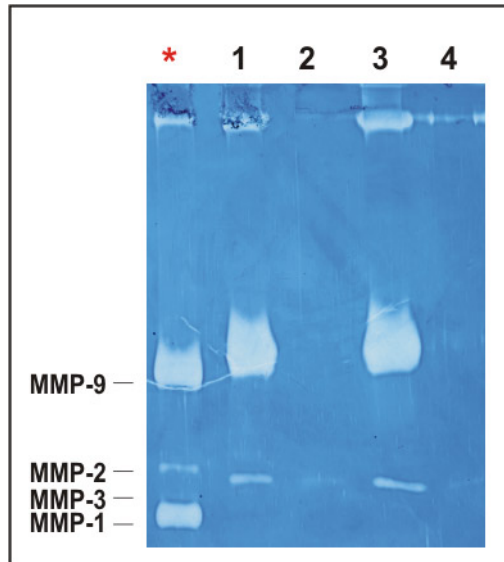


Abb.:3.78:

Die MMP-Sekretion während der PBCEC-NkCDM-Interaktion.

Dargestellt ist die Matrixmetalloproteasen (MMP)-Sekretion des PBCEC-konditionierten Mediums während der Interaktion des 3hNkCDMs mit den Endothelzellen.

- 1: PBCEC-konditioniertes CDM nach 6-stündiger Inkubation mit dem 3hNkCDM von der apikalen Filterseite, Probenentnahme aus der apikalen Filterkammer.
- 2: PBCEC-konditioniertes CDM nach 6-stündiger Inkubation mit dem 3hNkCDM von der apikalen Filterseite, Probenentnahme aus der basolateralen Filterkammer.
- 3: PBCEC-konditioniertes CDM nach 6-stündiger Inkubation mit dem 3hNkCDM von der apikalen Filterseite, PBCEC entzündungsaktiviert mit 2 ng/ml TNF- α von der apikalen Zellseite, Probenentnahme aus der apikalen Filterkammer.
- 4: PBCEC-konditioniertes CDM nach 6-stündiger Inkubation mit dem 3hNkCDM von der apikalen Filterseite, PBCEC entzündungsaktiviert mit 2 ng/ml TNF- α von der apikalen Zellseite, Probenentnahme aus der basolateralen Filterkammer.

Inkubation der frisch isolierten neutrophilen Granulozyten in chemisch definiertem Medium (CDM) ohne Zusatz von Hydrokortison. Die Entzündungsaktivierung mit 2 ng/ml TNF- α erfolgte über einen Zeitraum von 4 h. Die Inkubation der PBCEC mit dem NkCDM und die Probenentnahme erfolgte am 7 DIV der PBCEC.

Anzahl der Neutrophilen, die das CDM konditionierten: 80-100 Millionen/ ml CDM. Probenvolumen/Tasche: 5 μ l + 5 μ l Probenpuffer. Chemisch definiertes Medium (CDM), Neutrophilen konditioniertes Medium (NkCDM), NkCDM, das 3 h von den Neutrophilen konditioniert wurde (3hNkCDM),

* MMP-Control (Fa. Sigma).

Um die ausschließliche Auswirkung der Immunzellen auf die PBCEC deuten zu können, war es wichtig zunächst den Einfluss des NkCDMs in Abwesenheit der Neutrophilen auf die PBCEC zu analysieren.

Die Abbildung 3.78 zeigt, dass die Inkubation des 3hNkCDM (3 Stunden von den Neutrophilen konditioniertes CDM) mit den PBCEC die typische MMP-9-Sekretion aufwies, die das NkCDM schon vor der Endothelzell-NkCDM-Interaktion zeigte (vergl. Abb. 3.77). Das Medium, dass aus der basolateralen Filterkammer während der Endothelzell-NkCDM-Interaktion im apikalen Filterkompartiment entnommen wurde, wies keine MMPs auf. Die Entzündungsaktivierung der PBCEC mit TNF- α vor Zugabe des NkCDMs zeigte dabei keinen Effekt.

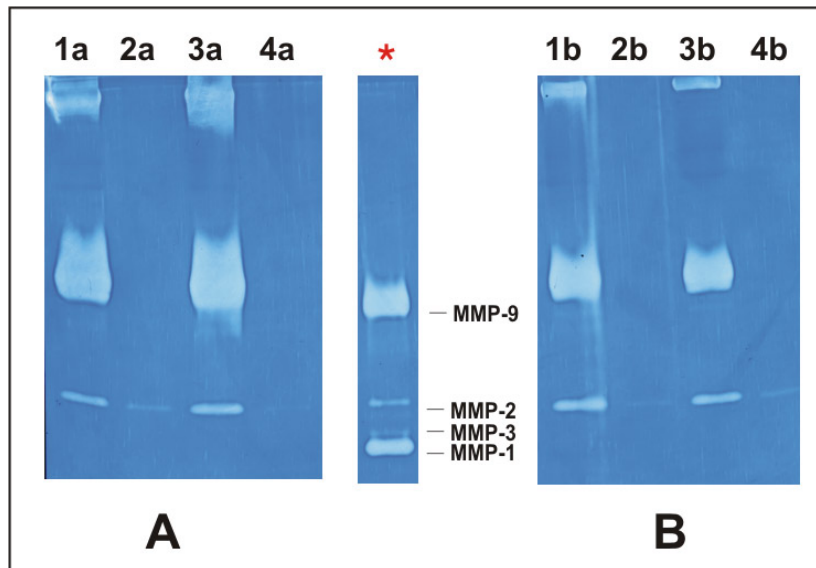


Abb. 3.79 A und B:

MMP--Nachweis des-konditionierten Mediums während der PBCEC-Neutrophilen-Interaktion.

Dargestellt sind die Matrixmetalloproteasen (MMPs) des PBCEC-konditionierten Mediums während der Interaktion mit Neutrophilen, die resuspendiert in ihrem konditioniertem Medium zu den Endothelzellen appliziert wurden (A) bzw. vor ihrer Zugabe in frischem CDM resuspendiert wurden (B).

A: Zugabe der Neutrophilen zu den PBCEC resuspendiert in ihrem NkCDM.

- 1a:** PBCEC-konditioniertes CDM nach 6-stündiger Interaktion mit Neutrophilen, die resuspendiert in ihrem 3hNKCDM zu den Endothelzellen appliziert wurden. Probenentnahme aus der apikalen Filterkammer.
- 2a:** PBCEC-konditioniertes CDM nach 6-stündiger Interaktion mit Neutrophilen, die resuspendiert in ihrem 3hNKCDM zu den Endothelzellen appliziert wurden. Probenentnahme aus der basolateralen Filterkammer.
- 3a:** PBCEC-konditioniertes CDM nach 6-stündiger Interaktion mit Neutrophilen, die resuspendiert in ihrem 3hNKCDM zu den Endothelzellen appliziert wurden. Entzündungsaktivierung der PBCEC mit 2 ng/ml TNF- α . Probenentnahme aus der apikalen Filterkammer.
- 4a:** PBCEC-konditioniertes CDM nach 6-stündiger Interaktion mit Neutrophilen, die resuspendiert in ihrem 3hNKCDM zu den Endothelzellen appliziert wurden. Entzündungsaktivierung der PBCEC mit 2 ng/ml TNF- α . Probenentnahme aus der basolateralen Filterkammer.

B: Zugabe der in frischem CDM resuspendierten Neutrophilen zu den PBCEC.

- 1b:** PBCEC-konditioniertes CDM nach 6-stündiger Interaktion mit Neutrophilen, die in frischem CDM zu den Endothelzellen appliziert wurden. Probenentnahme aus der apikalen Filterkammer.
- 2b:** PBCEC-konditioniertes CDM nach 6-stündiger Interaktion mit Neutrophilen, die resuspendiert in frischem CDM zu den Endothelzellen appliziert wurden. Probenentnahme aus der basolateralen Filterkammer.
- 3b:** PBCEC-konditioniertes CDM nach 6-stündiger Interaktion mit Neutrophilen, die resuspendiert in frischem CDM zu den Endothelzellen appliziert wurden. Entzündungsaktivierung der PBCEC mit 2 ng/ml TNF- α . Probenentnahme aus der apikalen Filterkammer.
- 4b:** PBCEC-konditioniertes CDM nach 6-stündiger Interaktion mit Neutrophilen, die resuspendiert in frischem CDM zu den Endothelzellen appliziert wurden. Entzündungsaktivierung der PBCEC mit 2 ng/ml TNF- α . Probenentnahme aus der basolateralen Filterkammer.

Die Inkubation der frisch isolierten neutrophilen Granulozyten erfolgte in CDM ohne Zusatz von Hydrokortison. Die Entzündungsaktivierung mit 2 ng/ml TNF- α erfolgte über einen Zeitraum von 4 h. Die Probenentnahme der konditionierten Medien erfolgte am 7. DIV. der PBCEC. Neutrophile/ml: 80-100 Millionen. Probenvolumen/Tasche: 5 μ l + 5 μ l Probenpuffer. Chemisch definiertes Medium (CDM), Neutrophilen konditioniertes Medium (NkCDM),

* MMP-Control (Fa. Sigma).

Die MMP-Sekretion der PBCEC, kultiviert auf Transwell®-Filtern, wurde zunächst vor der Zugabe der neutrophilen Granulozyten analysiert. Wie bereits in Kapitel 3.1.3 dargestellt, wurden zunächst die Überstände aus der apikalen bzw. basolateralen Filterkammer der nicht aktivierten PBCEC im Vergleich mit den 2 ng/ml TNF- α aktivierten Endothelzellen untersucht. In Abwesenheit der Neutrophilen konnte die MMP-9 unabhängig von der Entzündungsstimulierung der PBCEC weder im apikalen noch im basolateralen Filterkompartiment nachgewiesen werden. Die MMP-2 stammte von dem vorhandenen Restserumgehalt (s. Kapitel 3.1.3, Abb. 3.45).

Wie die Abbildung 3.79 B zeigt, wurde nach einer 6-stündigen Interaktion der PBCEC mit den Neutrophilen, die vor ihrer Zugabe zu den Endothelzellen gewaschen und in frischem CDM aufgenommen wurden, die Neutrophilen-typische MMP-9 im PBCEC-Medium der apikalen Filterkammer nachgewiesen. Die Menge der MMP-9 war dabei, unabhängig von der Entzündungsaktivierung mit TNF- α , identisch mit derjenigen des 4minNkCDMs und des 16hNkCDMs (vergl. Abb. 3.77). Das Medium der basolateralen Filterkammer der PBCEC wies nach der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion keine MMPs auf.

Die Inkubation der Neutrophilen, die zusammen mit ihrem NkCDM zu den Endothelzellen gegeben wurden, zeigten während ihrer Interaktion mit den PBCEC eine im Vergleich zur Interaktion der PBCEC mit Neutrophilen, die vor ihrer Applikation zu den Endothelzellen gewaschen und in frischem CDM aufgenommen wurden, eine wesentlich stärkere MMP-9-Sekretion (vergl. Abb. 3.79 A und B). Auch hier war die Entzündungsaktivierung der PBCEC durch TNF α unerheblich. Das Medium, das während der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion aus dem basolateralen Filterkompartiment entnommen wurde, wies keine MMPs auf (vergl. Spur 2a und 4° in Abb. 3.79 A).

Der Einfluss des NkCDMs auf die PBCEC-Morphologie

Parallel zu den zymographischen Untersuchungen wurden REM-Analysen durchgeführt, die Aufschluss darüber geben sollten, inwiefern das NkCDM die Ausprägung der Endothelzellgrenzen morphologisch beeinflusste.

Wie die Abbildungen 3.80 A und C veranschaulichen, wurden die schlauchförmigen *marginal folds* durch die Inkubation der PBCEC mit dem NkCDM strukturell nicht verändert. Im Gegensatz dazu zeigten die PBCEC, die mit Neutrophilen in NfkCDM inkubiert wurden die spezifischen Membranvesikelartigen-Strukturen-artigen Ausprägung der *marginal folds* (s. Abb. 3.80 B).

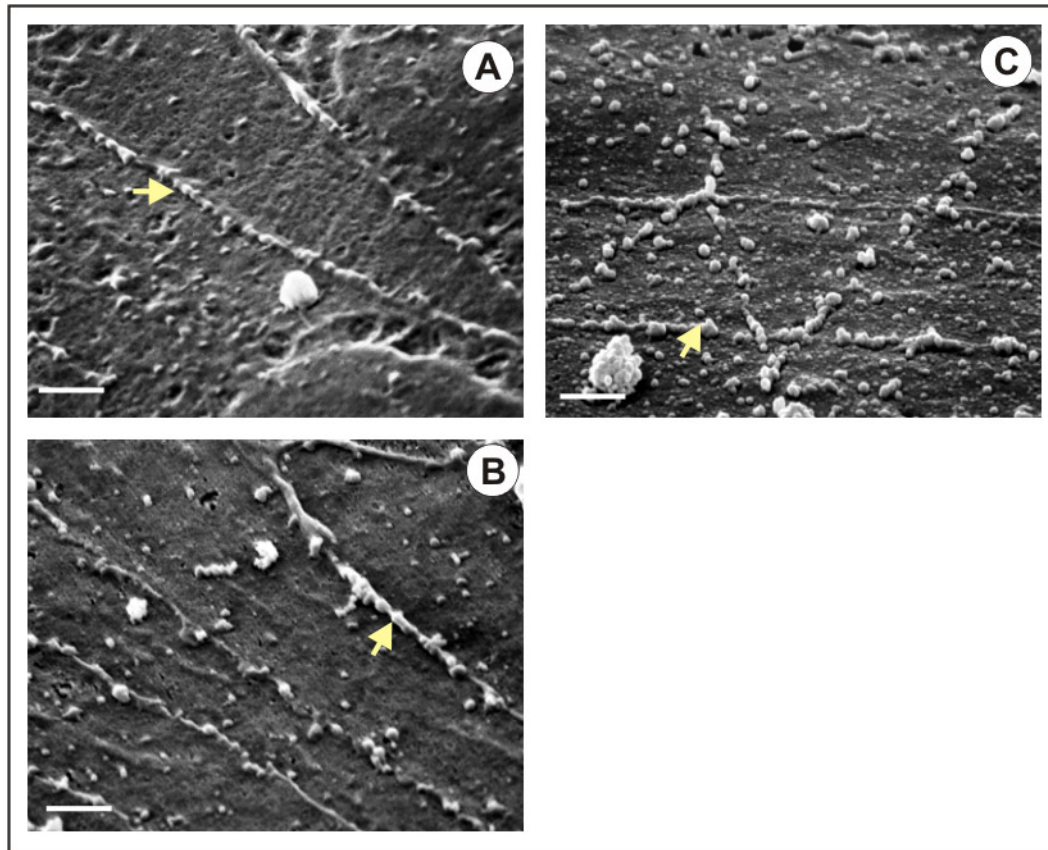


Abb. 3.80 A-C:

Vergleichende REM-Untersuchungen der PBCEC-NkCDM und PBCEC-Neutrophilen-Interaktion.

A: PBCEC ohne Neutrophilen- bzw. NkCDM-Kontakt.

B: 2-stündige Inkubation der PBCEC mit dem 9hNkCDM (50 μ l/ apikale Filterseite).

C: 2-stündige Inkubation der PBCEC mit Neutrophilen in NfkCDM, (E/L-Ratio: 1:20).

Die Analyse erfolgte am 7 DIV. Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium (CDM) mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison, PBCEC nicht entzündungsaktiviert. Die Pfeile in den Abbildungen verdeutlichen die Zellgrenzen

Chemisch definiertes Medium (CDM), Neutrophilen konditioniertes CDM (NkCDM), NkCDM das von den Neutrophilen 9 h konditioniert wurde, bevor es zu den PBCEC appliziert wurde (9hNkCDM), Neutrophile die vor ihrer Zugabe zu den PBCEC in frischem CDM suspendiert wurden (NfkCDM)

Vergrößerung: der Balken im unteren linken Bildausschnitt entspricht 0,5 μ m.

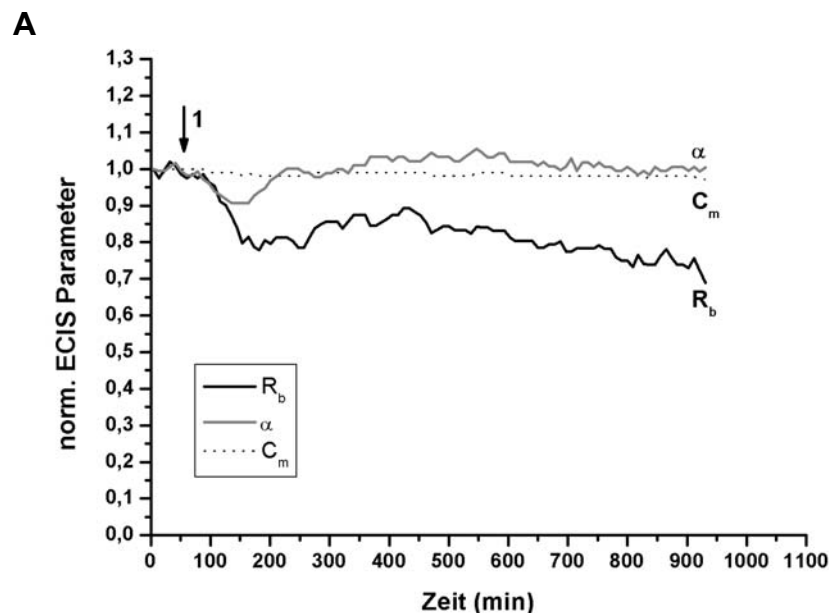
Der Einfluss des NkCDMs auf die Barrierefunktion der PBCEC

Um den Einfluss des NkCDMs auf die Barrierefunktion der PBCEC zu untersuchen, wurden korrelierend zu den morphologischen Untersuchungen ECIS-Analysen und TER-Filtermessungen durchgeführt. Die Abbildungen 3.81 und 3.82 zeigen einen Vergleich des NkCDMs zweier unterschiedlicher Neutrophilen-Präparationen. Die TER-Messung, dargestellt in Abbildung 3.83 zeigt im Gegensatz zur ECIS-Messung, dass die Zugabe der NkCDMs unterschiedlicher Neutrophilen-Präparationen zu keiner Senkung des TERs führte. Dagegen zeigte die ECIS-Messung, dass durch das NkCDM eine geringfügige Senkung der Werte für R_b und α verursacht wurde (s. Abb.3.81 A und B). Das Maß der Reduzierung der Teilwiderstände des Zell-Zell- (R_b)

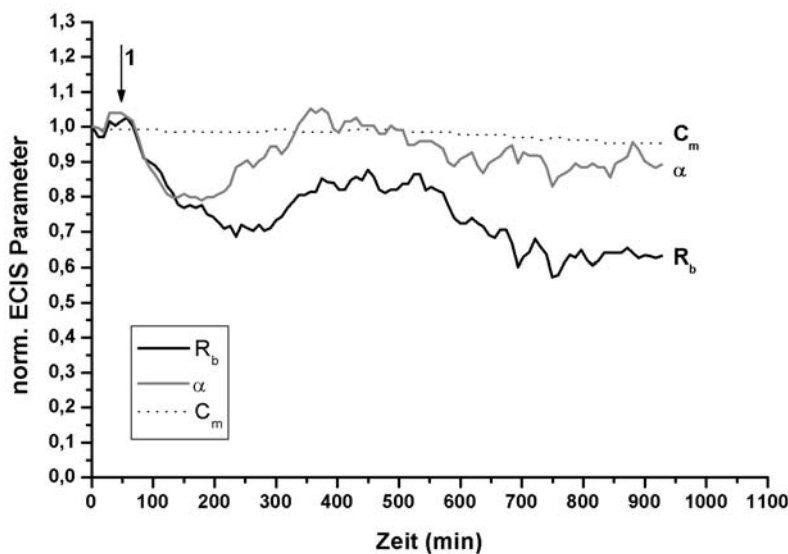
und des Zell-Matrix-Kontakts (α) der PBCEC durch die NkCDM-Applikation unterschied sich zwischen den verschiedenen Neutrophilen-Präparationen. So wurde der Wert von R_b des NkCDMs der Präparation A nur um 20 % gesenkt und erreichte nach ca. 3 Stunden wieder annähernd seinen Ausgangswert (s. Abb. 3.81 A). Der Zell-Substrat-Kontakt wurde im Vergleich nur sehr geringfügig und reversibel geschwächt. In der Regenerationsphase war ein primärer Anstieg des Wertes für α im Vergleich zu R_b zu beobachten.

Das NkCDM der Präparation B übte dagegen einen deutlich stärkeren Einfluss auf die Parameter R_b und α der PBCEC aus. Ihre Schwächung war aber dennoch annähernd reversibel (s. Abb. 3.81 B). Die Werte der beiden Parameter wurden zeitgleich gesenkt, wobei α wiederum im Vergleich zu R_b schneller regenerierte.

Wie aus der Abbildungen 3.81 ersichtlich wird, ergaben sich zwischen den konditionierten Medien der verschiedenen Neutrophilen-Präparationen Differenzen, die die Notwendigkeit unterstrichen, in den Untersuchungen der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion jeweils den Einfluss der Neutrophilen in ihrem NkCDM und derjenigen resuspendiert in frischem CDM auf die PBCEC zu vergleichen. Nur so war es möglich den alleinigen Effekt der Neutrophilen auf die Barrierefunktion der PBCEC differenziert zu analysieren und die Befunde der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion zu standardisieren.



B



C

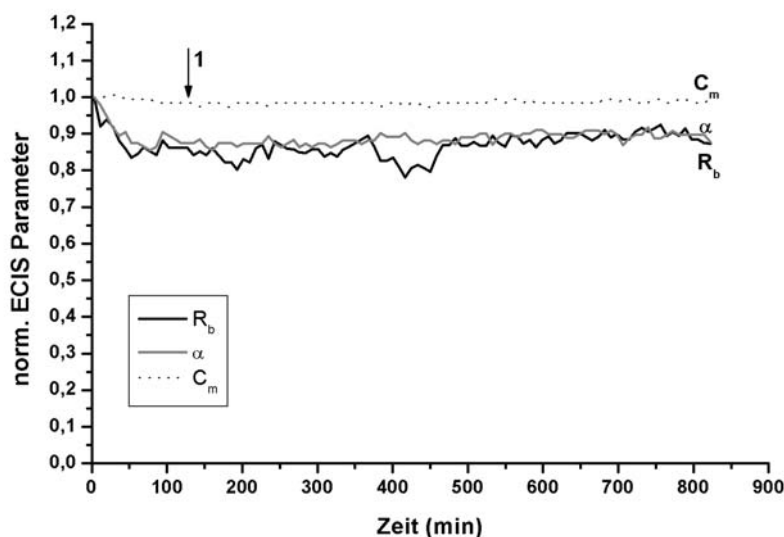


Abb. 3.81 A-C:

Der Einfluss des NkCDMs auf die Barrierefunktion der PBCEC unterschiedlicher Präparationen.

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Werte des Zell-Zell-Kontakts (R_b), der Membrankapazität (C_m) und des Zell-Substrat-Kontakts (α) nach der Zugabe des NkCDMs unterschiedlicher PBCEC-Präparationen.

A: Zugabe von 300 μ l ihres 9hNkCDM (Präparation A) (1) .

B: Zugabe von 300 μ l ihres 9hNkCDM (Präparation B) (1) .

C: Zugabe von 300 μ l CDM (1).

Die Messung erfolgte am 7. DIV. Inkubationsmedium der Neutrophilen: CDM. Neutrophilenanzahl zur Konditionierung des CDMs: 80-100 Millionen Neutrophile /ml CDM. Der eingekreiste mit 1 versehene Pfeile markiert die Zugabe des NkCDMs bzw. des CDMs. Chemisch definiertes Medium (CDM), Neutrophilen konditioniertes Medium (NkCDM), NkCDM das 9 h von den Neutrophilen konditioniert wurde (9hNkCDM).

$R_b(0) = 72 \Omega \times \text{cm}^2$ (A), $188 \Omega \times \text{cm}^2$ (B), $85 \Omega \times \text{cm}^2$ (C); $\alpha(0) = 35 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ (A), $41 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ (B), $49 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ (C) und $C_m(0) = 2,06 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (A), $1,31 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (B), $1,88$ (C) geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$, $\alpha(0)$ und $C_m(0)$ normiert.

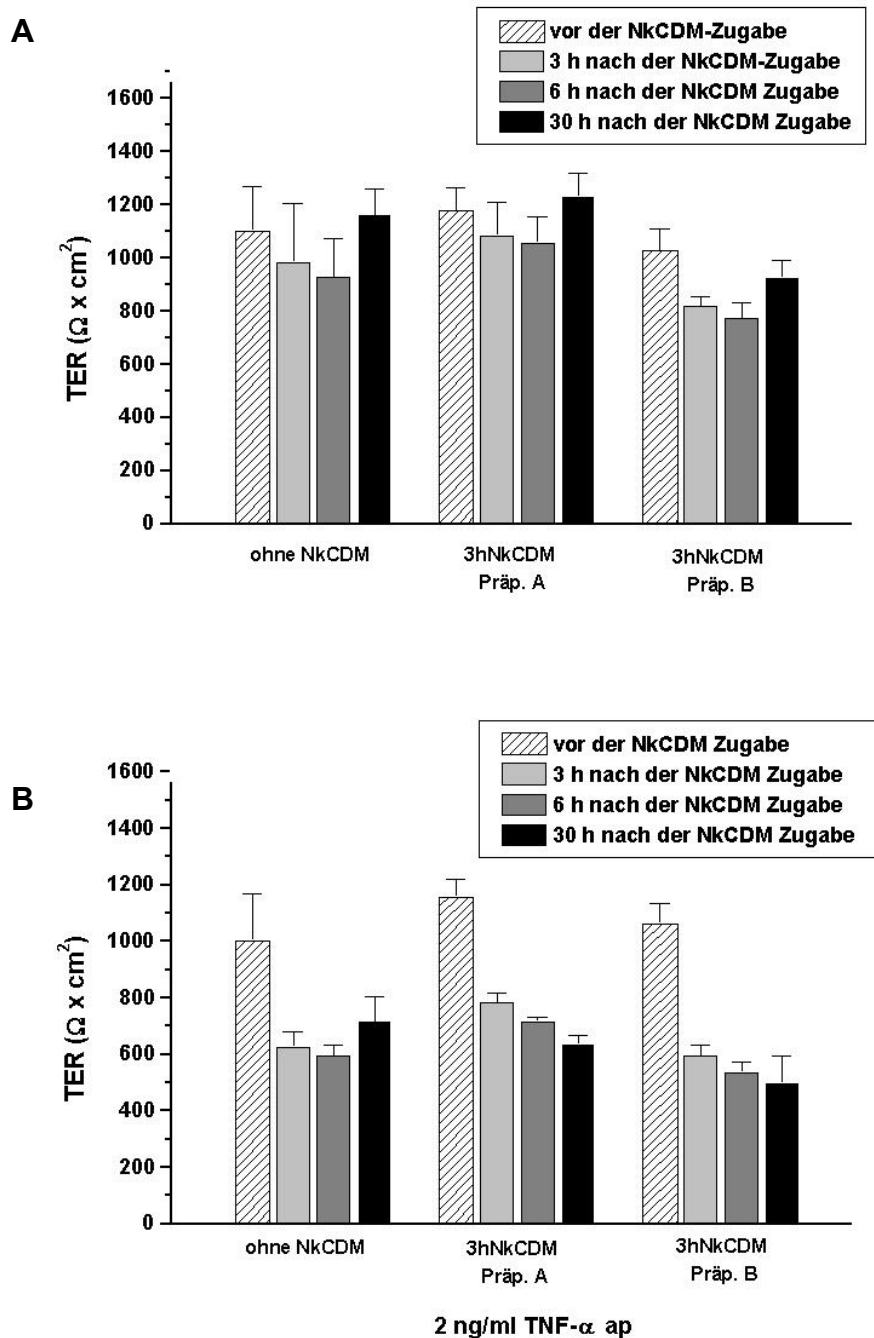


Abb. 3.82 A und B:

Einfluss des NkCDMs unterschiedlicher Neutrophilen-Präparationen auf den TER der PBCEC.

A: Einfluss des NkCDMs auf den TER der nicht entzündungsaktivierten PBCEC.

B: Einfluss des NkCDMs auf den TER der entzündungsaktivierten PBCEC.

Die TER-Messung erfolgte am 7. DIV. Inkubationsmedium der Neutrophilen: Chemisch definiertes Medium (CDM). Neutrophilenanzahl zur Konditionierung des CDMs: 80-100 Millionen Neutrophile /ml CDM. Die Applikation von jeweils 50 μ l 3hNkCDM erfolgte in die apikale Filterkammer. Die Entzündungsaktivierung mit 2 ng/ml TNF- α erfolgte 4 h vor der Zugabe des NkCDMs. Chemisch definiertes Medium (CDM), Neutrophilen konditioniertes Medium (NkCDM), NkCDM das 3 h von den Neutrophilen konditioniert wurde (3hNkCDM).

Die TER-Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt (n = 6).

Wie in der Abbildung 3.83 zu sehen ist, war Konditionierungsdauer des NkCDMs bezüglich seines Einflusses auf den TER der PBCEC unerheblich. Die in der Zymographie in extrem hoher Konzentration nachgewiesene MMP-9 des 10hNkCDMs hatte in der vorliegenden Form somit nachweislich keine Auswirkung auf den TER der PBCEC.

Da die Zeitspanne nach dem Waschen der Neutrophilen und Resuspension in frischem CDM, bis zur Applikation der Leukozyten zu den PBCEC grundsätzlich einige Minuten in Anspruch nahm und somit immer eine Konditionierung des CDMs durch die Neutrophilen vorlag, war der Einfluss des 4minNkCDMs auf den TER der PBCEC, dargestellt in Abbildung 3.83 besonders interessant.

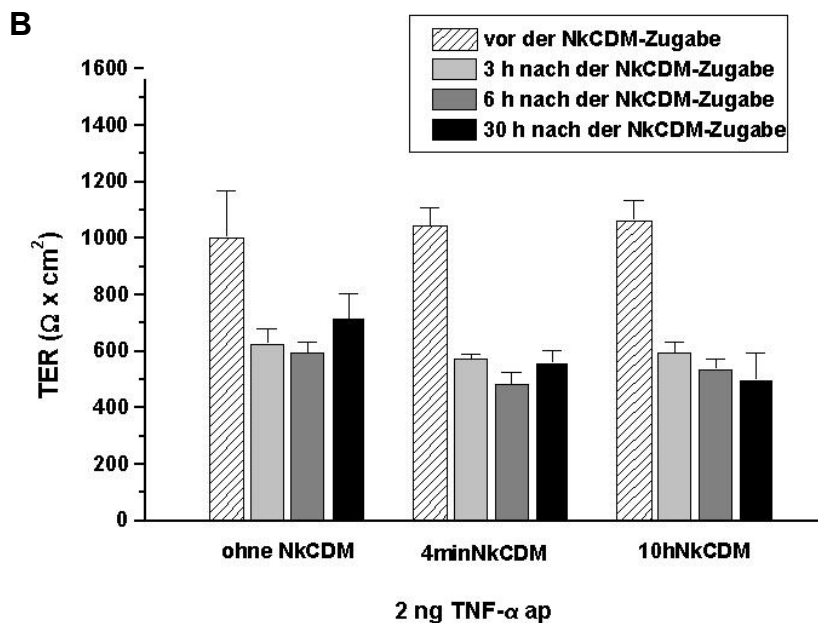
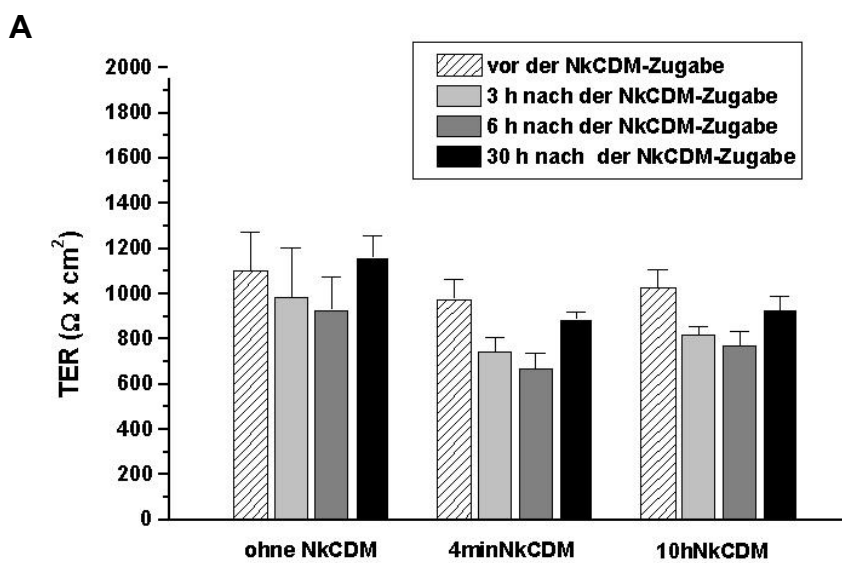


Abb. 3.83 A und B:

Einfluss des NkCDMs unterschiedlicher Konditionierungsdauer auf den TER der PBCEC.

A: Einfluss des 4min bzw. 10hNkCDMs auf den TER der nicht entzündungsaktivierten PBCEC.

B: Einfluss des 4min bzw. 10hNkCDMs auf den TER die entzündungsaktivierten PBCEC.

TER-Messung erfolgte am 7. DIV. Die Applikation von jeweils 50 μ l 3hNkCDM erfolgte in die apikale Filterkammer. Neutrophilenanzahl zur Konditionierung des CDMs: 80-100 Millionen Neutrophile/ml CDM.

Die Entzündungsaktivierung mit 2 ng/ml TNF- α erfolgte 4 h vor der Zugabe des NkCDMs. Inkubationsmedium der Neutrophilen: Chemisch definiertes Medium (CDM). Neutrophilen konditioniertes Medium (NkCDM), NkCDM das 4 min bzw. 10 h von den Neutrophilen konditioniert wurde (4minNkCDM, 10hNkCDM), apikales Filterkompartiment (ap).

Die TER-Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt (n = 6).

Um zusätzlich den basolateralen (Gehirn-seitigen) Effekt des NkCDMs auf die Barrierefunktion der PBCEC zu untersuchen, wurden TER-Filtermessungen durchgeführt, in denen das NkCDM u. a. in das basolaterale Filterkompartiment appliziert wurde. Diese Untersuchungen waren insofern relevant, als das auch *in vivo* die bereits in das ZNS eingedrungenen von den Neutrophilen sezernierten Substanzen, wie beispielsweise Cytokine, die Barrierefunktion der BHS beeinflussen können. Da zudem die in der Zymographie analysierten Medien, die während der NkCDM/Neutrophilen-PBCEC-Interaktion konditioniert wurden, den Transwell®-Filtersystem entnommen wurden, war eine direkte Korrelation der Ergebnisse der Zymographie mit den TER-Filtermessungen möglich.

Die in Abbildung 3.84 dargestellten TER-Messungen zeigen, dass das NkCDM unabhängig davon in welche Filterkammer es appliziert wurde, keinen signifikanten Einfluss auf die PBCEC-Barrierefunktion ausübte. Dabei war es unerheblich, ob die cerebralen Endothelzellen vor Zugabe des NkCDMs mit 2 ng/ml TNF- α entzündungsaktiviert wurden (s. Abb. 3.84).

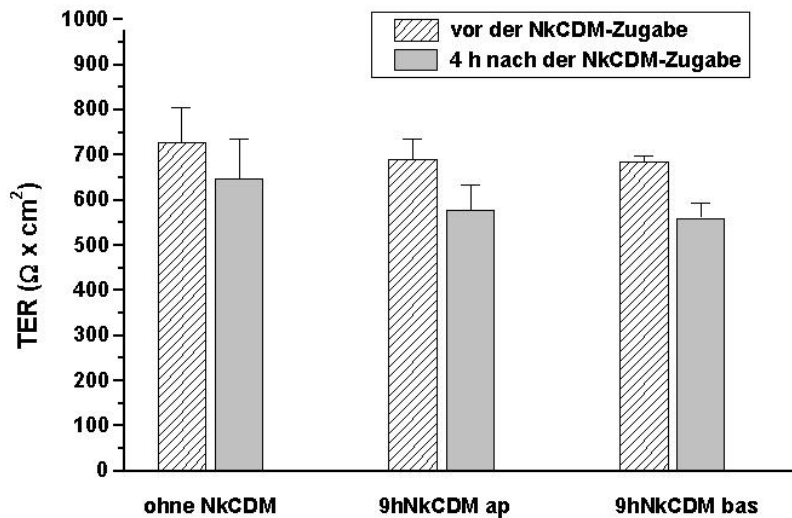


Abb. 3.84:

Der polare Einfluss des NkCDMs auf den TER der nicht aktivierten PBCEC.

Die TER-Messung erfolgte am 7. DIV, nach Applikation von jeweils 50 μ l 3hNkCDM in die apikale Filterkammer. Die Entzündungsaktivierung mit 2 ng/ml TNF- α erfolgte 4 h vor der Zugabe des NkCDMs. Neutrophilenanzahl zur Konditionierung des CDMs: 80-100 Millionen Neutrophile/ ml CDM.

Inkubationsmedium der Neutrophilen: chemisch definiertes Medium (CDM), Chemisch definiertes Medium (CDM). Neutrophilen konditioniertes Medium (NkCDM), NkCDM das 9 h von den Neutrophilen konditioniert wurde (9hNkCDM), apikales Filterkompartiment (ap), basolaterales Filterkompartiment (bas).

Die TER-Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt (n = 6).

Um zwischen der Auswirkung des NkCDMs und der Neutrophilen auf die PBCEC-Barierefunktion differenzieren zu können, wurden einerseits Neutrophile resuspendiert in frischem CDM und parallel dazu das 9hNkCDM derselbigen Neutrophilen zu den PBCEC appliziert und im ECIS-Experiment analysiert (s. Abb. 3.85). Wie die Abbildung 3.85 deutlich demonstriert, übte das NkCDM in Abwesenheit der Neutrophilen keinen Einfluss auf die Barierefunktion der PBCEC aus. Demgegenüber wurde durch die Zugabe der Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:30, resuspendiert in frischem CDM, der Wert des Parameters R_b signifikant und irreversibel gesenkt. Dieses Experiment zeigte deutlich, dass die interendothelialen Zell-Kontakte ausschließlich durch die Interaktion mit den neutrophilen Granulozyten beeinträchtigt wurden und nicht allein durch deren NkCDM.

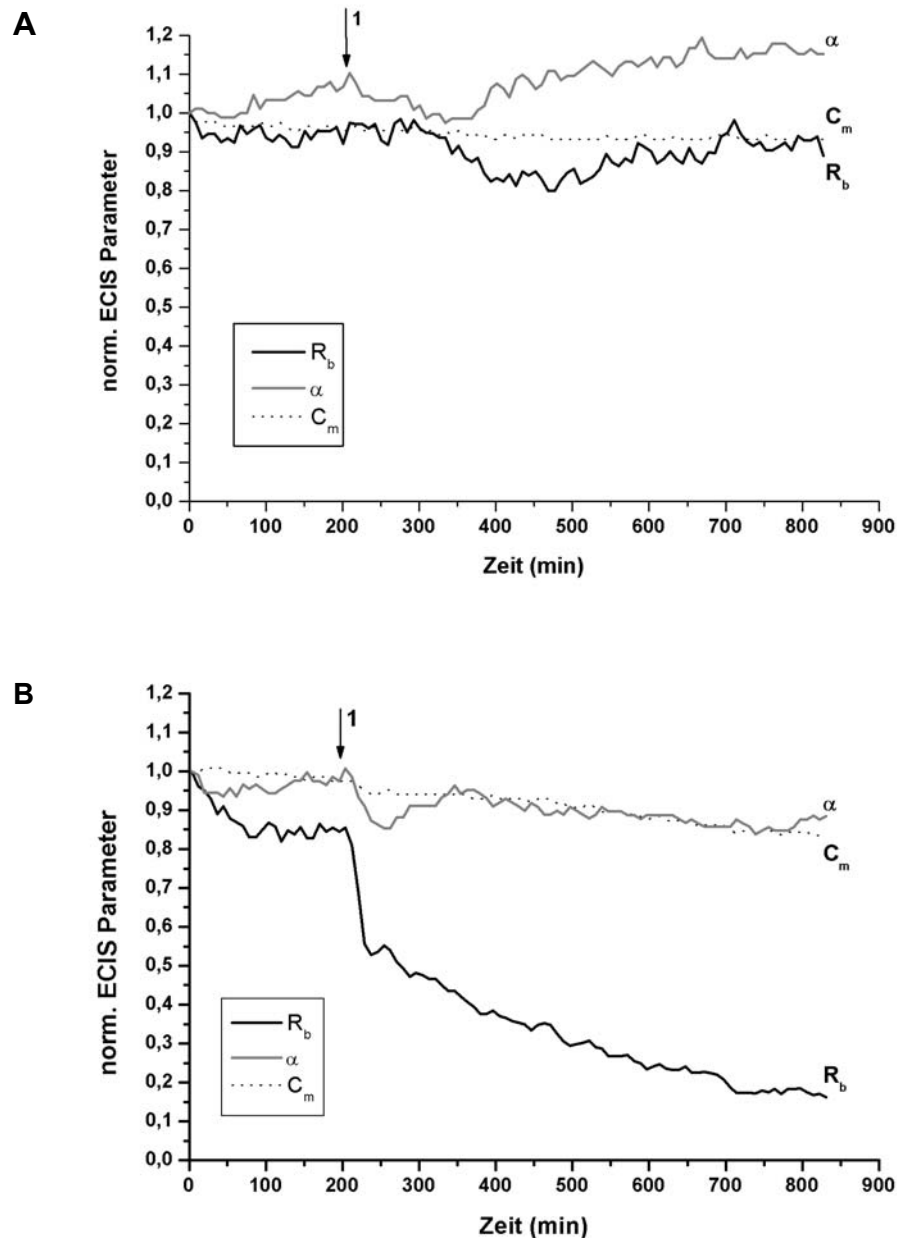


Abb. 3.85 A und B:

Der Einfluss der Neutrophilen resuspendiert in frischem CDM (E/L-Ratio: 1:30) im Vergleich zu ihrem NkCDM auf die Barrierefunktion der PBCEC.

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Werte des Zell-Zell-Kontakts (R_b), der Membrankapazität (C_m) und des Zell-Substrat-Kontakts (α) nach Zugabe von 30 Millionen neutrophilen Granulozyten bzw. deren konditioniertem CDM.

A: Zugabe von 600 μl 9hNkCDM (1).

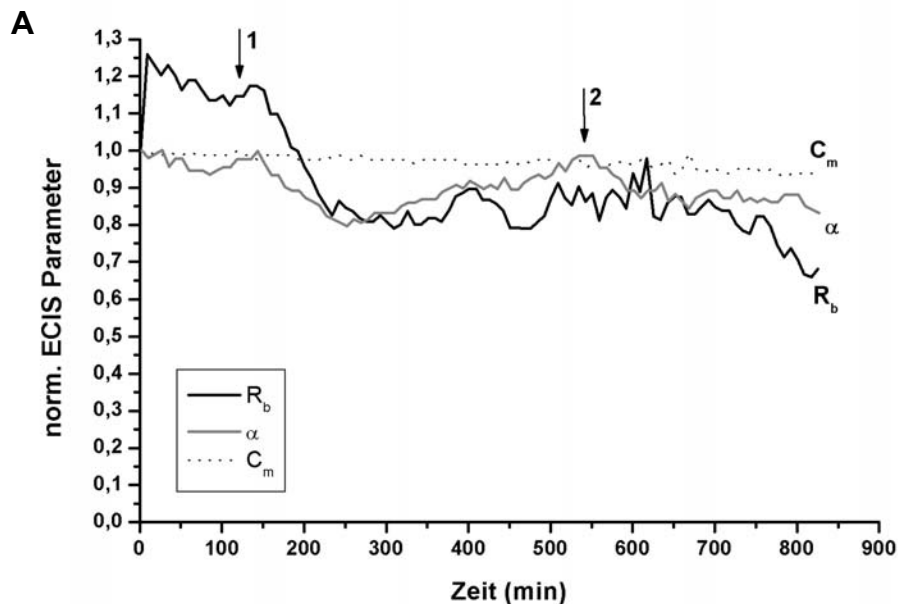
B: Zugabe von 30 Millionen Neutrophilen in 600 μl frischem CDM (1).

Die Messung erfolgte am 7. DIV. Inkubationsmedium der Neutrophilen: Chemisch definiertes Medium (CDM). Anzahl der Neutrophilen im konditionierten Medium: 80-100 Millionen. Der eingezeichnete mit 1 versehene Pfeile markiert die Zugabe des NkCDMs bzw. der Immunzellen. Neutrophilen-konditioniertes Medium (NkCDM).

$R_b(0) = 128 \Omega \times \text{cm}^2$ (A), $86 \Omega \times \text{cm}^2$ (B); $\alpha(0) = 50 \Omega^{0,5} \times \text{cm}$ (A), $37 \Omega^{0,5} \times \text{cm}$ (B) und $C_m(0) = 1,8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (A), $2,7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (B) geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$, $\alpha(0)$ und $C_m(0)$ normiert.

Inwieweit das NkCDM in Abhängigkeit von der EL-Ratio bei der durch die Neutrophilen-Zugabe verursachte Beeinträchtigung der Barrierefunktion der PBCEC, eine Rolle spielte, sollten die folgenden ECIS-Messungen zeigen. So wurden Neutrophile resuspendiert in ihrem NkCDM im Vergleich zu den Neutrophilen, die kurz vor der Zugabe zu den PBCEC in frischem CDM resuspendiert wurden zu den Endothelzellen appliziert.

Die ECIS-Messungen zeigten, dass korrelierend mit einer Erhöhung der Neutrophilenanzahl, unabhängig von der Anwesenheit des NkCDMs, die Beeinträchtigung der interendothelialen Zell-Kontakte und des Zell-Substrat-Kontakts der PBCEC zunahm (vergl. Kapitel 3.2.2.1, Abb. 3.61 bis 3.66). Sowohl die Applikation der Neutrophilen resuspendiert in ihrem NkCDM als auch im NfCDM, führte in Abhängigkeit von der Höhe der E/L-Ratio zu einer gesteigerten Schwächung des Zell-Zell- und des Zell-Substrat-Kontakts der PBCEC.



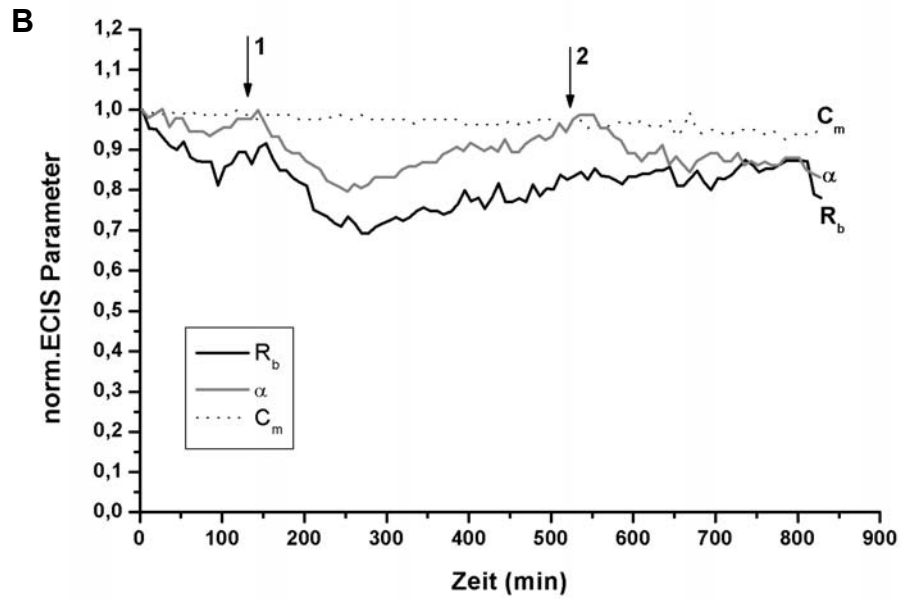


Abb. 3.86 A und B:

Der Einfluss der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion auf die PBCEC-Barrierefunktion unter Berücksichtigung des NkCDMs (E/L Ratio: 1:5).

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Werte des Zell-Zell-Kontakts (R_b), der Membrankapazität (C_m) und des Zell-Substrat-Kontakts (α) nach Zugabe von 3,5 Millionen neutrophilen Granulozyten.

A: Vorstimulation der Endothelzellen mit 2 ng/ml TNF- α in 300 μ l CDM (1) und anschließende Zugabe von 3,5 Millionen neutrophilen Granulozyten in 300 μ l ihres 9hNkCDM (2).

B: Vorstimulation der Endothelzellen mit 2 ng/ml TNF- α in 300 μ l CDM (1) und anschließende Zugabe von 3,5 Millionen neutrophilen Granulozyten in 300 μ l frischem CDM (2).

Die Messung erfolgte am 7. DIV. Die eingezeichneten mit 1 bzw. 2 versehenen Pfeile markieren die Zugabe von TNF- α (1) bzw. der Immunzellen (2). Inkubationsmedium der PBCEC: chemisch definiertes Medium (CDM) mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Neutrophilen-konditioniertes Medium (NkCDM).

$R_b(0) = 240 \Omega \times \text{cm}^2$ (A), $139 \Omega \times \text{cm}^2$ (B); $\alpha(0) = 66 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ (A), $51 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ (B) und $C_m(0) = 1,1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (A), $1,6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (B) geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$, $\alpha(0)$ und $C_m(0)$ normiert.

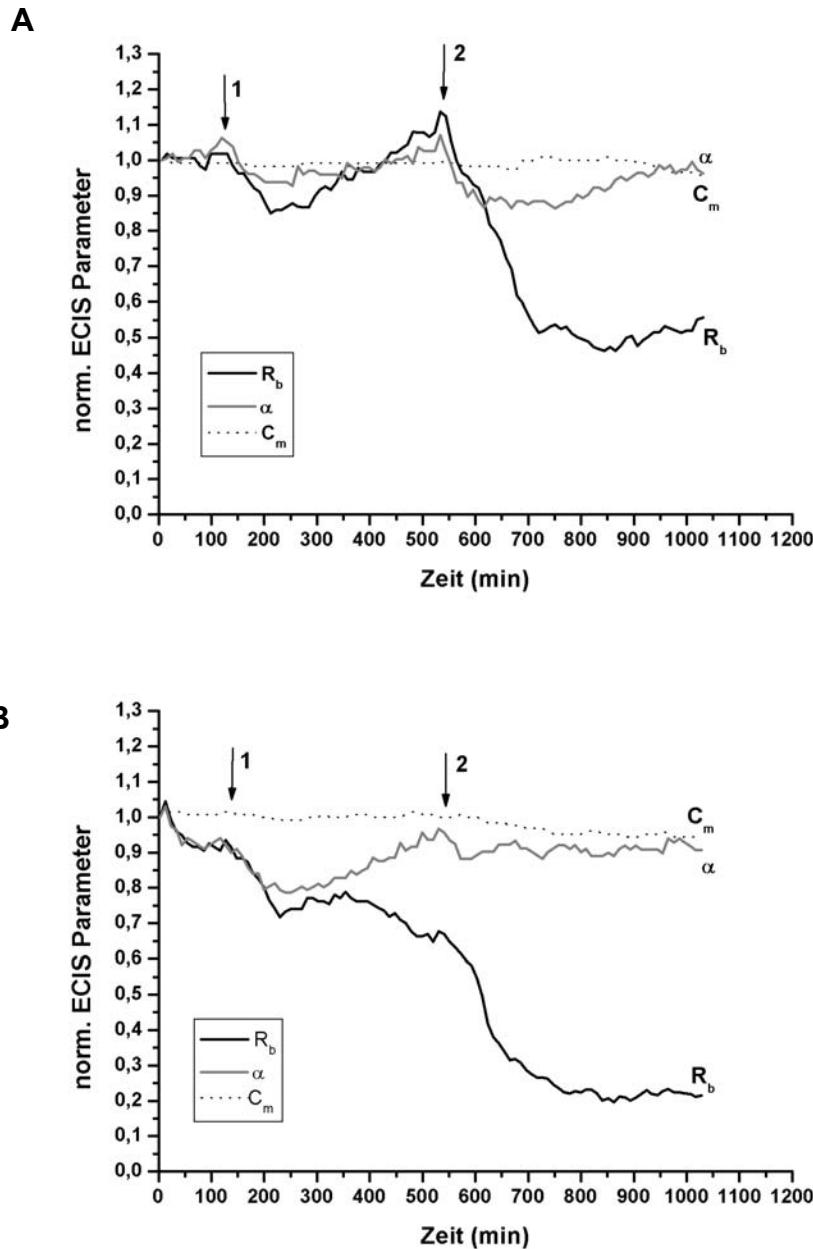


Abb. 3.87 A und B:

Der Einfluss der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion auf die PBCEC-Barrierefunktion unter Berücksichtigung des NkCDMs (E/L Ratio: 1:30).

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Werte des Zell-Zell-Kontakts (R_b), der Membrankapazität (C_m) und des Zell-Substrat-Kontakts (α) nach Zugabe von 24 Millionen neutrophilen Granulozyten.

A: Vorstimulation der Endothelzellen mit 2 ng/ml TNF- α in 300 μ l CDM (1) und anschließende Zugabe von 3,5 Millionen neutrophilen Granulozyten in 300 μ l ihres 9hNkCDM (2).

B: Vorstimulation der Endothelzellen mit 2 ng/ml TNF- α in 300 μ l CDM (1) und anschließende Zugabe von 3,5 Millionen neutrophilen Granulozyten in 300 μ l frischem CDM (2).

Die Messung erfolgte am 7. DIV. Inkubationsmedium der PBCEC: chemisch definiertes Medium (CDM) mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Neutrophilen-konditioniertes Medium (NkCDM).

Die eingezeichneten mit 1 bzw. 2 versehenen Pfeile markieren die Zugabe von TNF- α (1) bzw. der Immunzellen (2).

$R_b(0) = 83 \Omega \times \text{cm}^2$ (A), $65 \Omega \times \text{cm}^2$ (B); $\alpha(0) = 23 \Omega^{0,5} \times \text{cm}$ (A), $34 \Omega^{0,5} \times \text{cm}$ (B) und $C_m(0) = 1,2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (A), $1,3 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (B) geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$, $\alpha(0)$ und $C_m(0)$ normiert.

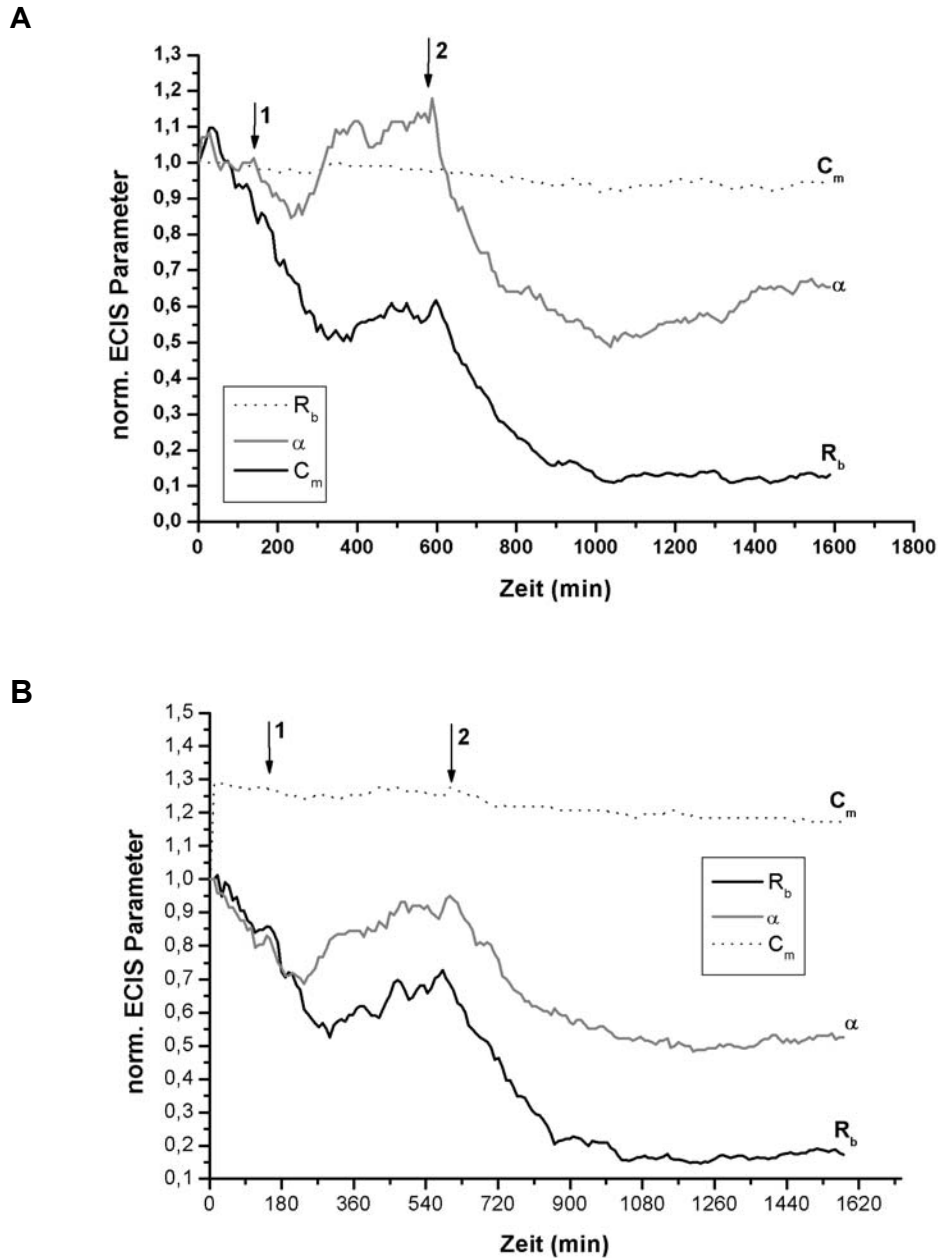


Abb. 3.88 A und B:

Der Einfluss der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion auf die PBCEC-Barrierefunktion unter Berücksichtigung des NkCDMs (E/L Ratio: 1:50).

Zeitlicher Verlauf der Werte des Zell-Zell-Kontakts (R_b), der Membrankapazität (C_m) und des Zell-Substrat-Kontakts (α) nach Zugabe von 35 Millionen neutrophilen Granulozyten.

A: Vorstimulation der Endothelzellen durch 2 ng/ml TNF- α in 300 μ l CDM (1) und anschließende Zugabe von 35 Millionen neutrophilen Granulozyten in 300 μ l ihres 9hNkCDM (2).

B: Vorstimulation der Endothelzellen durch 2 ng/ml TNF- α in 300 μ l CDM (1) und anschließende Zugabe von 35 Millionen neutrophilen Granulozyten in 300 μ l frischem CDM (2).

Die Messung erfolgte am 7. DIV. Inkubationsmedium der PBCEC: chemisch definiertes Medium (CDM) mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Neutrophilen-konditioniertes Medium (NkCDM).

Die mit 1 bzw. 2 versehenen Pfeile markieren die jeweilige Zugabe des TNF- α (1) bzw. der Immunzellen (2).

$R_b(0) = 127 \Omega \times \text{cm}^2$ (A), $262 \Omega \times \text{cm}^2$ (B); $\alpha(0) = 41 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ (A), $52 \Omega^{0.5} \times \text{cm}$ (B) und $C_m(0) = 1,1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (A), $0,9 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (B) geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$, $\alpha(0)$ und $C_m(0)$ normiert.

Die ECIS-Untersuchungen des Einflusses der Neutrophilen-Anzahl auf die Barrierefunktion der PBCEC demonstrierten, dass ausschließlich die jeweilige E/L-Ratio bei der Beeinträchtigung des Zell-Zell- und des Zell-Substrat-Kontakts von entscheidender Bedeutung war. Demzufolge wurde gegenüberstellend der TER der Endothelzellen nach Applikation der Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:20, resuspendiert in frischem CDM, sowie nach der Zugabe ihres NkCDMs allein bestimmt (s. Abb. 3.89). Wie die Messungen zeigten, wurde unabhängig davon, ob die Neutrophilen in ihrem NkCDM oder dem NfCDM zu den PBCEC appliziert wurden, der TER gesenkt. Demgegenüber wurde durch das NkCDM in Abwesenheit der Neutrophilen der TER der PBCEC nicht beeinträchtigt.

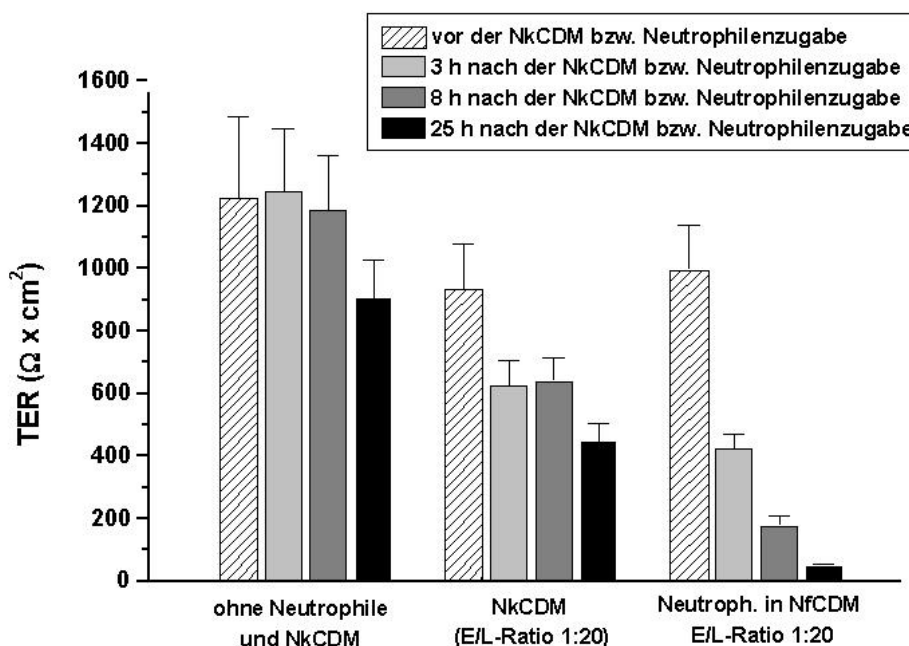


Abb. 3.89:

Vergleichende Darstellung des Einflusses der Neutrophilen und ihres NkCDMs auf den TER der PBCEC.

Dargestellt ist der Einfluss der Neutrophilen auf die PBCEC (E/L-Ratio von 1:20), resuspendiert in frischem CDM (NfCDM), kurz vor der Zugabe zu den Endothelzellen. Im Vergleich dazu wurde das 3h konditionierte NkCDM derselbigen Neutrophilen in einer Konzentration zu den PBCEC appliziert, das einer E/L-Ratio von 1:20 entsprach.

Die TER-Messung erfolgte am 7. DIV, nach Applikation von jeweils 50 μ l 3hNkCDM in die apikale Filterkammer. Neutrophile/ml CDM: 80-100 Millionen. Die Entzündungsaktivierung mit 2 ng/ml TNF- α erfolgte 4 h vor der Zugabe des NkCDMs. Inkubationsmedium der Neutrophilen: Chemisch definiertes Medium (CDM). Neutrophilen konditioniertes Medium (NkCDM), Neutrophile die vor ihrer Zugabe zu den PBCEC in frischem CDM suspendiert wurden (NfCDM).

Die TER-Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt (n = 6).

Das NkCDM als Entzündungsaktivator

Interessanterweise führte die Zugabe des NkCDMs zu den PBCEC zu einer entzündlichen Reaktion, was die Expression des Entzündungsmarkers E-Selektin auf der Endothelzell-Oberfläche demonstrierte (s. Abb. 84A u. 84B).

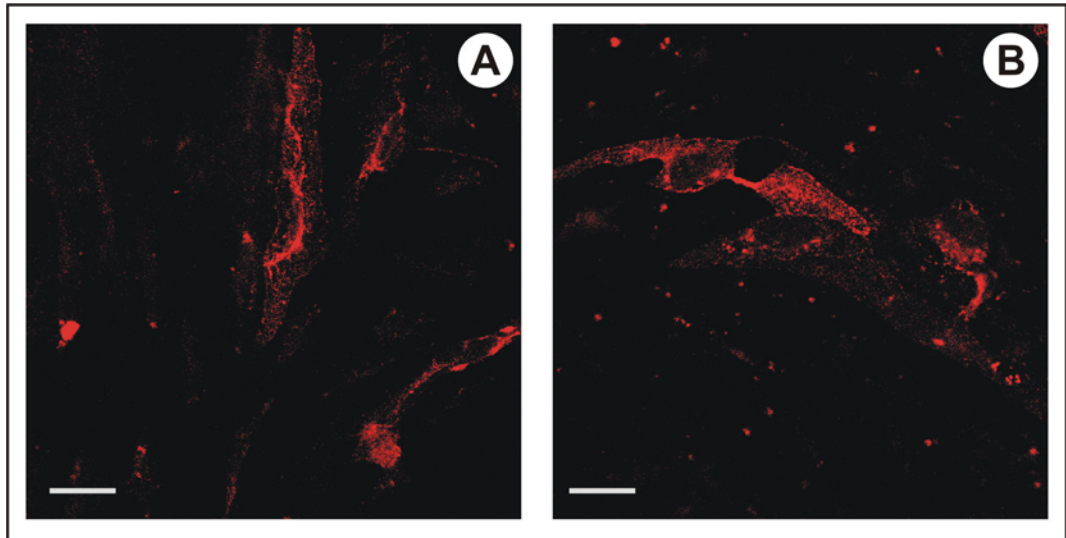


Abb. 3.90 A und B:

Immunzytochemischer Nachweis des E-Selektins der PBCEC nach der Interaktion mit dem NkCDM.

A: Inkubation des 9hNkCDM mit den PBCEC (entspricht einer E/L-Ratio von 1:5).

B: Inkubation des 9hNkCDM mit den PBCEC (entspricht einer E/L-Ratio von 1:20).

Inkubationsmedium: CDM mit Zusatz von 55 nM HC. Inkubationsdauer des NkCDM mit dem Endothelzellen: 2 h. Der E-Selektin Nachweis erfolgte am 7. DIV.

Neutrophilen-konditioniertes Medium (NkCDM), NkCDM das von den Neutrophilen 9 h konditioniert wurde, bevor es zu den PBCEC appliziert wurde (9hNkCDM), chemisch definiertes Medium (CDM). Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Der vergleichende Einfluss des NkCDMs und der Neutrophilen auf die *tight junction*-

assoziierten Proteine

Zur Analyse des Einflusses des NkCDMs auf die *tight junction*-assoziierten Proteine der PBCEC wurden immunzytochemische Untersuchungen der auf den Filtern kultivierten PBCEC durchgeführt. Die Untersuchung des ZO-1-Proteins der PBCEC zeigte, dass die Inkubation der Endothelzellen mit dem 9hNkCDM in einer Menge, die den Neutrophilen einer E/L-Ratio von 1:20 entsprechen hätte, zu keiner Störung der ZO-1-Expression führte (s. Abb. 3.91). Im Gegensatz dazu verursachte die Inkubation der PBCEC mit Neutrophilen in NfkCDM in einer E/L-Ratio von 1:20 eine extrem starke Beeinträchtigung der ZO-1-Expression (vergl. Abb. 3.91 C und F).

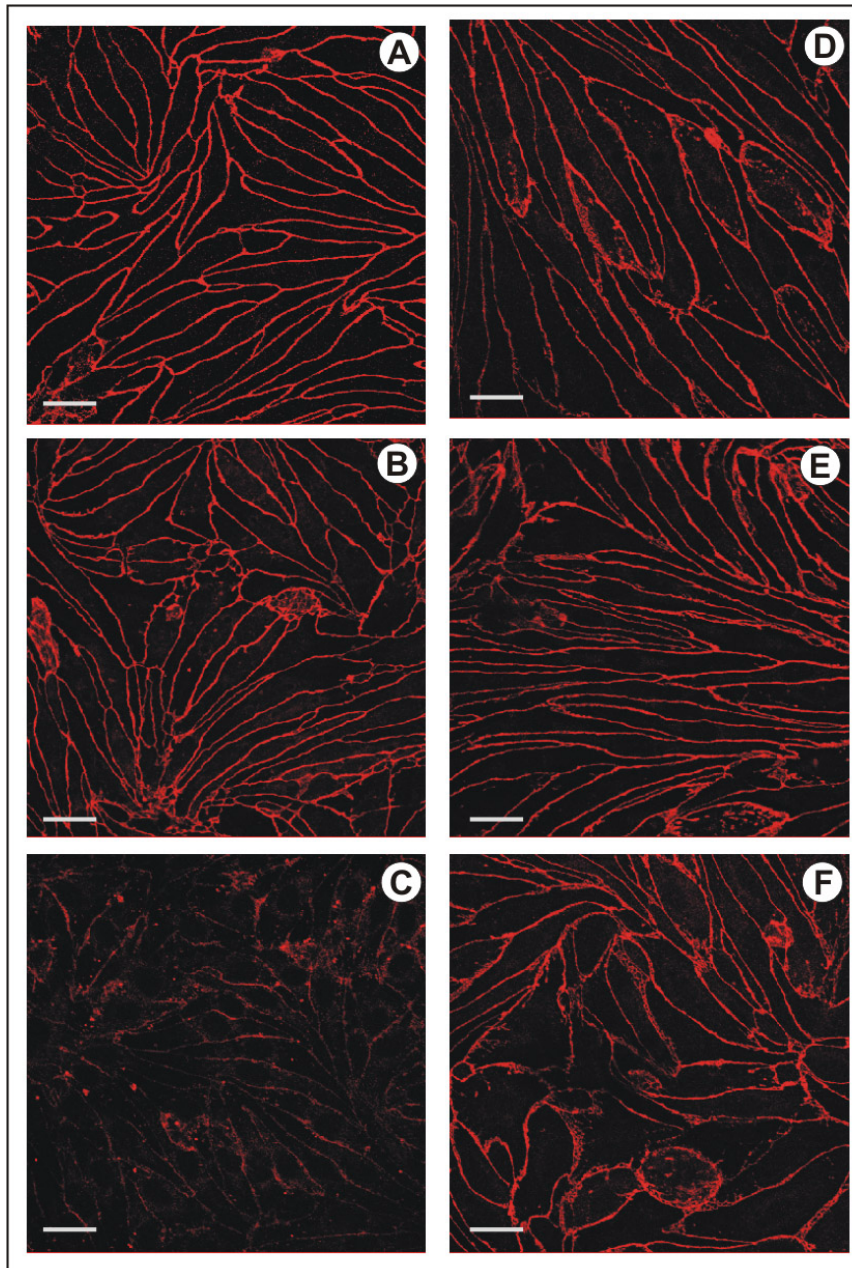


Abb. 3.91 A-F:

Der Einfluss der Neutrophilen und ihres NkCDMs auf die ZO-1-Expression der entzündungsaktivierten PBCEC.

Dargestellt ist die vergleichende Inkubation der PBCEC mit Neutrophilen, appliziert in einer E/L-Ratio von 1:5 und 1:20, und ihres NkCDMs in derselben Konzentration.

A: PBCEC ohne NkCDM und ohne Neutrophile.

B: Applikation von 1,5 Millionen Neutrophilen zu den PBCEC (E/L-Ratio: 1:5).

C: Applikation von 6 Millionen Neutrophilen zu den PBCEC (E/L-Ratio: 1:20).

D: Inkubation des 9hNkCDM, das einer E/L-Ratio von 1:5 entsprechen würde.

E: Inkubation des 9hNkCDM, das einer E/L-Ratio von 1:20 entsprechen würde (Präp. A).

F: Inkubation des 9hNkCDM, das einer E/L-Ratio von 1:20 entsprechen würde (Präp. B).

Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium (CDM) mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Die Entzündungsaktivierung der PBCEC erfolgte durch die Applikation von 2ng/ml $TNF\alpha$, 4 Stunden vor Zugabe der Neutrophilen zu den Endothelzellen. Die Neutrophilen und das NkCDM wurde in die apikale Filterkammer gegeben. Inkubationsdauer der Neutrophilen bzw. des NkCDM mit dem Endothelzellen: 2h. Der immunzytochemische Nachweis erfolgte am 7. DIV in vitro. Chemisch definiertes Medium (CDM), Neutrophilen-konditioniertes Medium (NkCDM).

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m.

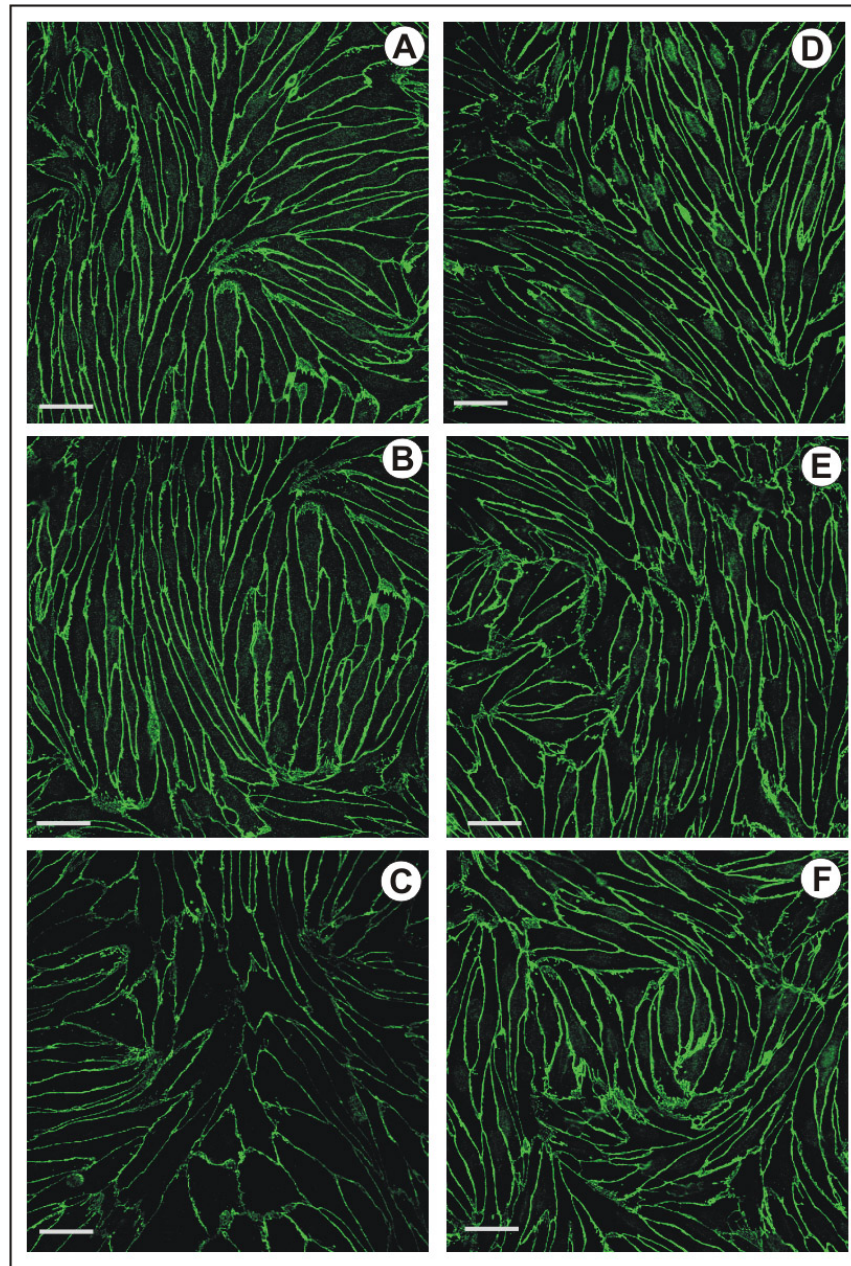


Abb. 3.92 A-F:

Der Einfluss der Neutrophilen und ihres NkCDMs auf die Occludin-Expression der entzündungsaktivierten PBCEC.

Dargestellt ist die vergleichende Inkubation der PBCEC mit Neutrophilen, appliziert in einer E/L-Ratio von 1:5 und 1:20, und ihres NkCDMs in derselben Konzentration.

A: PBCEC ohne NkCDM und ohne Neutrophile.

B: Applikation von 1,5 Millionen Neutrophilen zu den PBCEC (E/L-Ratio: 1:5).

C: Applikation von 6 Millionen Neutrophilen zu den PBCEC (E/L-Ratio: 1:20).

D: Inkubation des 9hNkCDM, das einer E/L-Ratio von 1:5 entsprechen würde.

E: Inkubation des 9hNkCDM, das einer E/L-Ratio von 1:20 entsprechen würde (Präp. A).

F: Inkubation des 9hNkCDM, das einer E/L-Ratio von 1:20 entsprechen würde (Präp. B).

Die Entzündungsaktivierung der PBCEC erfolgte durch die Applikation von 2ng/ml TNF α , 4 Stunden vor Zugabe der Neutrophilen zu den Endothelzellen. Die Neutrophilen und das NkCDM wurde in die apikale Filterkammer gegeben. Inkubationsdauer der Neutrophilen bzw. des NkCDM mit dem Endothelzellen: 2h. Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium (CDM) mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Der immunzytochemische Nachweis erfolgte am 7. DIV in vitro. Chemisch definiertes Medium (CDM), Neutrophilen-konditioniertes Medium (NkCDM).

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m.

Wie die Abbildung 3.92 zeigt, kam es durch die Inkubation der PBCEC mit dem NkCDM, das einer E/L-Ratio von 1:20 entsprochen hätte, zu keiner Beeinträchtigung der Occludin-Expression. Im Vergleich dazu führte die Zugabe der Neutrophilen in einer Anzahl, die einer E/L-Ratio von 1:20 entsprach zu einer reduzierten Occludin-Expression, die allerdings im Vergleich zu ZO-1 wesentlich geringfügiger durch die Neutrophilen geschwächt wurde.

Die in Abbildung 3.93 A dargestellten Immunoblot-Analysen zeigen allerdings deutlich, dass die Expression des *tight junction*-assoziierten Occludins durch die Inkubation der PBCEC mit dem NkCDM, das mengenmäßig den Neutrophilen einer E/L-Ratio von 1:20 entsprach, reduziert wurde. Die Expression des Claudin-5 dagegen wurde nicht beeinträchtigt (s. Abb. 3.93 B).

Die Inkubation der Endothelzellen mit dem NkCDM führte zu einer quantitativen Abnahme der Occludin-Expression, wie in den Western-Blot-Analysen zu erkennen war. Die Immunfluoreszenzen dagegen zeigten, dass das NkCDM weder die Expression des ZO-1 noch des Claudin-5 und Occludins beeinträchtigte. Inwiefern die Ursache des gegensätzlichen Befunds der Occludin-Expression im Western-Blot und in der Immunfluoreszenz auf dem Einsatz des NkCDMs unterschiedlicher Neutrophilen-Präparationen beruhte, konnte nicht eindeutig bestimmt werden.

Insgesamt ergaben die Untersuchungen, dass das NkCDM die Barrierefunktion der PBCEC nicht signifikant beeinträchtigte. Allerdings zeigten die ECIS-Messungen, dass es in Abhängigkeit von der jeweiligen Neutrophilen-Präparation zu einer geringfügigen reversiblen Senkung der ECIS-Parameter R_b und α kam. Aufgrund der nachgewiesenen Präparations-bedingten Beeinträchtigung der Barrierefunktion der PBCEC durch das NkCDM wurde die Notwendigkeit unterstrichen, grundsätzlich den Effekt des Neutrophilen-konditionierten Mediums parallel zu den Neutrophilen-PBCEC-Interaktionsstudien zu analysieren.

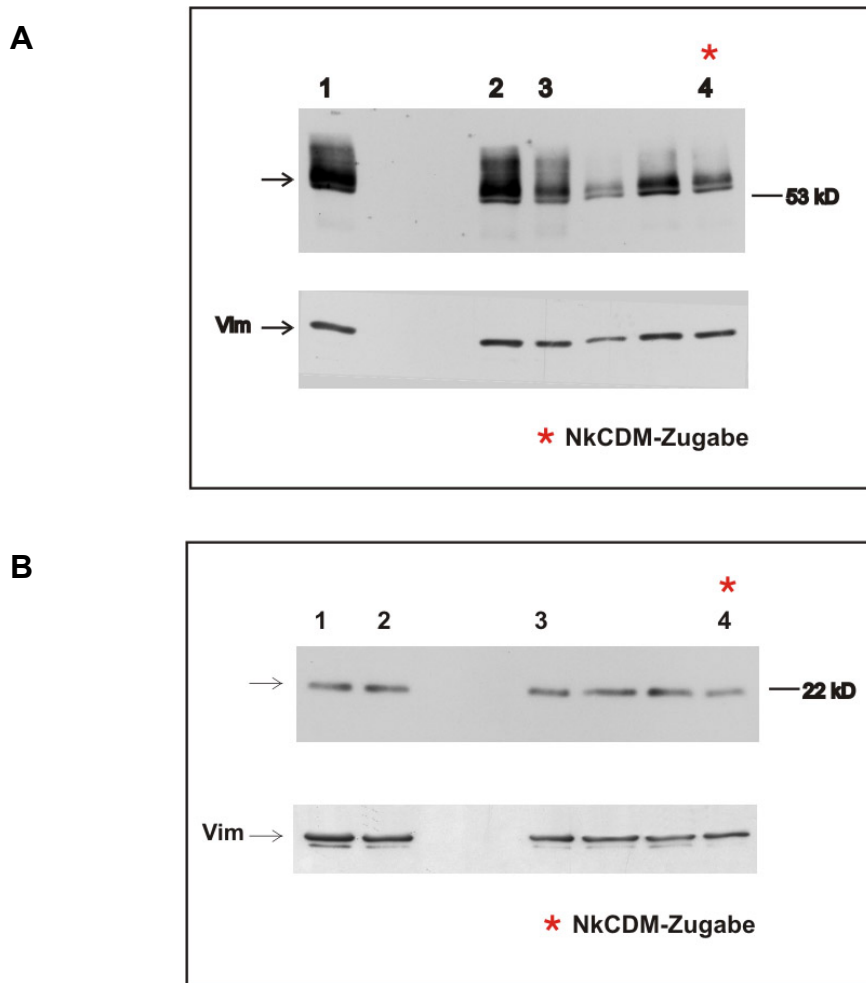


Abb. 3.93 A und B:

Der Einfluss der Neutrophilen bzw. deren NkCDMs auf die tight junction-assoziierten Proteine Occludin und Claudin-5 der PBCEC.

A: Western-Blot-Analyse des Occludin-Proteins nach Inkubation der PBCEC mit Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:20 und vergleichend mit deren NkCDM.

- 1: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC.
- 2: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC und 2 ng TNF- α .
- 3: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC und 2 ng/ml TNF- α , Inkubation mit Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:20.
- 4: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC und 2 ng/ml TNF- α , Inkubation mit NkCDM in einer Menge, entsprechend einer E/L-Ratio von 1:20.

B: Western-Blot-Analyse des Claudin-5-Proteins nach Inkubation der PBCEC mit Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:20 und vergleichend mit deren NkCDM.

- 1: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC.
- 2: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC und 2 ng TNF- α .
- 3: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC und 2 ng/ml TNF- α , Inkubation mit Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:20
- 4: PBCEC, kultiviert in CDM mit Zusatz von 55 nM HC und 2 ng/ml TNF- α , Inkubation mit NkCDM, in einer Menge, die einer E/L-Ratio von 1:20 entsprach.

Die Inkubation der PBCEC mit TNF- α erfolgte jeweils 4 h. Inkubationsdauer der PBCEC mit den Neutrophilen bzw. mit deren NkCDM: 2h. Die Probengewinnung der PBCEC erfolgte am 7. DIV. Der Pfeil markiert das jeweilige Protein (ZO-1, Occludin und Claudin-5). Der Vimentin-Nachweis diente dem Abgleich der aufgetragenen Proteinmenge, da Vimentin unter allen Versuchsbedingungen von den PBCEC auf gleichem Niveau exprimiert wird. Gesamtproteinkonzentration/ Geltasche: 2 μ g. Chemisch definiertes Medium (CDM), Hydrocortison (HC), Neutrophilen konditioniertes Medium (NkCDM), Vimentin (Vim).

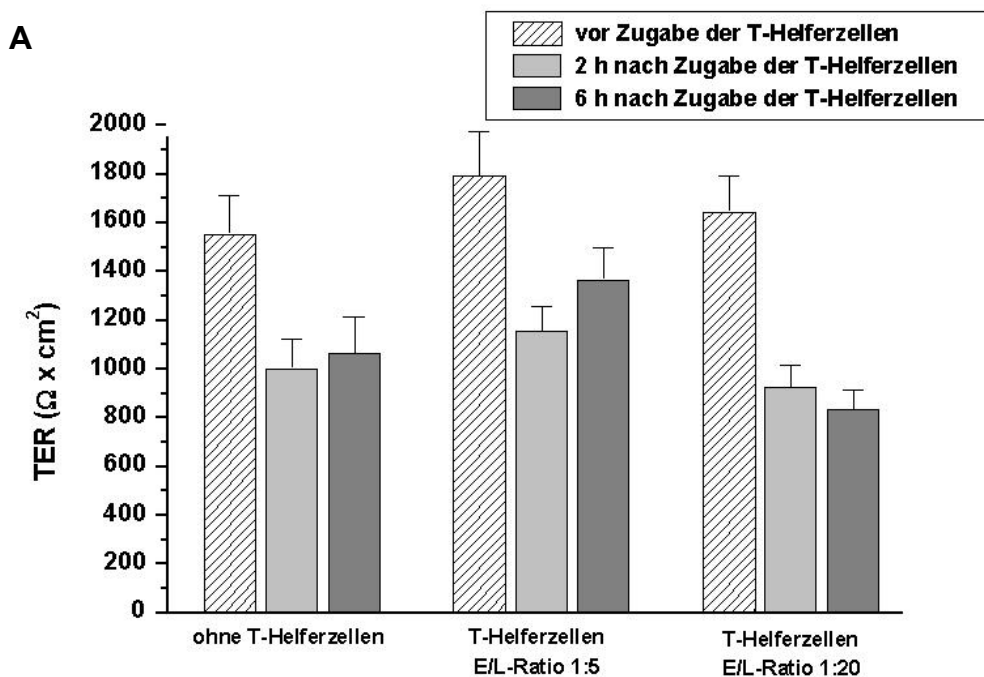
3.2.3 Die T-Helferzell-Endothelzell-Interaktion

Zur vergleichenden Charakterisierung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurden analog zu den neutrophilen Granulozyten (s. Kapitel 3.2.2) T-Helferzellen eingesetzt. Bei den in den Experimenten eingesetzten T-Helferzellen handelte es sich um $CD4^+$ -T-Helferzellen, die im Vergleich zu den Neutrophilen eine Antigen-Spezifität aufweisen und bei chronischen ZNS-Erkrankungen wie beispielsweise der neurodegenerativen Multiplen Sklerose eine große Rolle spielen. Die Frage, wie die $CD4^+$ -T-Helferzellen die Blut-Hirn-Schranke überwinden und inwieweit sich ihr Transmigrations-Mechanismus von demjenigen der Neutrophilen unterscheidet, stand im Mittelpunkt der Analyse der T-Helferzell-Endothelzell-Interaktion.

Der Einfluss der $CD4^+$ -T-Helferzellen auf die PBCEC-Barrierefunktion

Inwieweit die Barrierefunktion der entzündungsaktivierten bzw. nicht aktivierten PBCEC durch die Inkubation mit den T-Helferzellen beeinträchtigt wurde, zeigten die TER-Messungen, dargestellt in Abbildung 3.94 A und B.

Wie die TER-Filtermessungen deutlich demonstrierten, beeinträchtigten die T-Helferzellen im Gegensatz zu den Neutrophilen unabhängig von ihrer eingesetzten E/L-Ratio den TER der PBCEC nicht signifikant (vergl. Abb. 3.64 in Kapitel 3.2.2.1).



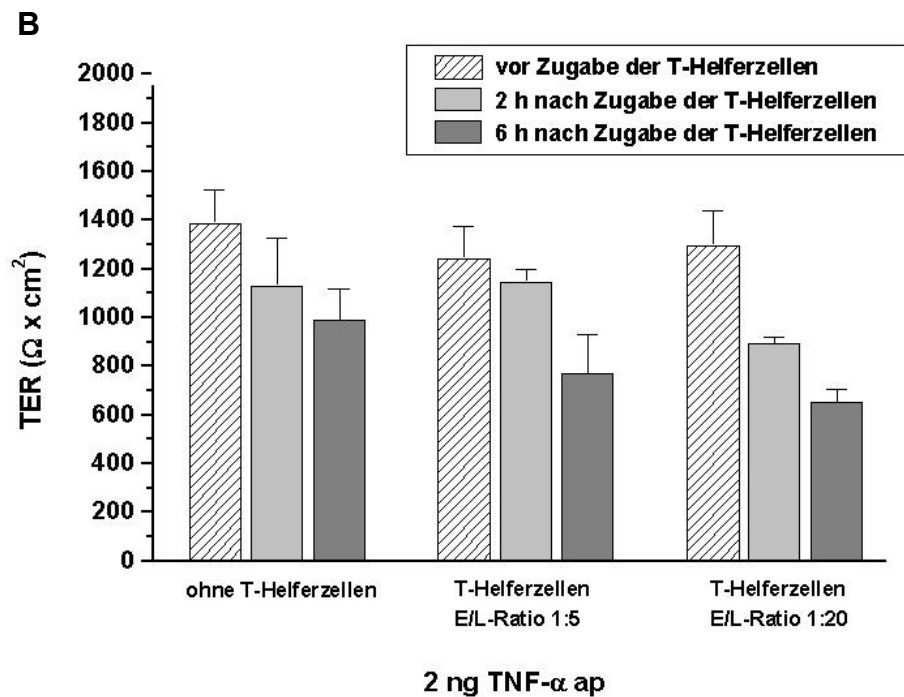


Abb. 3.94 A und B:

Der Einfluss der T-Helferzellen auf den TER der PBCEC in Abhängigkeit von der E/L-Ratio.

A: PBCEC nicht entzündungsaktiviert.

B: PBCEC mit 2ng/ml TNF- α entzündungsaktiviert.

Die Aktivierung der PBCEC erfolgte durch eine 4-stündige Inkubation mit 2 ng/ml TNF- α (apikale (ap)Filterkammer) vor der Zugabe der T-Helferzellen. Die Messungen des TERs 2 h und 6 h nach der Immunzell-Applikation zu den PBCEC, erfolgten am 7. DIV. Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium (CDM) mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison.

Die TER-Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt (n = 8).

Die Zugabe der T-Helferzellen in einer E/L-Ratio von 1:5 verursachte keine Senkung des TERs der PBCEC, wohingegen die Erhöhung der T-Helferzellzahl auf eine E/L-Ratio von 1:20 den TER geringfügig erniedrigte. Im Vergleich zu den Neutrophilen, eingesetzt in einer E/L-Ratio von 1:20, senkten die T-Helferzellen den TER der Endothelzellen allerdings wesentlich geringfügiger (vergl. Abb. 3.53 und 3.94). Die Entzündungsaktivierung der PBCEC war dabei, wie auch bei der Neutrophilen-Endothelzell-Interaktion, unerheblich.

Mit Hilfe der ECIS-Technik wurde der Einfluss der CD4⁺-T-Helferzellen auf die Endothelzell-Morphologie in Form der drei ECIS-Parameter R_b , α und C_m in Abhängigkeit von der eingesetzten E/L-Ratio detailliert untersucht. In der Abbildung 3.95 ist die Interaktion der T-Helferzellen mit den PBCEC in einer E/L-Ratio von 1:5 dargestellt. Wie schon bei der Inkubation der Neutrophilen mit den entzündungsstimulierten Endothelzellen wurden die Werte der ECIS-Parameter R_b , α und C_m in dieser E/L-Ratio kaum beeinträchtigt. Demgegenüber kam es durch den Einsatz der T-Helferzellen in einer E/L-Ratio von 1:20 zu einer deutlichen Reduzierung des Wertes von R_b und α .

Die Membrankapazität C_m blieb dagegen unbeeinflusst (s. Abb. 3.96). Im Vergleich des Effekts der Neutrophilen in der gleichen E/L-Ratio war der Einfluss der T-Helferellen auf R_b und α allerdings nicht konstant zu beobachten. In Abbildung 3.96 ist die durch die T-Helferzellen verursachte maximale Beeinträchtigung von R_b und α dargestellt. Zum Vergleich ist eine TER-Messung, in der von einer anderen Präparation stamende T-Zellen in einer E/L-Ratio von 1:20 eingesetzt wurden dargestellt (s. Abb. 3.97). Diese Messung erfolgte in der gleichen zeitlichen Auflösung und unter den gleichen Versuchsbedingungen wie die ECIS-Messungen, allerdings wurden die Parameter R_b , α und C_m nicht separiert aufgeführt.

Generell zeigten sowohl die TER-Messungen als auch die ECIS Messungen, dass die $CD4^+$ T-Helferzellen einen im Vergleich zu den Neutrophilen wesentlich geringeren Effekt auf die Barrierefunktion der PBCEC ausübten.

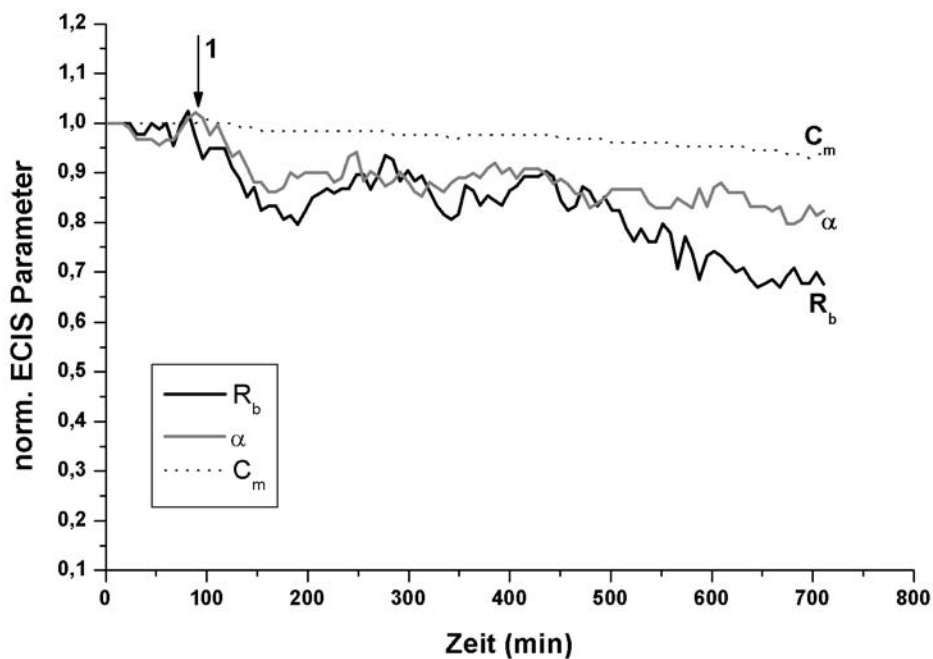


Abb. 3.95:

Interaktion $CD4^+$ T-Helferzellen mit den PBCEC (E/L Ratio: 1:5).

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Werte des Zell-Zell-Kontakts (R_b), der Membrankapazität (C_m) und des Zell-Substrat-Kontakts (α) nach Zugabe von 3 Millionen T-Helferzellen. Die Messung erfolgte am 7. DIV.

Die Entzündungsaktivierung der Endothelzellen durch 2 ng/ml TNF- α in 300 μ l CDM erfolgte 8 h vor der Zugabe der Neutrophilen. Die Applikation von 3 Millionen T-Helferzellen erfolgte in 300 μ l CDM (1). Der eingezeichnete mit 1 versehene Pfeil markiert die Zugabe der Immunzellen.

$R_b(0) = 191 \Omega \times cm^2$; $\alpha(0) = 40 \Omega^{0.5} \times cm$ und $C_m(0) = 1,3 \mu F/cm^2$ geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$, $\alpha(0)$ und $C_m(0)$ normiert.

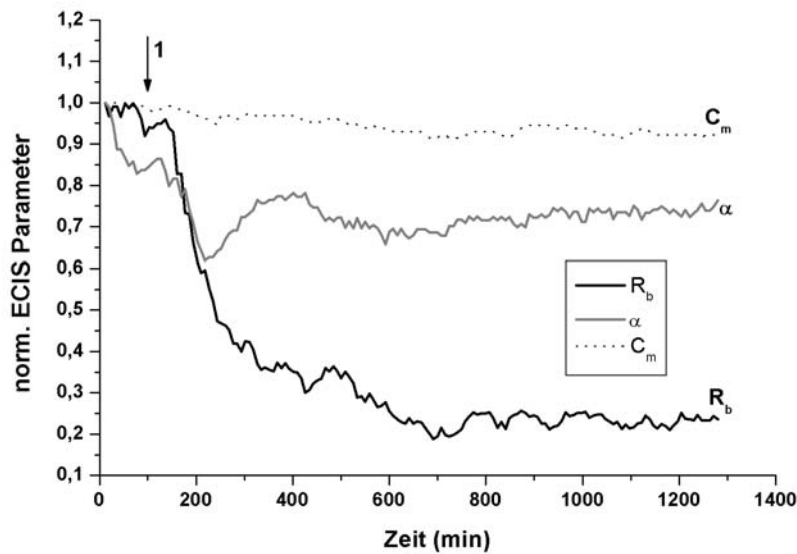


Abb. 3.96:

Interaktion $CD4^+$ T-Helferzellen mit den PBCEC (E/L Ratio: 1:20).

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Werte des Zell-Zell-Kontakts (R_b), der Membrankapazität (C_m) und des Zell-Substrat-Kontakts (α) nach Zugabe von 14 Millionen T-Helferzellen.

Die Messung erfolgte am 7. DIV. Die Entzündungsaktivierung der Endothelzellen durch 2 ng/ml TNF- α in 300 μ l chemisch definiertem Medium (CDM) erfolgte 8 h vor der Zugabe der Leukozyten (hier nicht dargestellt). Die Applikation von 14 Millionen T-Helferzellen erfolgte in 300 μ l CDM (1). Der eingezeichnete mit 1 versehene Pfeil markiert die Zugabe der Immunzellen.

$R_b(0) = 98 \Omega \times cm^2$; $\alpha(0) = 46 \Omega^{0.5} \times cm$ und $C_m(0) = 1,3 \mu F/cm^2$ geben die Absolutwerte dieser Größen zu Beginn der Messung an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf $R_b(0)$, $\alpha(0)$ und $C_m(0)$ normiert.

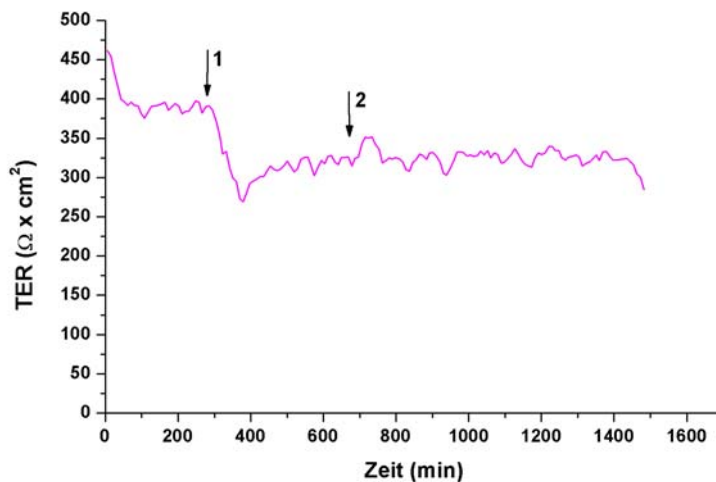


Abb3.97:

Interaktion CD4-positiver T-Helferzellen mit den PBCEC (E/L Ratio: 1:20).

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des TERs nach Zugabe von 14 Millionen T-Helferzellen. Die Messung erfolgte am 7. DIV. Vorstimulation der Endothelzellen durch 2 ng/ml TNF- α in 300 μ l chemisch definiertem Medium (CDM) (1) und anschließende Zugabe von 14 Millionen T-Helferzellen in 300 μ l CDM (2). Die eingezeichneten mit 1 bzw. 2 versehenen Pfeile markieren die Zugabe des TNF- α (1) bzw. der Immunzellen (2).

Um zu zeigen, inwieweit das konditionierte Medium der T-Helferzellen (THkCDM) bei deren Interaktion mit den PBCEC einen Effekt auf die Barrierefunktion der Endothelzellen ausübte, wurde sowohl eine TER-Messung der auf Goldelektroden kultivierten Endothelzellen in hoher zeitlicher Auflösung, als auch TER-Filtermessungen durchgeführt. Die Abbildung 3.98 zeigt, dass durch das 3hTHkCDM (3 Stunden konditioniertes THkCDM) der TER der entzündungsaktivierten bzw. nicht aktivierten cerebralen Endothelzellen nicht gesenkt wurde. Auch die TER-Messung unter ECIS-Messbedingungen, dargestellt in Abbildung 3.99 zeigte keinen Effekt in der Entwicklung des TERs der Endothelzellen nach der Applikation des 3hTHkCDMs.

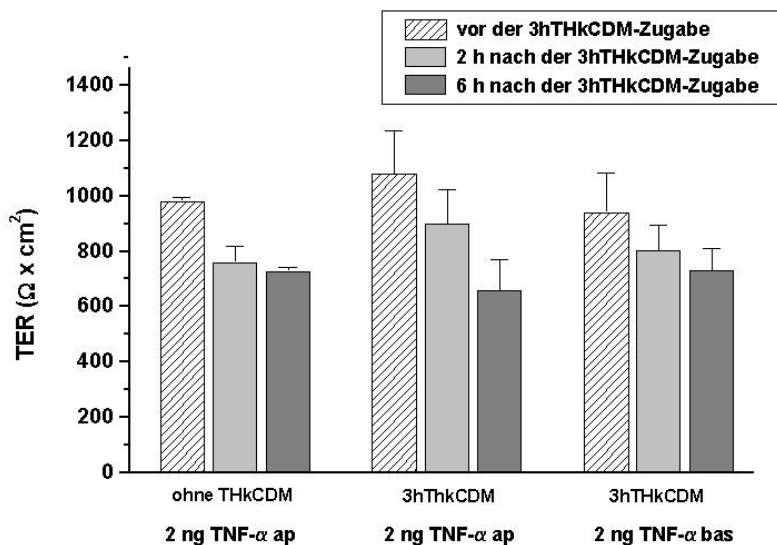


Abb. 3.98:

Einfluss des THkCDMs auf den TER der entzündungsaktivierten PBCEC.

Die Aktivierung der PBCEC erfolgte durch eine 4-stündige Inkubation mit 2 ng/ml TNF- α (in die apikale (ap) bzw. basolaterale (bas) Filterkammer) vor Zugabe des 3hTHkCDMs (T-Helferzellen-konditioniertes Medium, dass 3h von den T-Zellen konditioniert wurde, bevor es zu den PBCEC appliziert wurde).

Die Messungen des TERs 2 h und 6 h nach der Immunzell-Applikation erfolgten am 7. DIV. Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium (CDM) mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison. Das THkCDM wurde in einer Konzentration zu den PBCEC appliziert, die der E/L-Ratio von 1:20 der T-Helferzellen entsprach. T-Helferzellen konditioniertes Medium (THkCDM), chemisch definiertes Medium (CDM).

Die TER-Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt (n = 8).

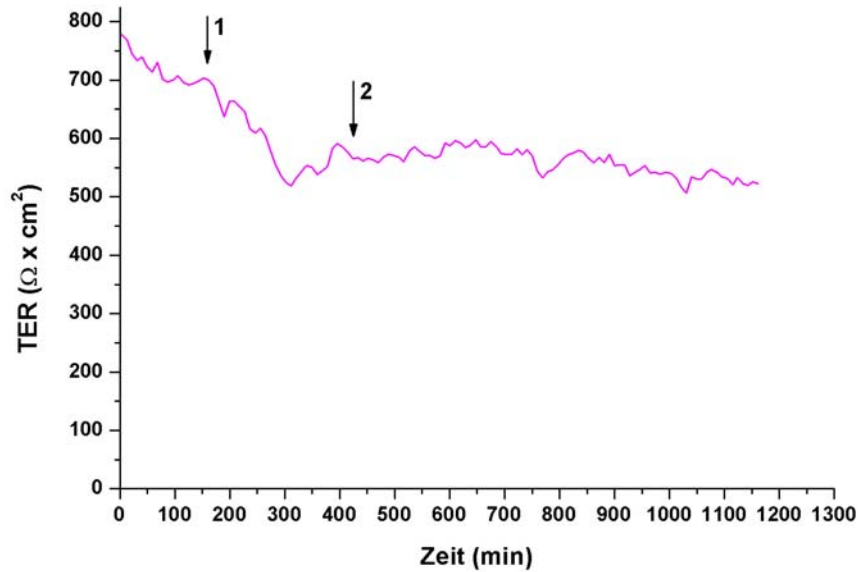


Abb. 3.99:

Der Einfluss des THkCDMs auf den TER der PBCEC im zeitlichen Verlauf.

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Veränderung des TERs nach der Zugabe von 600 μ l THkCDM. (Die Messung wurde an PBCEC, kultiviert auf Goldelektroden durchgeführt). Die Messung erfolgte am 7. DIV.

Vorstimulation der Endothelzellen durch 2 ng/ml TNF- α in 300 μ l CDM (1) und anschließende Zugabe von 600 μ l THkCDM (2). Das THkCDM wurde in einer Konzentration zu den PBCEC appliziert, die einer E/L-Ratio von 1:20 der T-Helferzellen entsprach. Die eingezeichneten mit 1 bzw. 2 versehenen Pfeile markieren die Zugabe des TNF- α (1) bzw. des ThkCDMs (2). T-Helferzellen-konditioniertes Medium (THkCDM), chemisch definiertes Medium (CDM).

Der Einfluss der T-Helferzellen auf die Morphologie und die *tight junction*-assoziierten Proteine der PBCEC

Zum Vergleich des Einflusses der PBCEC-Neutrophilen- und der T-Helferzellen-PBCEC-Interaktion wurde die Auswirkung der T-Helferzellen auf die PBCEC nicht nur impedanzspektroskopisch, sondern auch elektronenmikroskopisch analysiert. So sind zur besseren Vergleichsmöglichkeit der Interaktion beider Immunzell-Typen mit dem cerebralen Endothelzell-Monolayer in Abbildung 3.100 jeweils T-Helferzellen und Neutrophile gegenüberstellend dargestellt.

Wie die Abbildung 3.100 deutlich zeigt, wurden durch die PBCEC-T-Helferzellen-Interaktion die morphologische Struktur der *marginal folds* der Endothelzellen nicht umstrukturiert. So wiesen die PBCEC-Zellgrenzen nicht die membranvesikelartige Strukturen-artige Struktur auf, wie sie nach der Neutrophilen-Interaktion zu beobachten war. Auch die membranvesikelartigen Strukturen, die auf der Endothelzell-Oberfläche während der Neutrophilen-Interaktion verteilt waren, wurden durch die T-Zell-

Interaktion nicht induziert. Die Interaktion der Mikrovilli und Membranvesikelartigen-Strukturen der Neutrophilen-Oberfläche mit den *marginal folds* bzw. mit den Oberflächenstrukturen der PBCEC, konnte ebenfalls bei der T-Helferzell-Endothelzell-Interaktion nicht beobachtet werden.

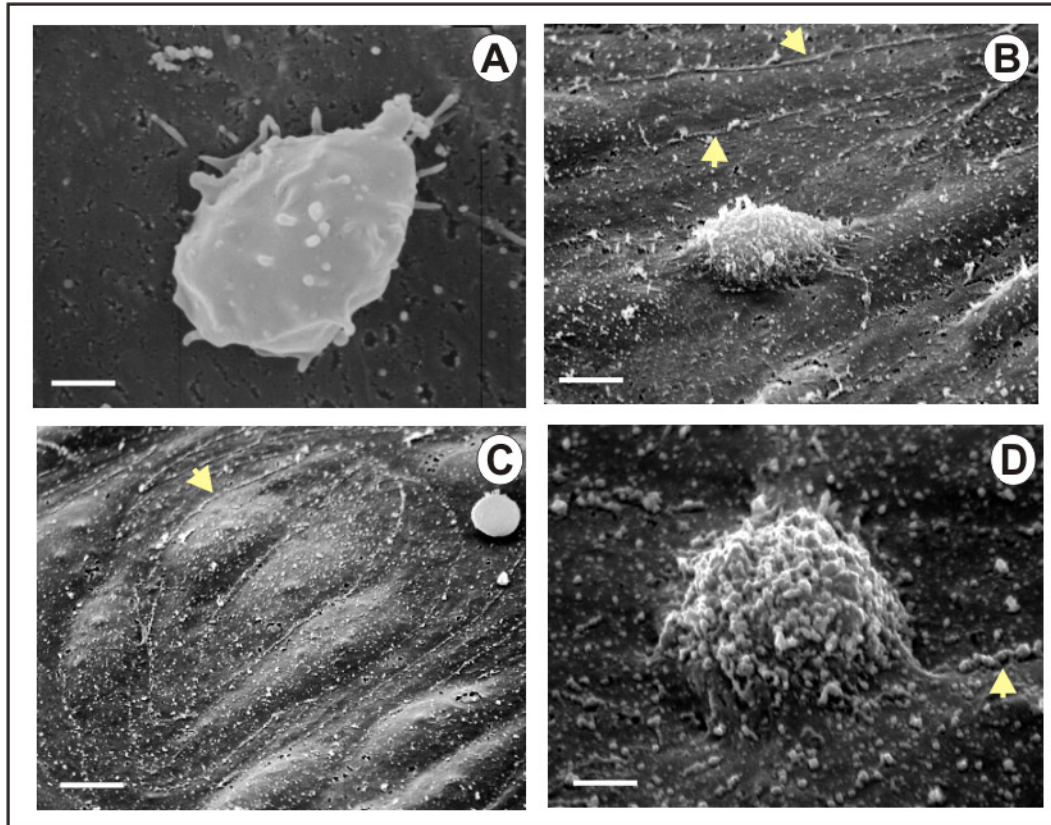


Abb. 3.100 A-D:

Vergleichende REM-Untersuchungen der Interaktion der PBCEC mit Neutrophilen bzw. T-Helferzellen (E/L-Ratio:1:20).

A: Interaktion einer T-Helferzelle mit den entzündungsaktivierten PBCEC.

B: Struktur der Zellgrenzen der PBCEC während der Interaktion mit T-Helferzellen.

C: Struktur der Zellgrenzen der PBCEC während der Interaktion mit T-Helferzellen.

D: Interaktion eines neutrophilen Granulozyten mit den entzündungsaktivierten PBCEC.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der PBCEC, kultiviert in chemisch definiertem Medium (CDM) mit Zusatz von 55 nM HC am 7. DIV, nach 2-stündiger Inkubation mit den $CD4^+$ -T-Helferzellen, die vor der Zugabe zu den Endothelzellen in frischem CDM resuspendiert wurden. Die PBCEC wurden 4h vor Zugabe der Immunzellen mit 2 ng/ml $TNF-\alpha$ entzündungsaktiviert. Interaktionsdauer der T-Helferzellen mit den PBCEC: 2 h. Die Pfeile in den Abbildungen verdeutlichen die Zellgrenzen.

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht in Abbildung A und B: 2 μm und in C: 5 μm und in D: 12 μm .

Die immunzytochemischen Analysen zeigten, dass die T-Helferzellen unabhängig von ihrer eingesetzten E/L-Ratio, keinen Effekt auf die Expression des *tight junction*-assoziierten Proteins ZO-1 ausübte (s. Abb. 3.101 C und D). Auch das T-Helferzellen-konditionierte Medium (THkCDM) hatte unabhängig von seiner eingesetzten Menge keinen Einfluss auf die ZO-1-Expression (s. Abb. 3.101 B).

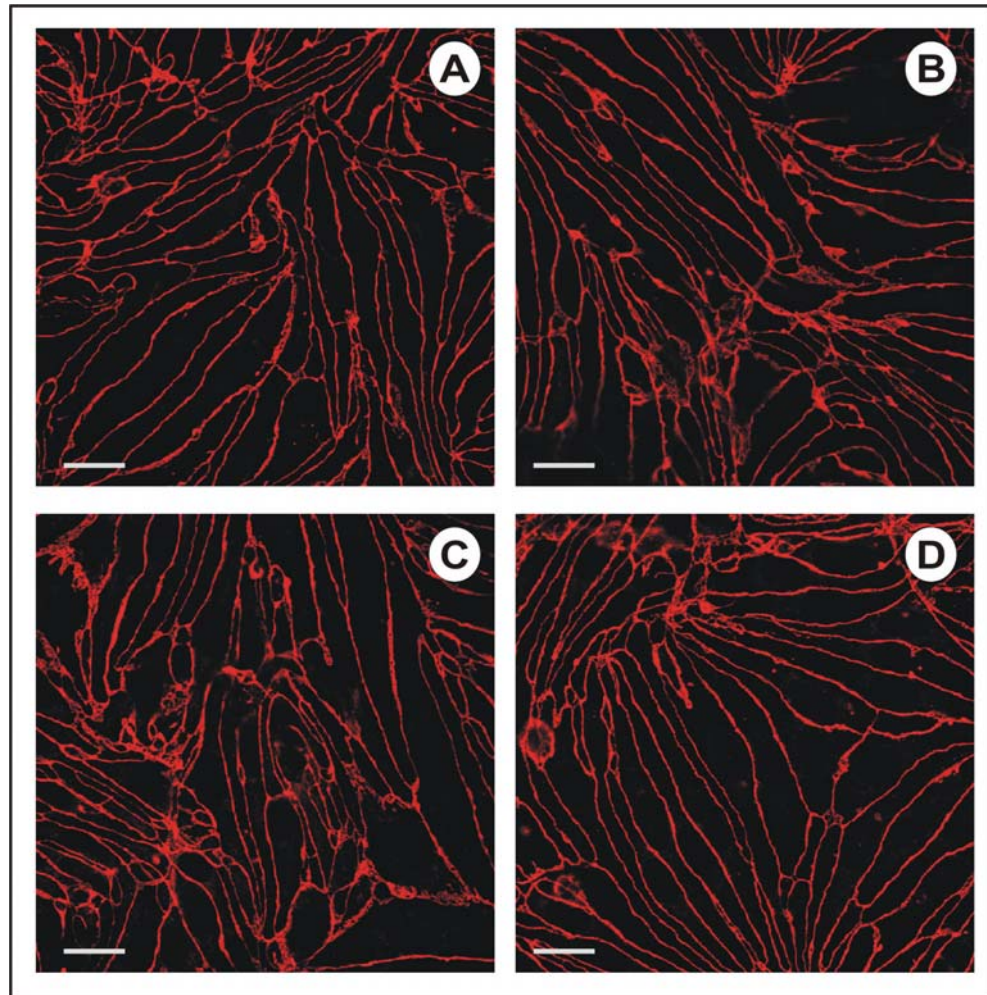


Abb. 3.101 A-D:

Immunzytochemischer Nachweis des ZO-1-Proteins nach Inkubation der entzündungsaktivierten PBCEC mit CD4⁺-T-Helferzellen bzw. deren konditioniertem Medium.

Dargestellt ist die vergleichende Inkubation der PBCEC mit CD4⁺-T-Helferzellen, appliziert in einer E/L-Ratio von 1:5 und 1:20 und ihrem konditionierten Medium.

A: PBCEC ohne THkCDM bzw. T-Helferzellen.

B: Inkubation des 3hTHkCDM mit den PBCEC, das einer E/L-Ratio von 1:20 entsprach.

C: Inkubation der T-Helferzellen mit den PBCEC in einer E/L-Ratio von 1:5.

D: Inkubation der T-Helferzellen mit den PBCEC in einer E/L-Ratio von 1:20.

Die Entzündungsaktivierung der PBCEC erfolgte durch die Applikation von 2ng/ml TNF- α , 4 h vor Zugabe der T-Helferzellen zu den PBCEC. Die Zugabe der Immunzellen und des T-Helferzellen-konditioniertes Mediums (THkCDMs) erfolgte in die apikale Filterkammer am 7. DIV. Inkubationsdauer der T-Helferzellen bzw. THkCDM mit dem Endothelzellen: 2 h. Inkubationsmedium: chemisch definiertes Medium (CDM) mit Zusatz von 55 nM Hydrocortison.

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m.

3.2.4 Die Neutrophilen-Plexusepithel Interaktion

Inwiefern sich die Befunde der morphologischen REM-Studien der Neutrophilen-Transmigration auch auf andere Zellkultursysteme übertragen ließ, sollten REM-Untersuchungen der Neutrophilen-Plexusepithelzell-Interaktion zeigen. In diesen morphologischen Studien wurde die Diapedese neutrophiler Granulozyten durch das cerebrale Epithel des *Plexus choroideus in vitro* analysiert. Da die Leukozyten-Diapedese durch das cerebrale Plexusepithel noch weitgehend ungeklärt ist, waren die folgenden Beobachtungen besonders interessant.

Die REM-Bilder, dargestellt in Abbildung 3.102 A und B demonstrieren, dass trotz der Entzündungsaktivierung der Plexusepithelzellen nach Applikation und zweistündiger Inkubation der Neutrophilen, im Vergleich zur PBCEC-Neutrophilen-Interaktion auffällig wenige Transmigrations-Ereignisse zu beobachten waren. Fast die gesamten auf der Plexusepithelzell-Oberfläche liegenden Neutrophilen befanden sich zum Zeitpunkt der Fixierung in der initialen Interaktionsphase (s. Abb. 3.102).

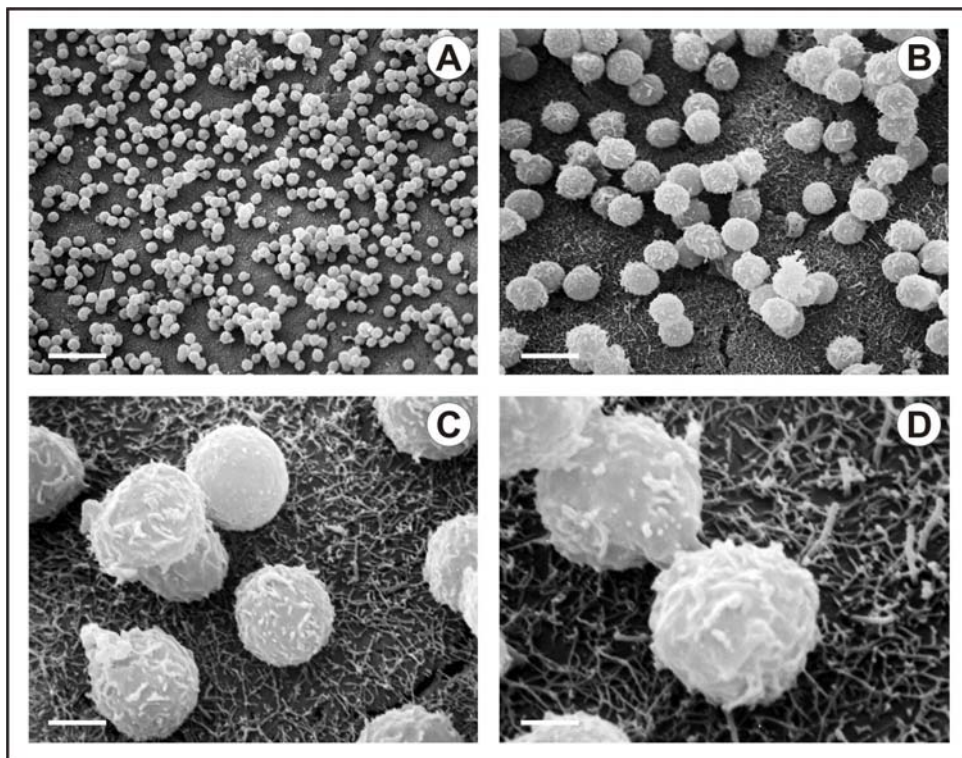


Abb. 3.102 A-D:

REM-Analyse der Neutrophilen-Interaktion mit den entzündungsaktivierten Plexusepithelzellen (E/L-Ratio von 1:20).

Die Neutrophilen wurden suspendiert in frischem chemisch definiertem Medium zu den Epithelzellen appliziert. Die Entzündungsaktivierung der Plexusepithelzellen mit 2 ng/ml TNF- α erfolgte 4 h vor der Neutrophilen-Zugabe. Inkubationsdauer der Neutrophilen mit den Plexusepithelzellen: 2 h. Die Pfeile weisen auf die Mikrovilli-Kontakte bzw. auf die morphologisch veränderte Region in unmittelbarer Nachbarschaft zu dem Neutrophilen, sowie auf die Zell-Zell-Kontakte der Epithelzellen hin. Die Bildausschnitte in höherer Vergrößerung sind jeweils farbig dargestellt.

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht in Abb. A: 5 μ m, in B: 2 μ m und in C: 1 μ m.

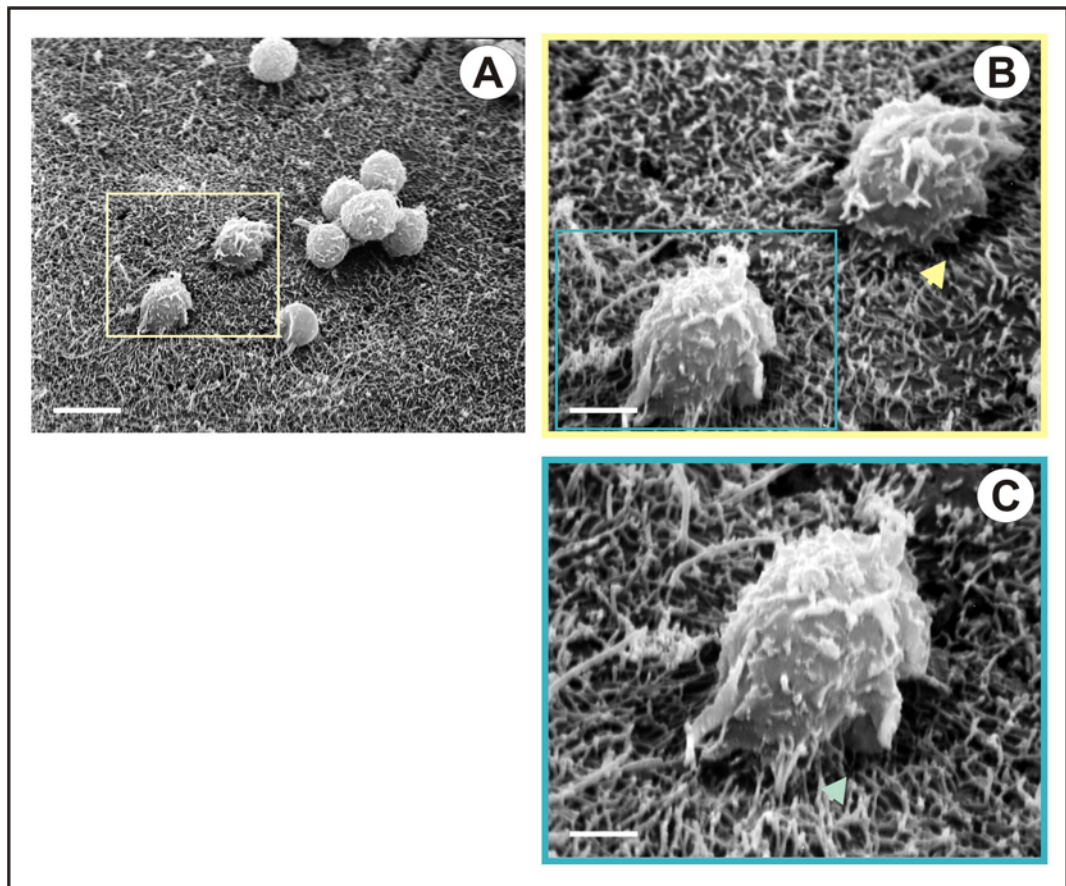


Abb. 3.103 A-C:

REM-Analyse der Neutrophilen-Interaktion mit nicht entzündungsaktivierten Plexusepithelzellen.

Die Neutrophilen wurden vor Zugabe zur Epithelzell-Kultur zentrifugiert und in frischem chemisch definiertem Medium aufgenommen. Inkubationsdauer der Neutrophilen mit den Plexusepithelzellen: 2 h. Die Pfeile weisen auf die Mikrovilli-Kontakte bzw. auf die sich abgrenzende Zone um den Leukozyten und die Zell-Zell-Kontakte hin. Die Bildausschnitte in höherer Vergrößerung sind jeweils farblich dargestellt.

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht in Abb. A: 5 μm , in B: 2 μm und in C: 1 μm .

Wie in der Abbildung 3.103 deutlich zu sehen ist, traten während der beginnenden Neutrophilen-Transmigration die Mikrovilli-Strukturen der Plexusepithel-Zelloberfläche mit den Mikrovilli der Neutrophilen in Kontakt. Sehr auffällig war die während der Neutrophilen-Transmigration auftretende Zone mit reduzierter Mikrovilli-Dichte um den Leukozyten herum. Wie die REM-Aufnahme in Abbildung 3.103 C zeigt und in den Abbildungen 3.104 B und C noch deutlicher zu sehen ist, entstand die auffällige Zone mit reduzierter Mikrovilli-Dichte in unmittelbarer Nachbarschaft zum Neutrophilen ausschließlich während der beginnenden Transmigration und nicht während der initialen Neutrophilen-Interaktion. In dem Stadium in dem die Neutrophilen in noch kugelförmiger Gestalt auf dem Epithelzell-Monolayer lagen, kam es zwar zum Kontakt der Mikrovilli-Strukturen der Plexusepithelzellen mit denjenigen der Neutrophilen, allerdings wurden die Mikrovilli-Dichte und -Struktur in unmittelbarer Nähe des Neutrophilen-Epithelzell-Kontakts nicht verändert.

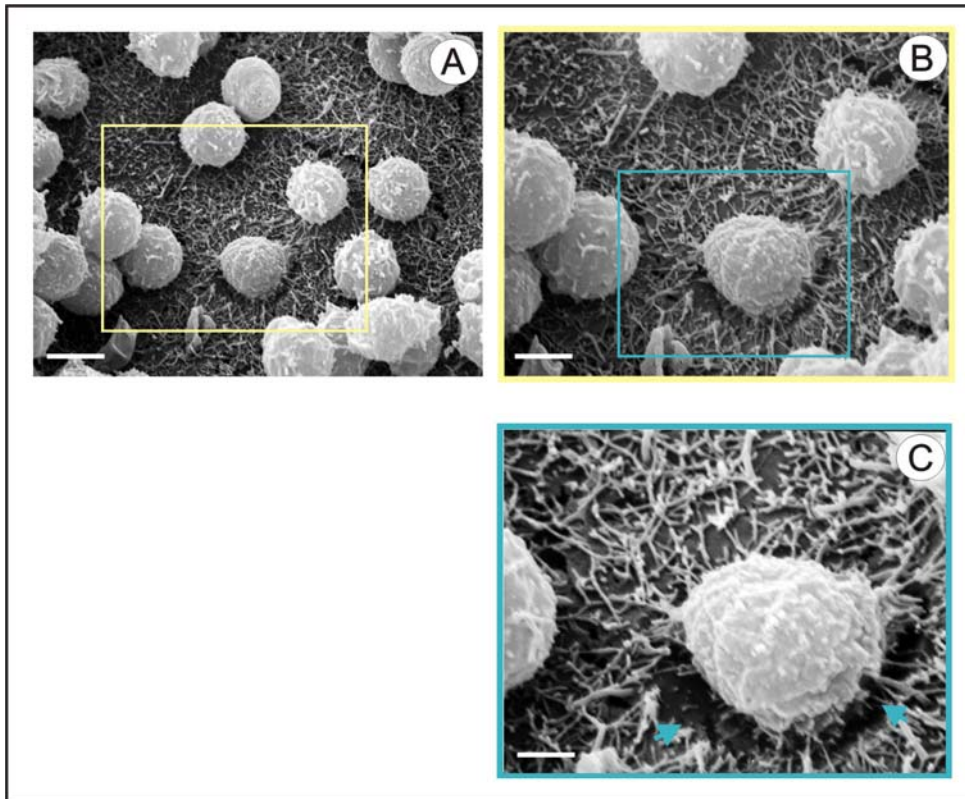


Abb. 3.104 A-C:

REM-Analyse der Neutrophilen-Interaktion mit den entzündungsaktivierten Plexusepithelzellen.

Die Neutrophilen wurden suspendiert in frischem chemisch definiertem Medium zu den Plexusepithelzellen appliziert. Die Entzündungsaktivierung der Plexusepithelzellen mit 2 ng/ml TNF- α erfolgte 4 h vor der Neutrophilen-Zugabe. Inkubationsdauer der Neutrophilen mit den Plexusepithelzellen: 2 h. Die Pfeile weisen auf die Mikrovilli-Kontakte bzw. auf die morphologisch veränderte Zone in unmittelbarer Nachbarschaft zum Neutrophilen, sowie auf die Zell-Zell-Kontakte der Epithelzellen hin. Die Bildausschnitte in höherer Vergrößerung sind jeweils farbig dargestellt. Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht in Abb. A: 5 μ m, in B: 2 μ m und in C: 1 μ m.

In der Abbildung 3.104 C ist der morphologisch veränderte Bereich der Plexusepithelzell-Oberfläche in unmittelbarer Nähe des transmigrierenden Neutrophilen deutlich zu erkennen. Im Gegensatz zu dem nicht aktivierten Plexusepithel, bei dem um den extravasierenden Neutrophilen herum die Mikrovilli-Dichte lediglich reduziert wurde (s. Abb. 3.103), ist auf der REM-Aufnahme in Abbildung 3.104 C ein völliger Verlust der Mikrovilli in unmittelbarer Nachbarschaft zum Neutrophilen zu erkennen. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen in geringerer Vergrößerung, wie sie in Abbildung 3.103 und 3.104 dargestellt sind, suggerieren ein Einsinken des neutrophilen Granulozyten in den Plexusepithelzell-Monolayer. Die Mikrovilli-Interaktion des Plexusepithels zum Neutrophilen wird während der Transmigration zunächst nicht unterbrochen (s. Abb. 3.104 C). Ob der Mikrovilli-Kontakt zu einem späteren Transmigrations-Zeitpunkt abreißt, wie die Abbildung 3.103 A bis C vermuten lassen, lässt sich basierend auf den REM-Analysen allein nicht bestätigen. Generell verdeutlichen

die Abbildungen 3.103 und 3.104, dass die Neutrophilen-Transmigration nicht spezifisch im Bereich der Zellgrenzen der Plexusepithelzellen erfolgte.

Um den Effekt der von den Neutrophilen sezernierten Substanzen auf die Mikrovilli-Ausprägung des Plexusepithels zu analysieren, wurde 9hNkCDM zu den Epithelzellen appliziert. Der Vergleich der Abbildungen 3.105 C und D mit den REM-Aufnahmen der Abbildungen 3.105 A und B zeigt, dass die Inkubation des 9hNkCDMs mit den Plexusepithelzellen zu einer geringfügig verminderten Ausbildung der Mikrovilli auf der Epithelzell-Oberfläche führte.

Der Vergleich des mit 2 ng/ml TNF- α entzündungsaktivierten Plexusepithels mit dem des nicht stimulierten Epithels ergab, dass die durch TNF- α aktivierten Epithelzellen eine vergleichsweise reduzierte Ausprägung der Mikrovilli aufwiesen (vergl. Abb. 3.103 und 3.104).

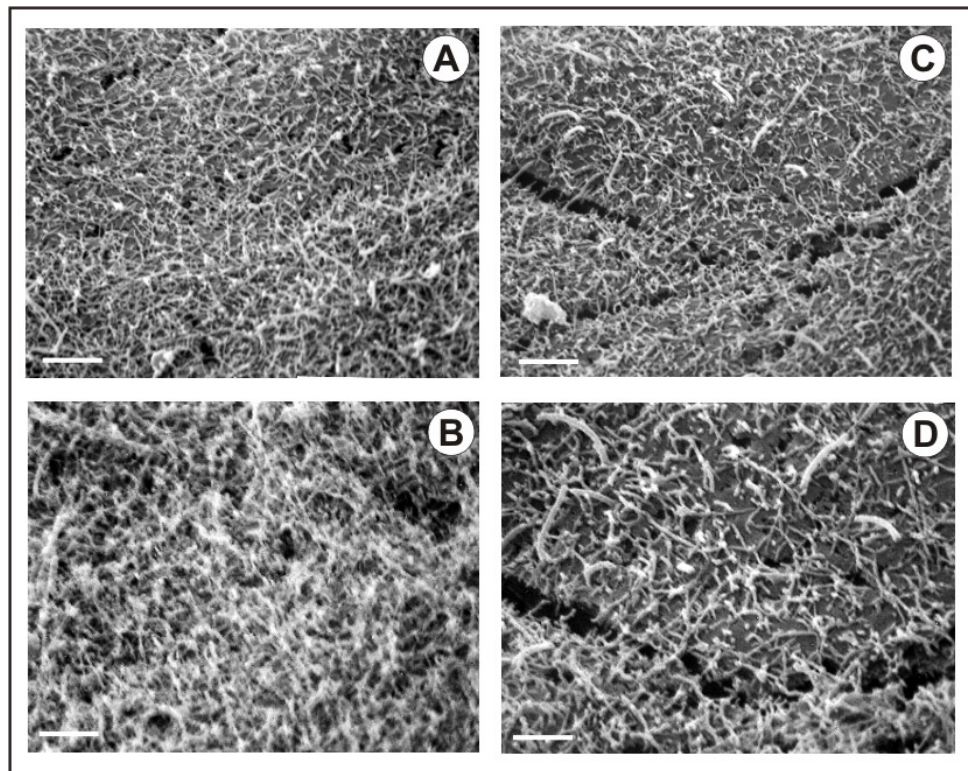


Abb. 3.105 A-D:

Der Einfluss des NkCDMs auf die Morphologie der Mikrovilli der Plexusepithelzellen.

A u. B: Plexusepithel ohne NkCDM-Kontakt.

C u. D: Inkubation des 9hNkCDM mit den Plexusepithelzellen.

Inkubationsdauer des 9hNkCDM mit den Epithelzellen: 2 h. Das chemisch definierte Medium wurde 9 h von den Neutrophilen konditioniert, bevor es zu den Plexusepithelzellen appliziert wurde (9hNkCDM). Neutrophilen konditioniertes Medium (NkCDM).

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht in Abbildung A und C: 5 μ m und in Abbildung B und D: 2 μ m.

Die Plexusepithelzellen für die REM-Analysen wurden freundlicherweise von Susanne Angelow, Institut für Biochemie, WWU-Münster zur Verfügung gestellt.

3.2.5 Die Neutrophilen-Interaktion mit dem Aortenendothel *in situ*

Die bisherigen Untersuchungen der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion bzw. der Neutrophilen-Plexusepithelzell-Interaktion beschränkten sich ausschließlich auf *in vitro* Studien. Bei den im Folgenden beschriebenen REM-Analysen handelt es sich um eine *in situ*-Analyse der Interaktion neutrophiler Granulozyten mit dem Aortaendothel des Schweins. Obwohl es sich bei diesem Endothelzelltyp um makrovaskuläre Endothelzellen der Aorta handelte, war ein Vergleich der *in situ*-Analyse mit den REM-Untersuchungen der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion *in vitro* sehr interessant. Aus technischen Gründen war ausschließlich eine REM-Analyse der Neutrophilen-Transmigration am Aortenendothel *in situ* durchführbar.

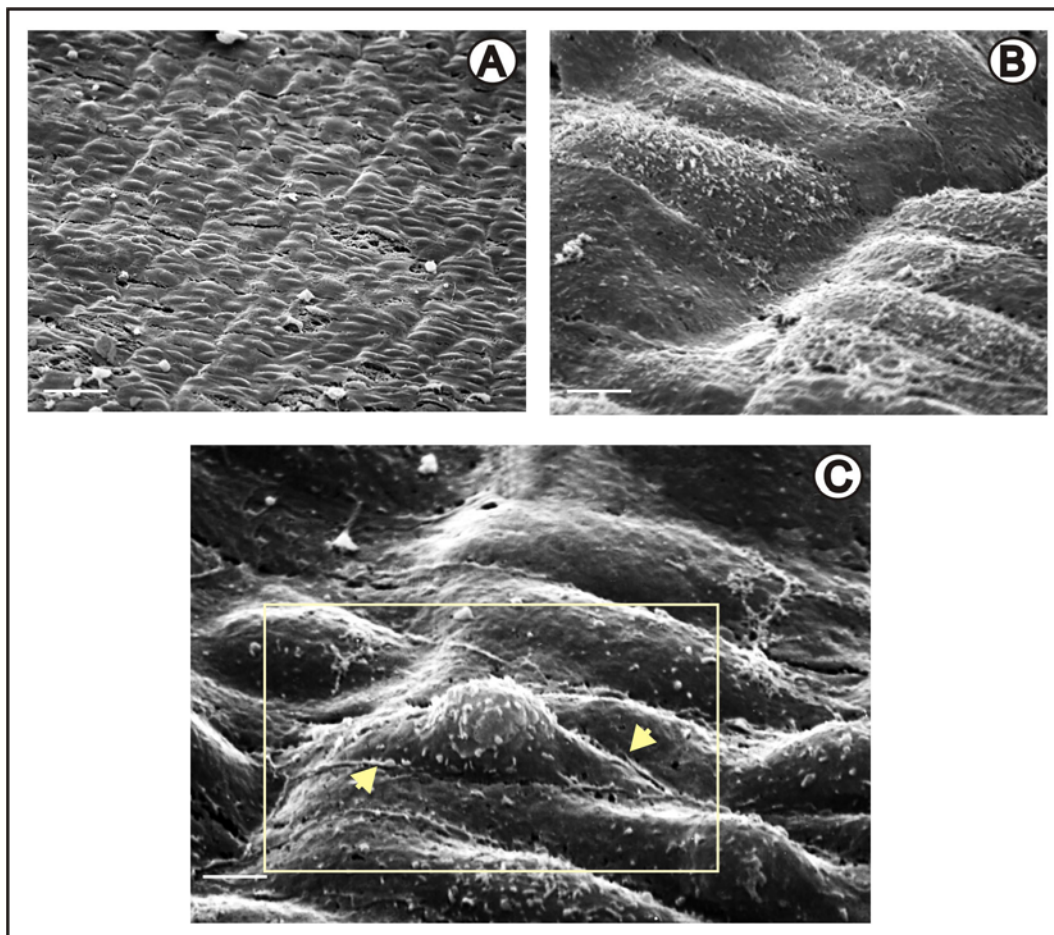


Abb. 3.106 A bis C:

Morphologische Untersuchung der Interaktion von Neutrophilen mit dem entzündungsaktivierten Aortaendothel des Schweins *in situ*.

A u. B: Aortaendothel des Schweins *in situ*.

C: Transmigration eines neutrophilen Granulozyten durch das Aortenendothel *in situ*.

Die Neutrophilen wurden in frischem chemisch definiertem Medium zum Aortengewebe appliziert. Die Entzündungsaktivierung des Aortengewebes mit 2 ng/ml TNF- α erfolgte 4 h vor der Neutrophilen-Zugabe. Inkubationsdauer der Neutrophilen mit dem Aortengewebe: 2 h. Die Pfeile wiesen auf die marginal folds hin.

Vergrößerung: der Maßstabsbalken entspricht in Abb. A: 30 μ m, in B und C: 3 μ m.

Die REM-Aufnahmen der Abbildungen 3.106 A und B zeigen, dass das Aortaendothel des Schweins eine großflächige, wellenförmige Struktur aufweist. Interessanterweise zeigten die REM-Analysen der Aorta-Endothelzellen eine ähnliche Ausprägung der Mikrovilli auf der Zelloberfläche und eine identische Struktur der *marginal folds* wie die PBCEC (vergl. Abb. 3.106 B und C mit Abb. 3.76 A). Sowohl die *marginal folds* als auch die Mikrovilli auf der Endothelzell-Oberfläche, die ebenfalls *in situ* nachgewiesen werden konnten, verdeutlichen die hohe *in vivo*-Kompatibilität der PBCEC.

Wie auf dem REM-Bild in der Abbildung 3.106 C deutlich zu sehen ist, transmigriert der neutrophile Granulozyt flächig auf der Endothelzell-Oberfläche. Eine Korrelation der Neutrophilen-Transmigration zu den *marginal folds* konnte weder räumlich noch strukturell beobachtet werden.

4. Diskussion

Im gesunden Organismus sorgt die Blut-Hirn-Schranke für ein konstantes Hirnmilieu (Homöostase), das als Voraussetzung für eine normale Hirnfunktion gilt. Darüber hinaus nimmt das Zentrale Nervensystem (ZNS) eine besondere Stellung in der Immunüberwachung ein, da die festen Zell-Zell-Kontakte (*tight junctions*) des cerebralen Endothels den Durchtritt der Entzündungszellen durch die endotheliale Barriere begrenzen. Dieses Immunprivileg ist unter bestimmten pathologischen Bedingungen, gestört und kann zum Durchtritt von Leukozyten durch die endotheliale Barriere führen, was mit zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise mit der Multiplen Sklerose oder dem Schlaganfall in Verbindung gebracht wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch eine kombinierte immunzytochemische, biophysikalische und morphologische Analyse der entzündungsabhängigen Veränderungen an der Blut-Hirn-Schranke (BHS) ein optimiertes *in vitro*-BHS-Entzündungsmodell zur Untersuchung des transmigratorischen Prozesses immunkompetenter Zellen durch das Endothel primär kultivierter Kapillarendothelzellen aus dem Gehirn des Schweins (PBCEC) etabliert. Im Fokus der Untersuchungen stand die Frage, welchen Einfluss Cytokine (u. a. TNF- α) und Immunzellen auf die Ausprägung der BHS-Funktion haben und wie die Diapedese der Leukozyten durch die cerebrale endotheliale Barriere reguliert wird. Grundlegende Voraussetzung dafür war die Etablierung eines serumfreien, chemisch definierten BHS-Kulturmodells, das die Analyse der entzündungsinduzierenden Cytokin-Effekte unter kontrollierten Bedingungen ermöglichte. Das in der vorliegenden Studie beschriebene Entzündungskulturmodell der Blut-Hirn-Schranke wies eine hohe *in vivo*-Kompatibilität auf und ermöglichte zudem die Induktion entzündlicher Prozesse unter kontrollierten Bedingungen, ohne dass dadurch die Barriereigenschaften und die Morphologie der Endothelzellen verändert wurden. Mit Hilfe dieses BHS-Modells wurde somit erstmals eine gezielte Analyse der transendothelialen Migration von Leukozyten *in vitro* unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen ermöglicht.

4.1 BHS-Modelle im Vergleich

Zentrales Kriterium für die Beurteilung der Endothelzeldifferenzierung aus cerebralen Kapillaren *in vitro* ist die Ausbildung einer effizienten Barrierefunktion, die die Eigenschaften der BHS *in vivo* möglichst exakt widerspiegelt. Das kennzeichnende Charakteristikum der Blut-Hirn-Schranke ist deren Ausbildung fester Zell-Zell-Kontakte, der sogenannten *tight junctions*. Ihre Dichtigkeit korreliert eng mit ihrem elektrischen Widerstand. Um die Barrierefunktion der Kapillarendothelzellen in jedem Kulturstadium quantitativ und nicht-invasiv zu bestimmen, ist es notwendig impedanzspektroskopisch den transendotheliale Widerstand (TER) des Endothelzell-Monolayers zu messen. Trotz der engen Korrelation des TERs mit der wichtigsten (der isolierenden) Eigenschaft der cerebralen Kapillarendothelzellen des Hirnparenchyms, werden TER-Messungen in Blut-Hirn-Schranke-Modellen dennoch nicht routinemäßig durchgeführt (Rubin & Staddon, 1999).

Nur selten wurden bisher Kulturmodelle der Blut-Hirn-Schranke etabliert, die hohe transendotheliale Widerstände erreichten (Rubin & Staddon, 1999). Diese wiesen jedoch meist keine chemisch definierten Kulturbedingungen auf. Die Untersuchungen der vorliegenden Studie zeigten, dass die Ausbildung des barrierebildenden Phänotyps der PBCEC in starkem Maße von der Anwesenheit von Serum im Kulturmedium bestimmt wurde. So erreichten die PBCEC unter Hydrocortison-haltigen, chemisch definierten Kulturbedingungen in Abwesenheit von Serum transendotheliale Widerstände von 1000 bis 2000 $\Omega \times \text{cm}^2$. Die meisten der kultivierten cerebralen Kapillarendothelzellen, die unter serumhaltigen Bedingungen kultiviert werden, erreichen transendotheliale Widerstands-Werte, die 10 $\Omega \times \text{cm}^2$ nicht überschreiten. Diese TER-Werte sind eher mit denen von Aortenendothelzellen vergleichbar. Ergo weisen deren Zell-Zell-Kontakte wenig Gemeinsamkeit mit den *tight junctions* cerebraler Endothelzellen auf (Rubin & Staddon, 1999).

In vivo sind transendotheliale Widerstände von 2000 $\Omega \times \text{cm}^2$ in Blutgefäßen der Hirnhaut (Rubin & Staddon, 1999) und Werte von 1200-8000 $\Omega \times \text{cm}^2$ in cerebralen Kapillarendothelzellen des Hirnparenchyms gemessen worden (Rapport et al., 1985; Butt et al., 1990). Allerdings sind diese *in vivo*-Widerstandswerte des Hirnparenchyms umstritten (Allt & Lawrenson, 1997). In Kultur sollten cerebrale Kapillarendothelzellen TER-Werte zwischen 500 und 600 $\Omega \times \text{cm}^2$ aufweisen, um annähernd die Barrierefunktion der BHS wiederzuspiegeln (Rubin et al., 1991b). Zahlreiche *in vitro*-Kulturen cerebraler Kapillarendothelzellen, die die BHS-Eigenschaften möglichst exakt widerspiegeln sollten, sind als Modelle der Blut-Hirn-Schranke bereits etabliert worden (Dehouck et al., 1990; Abbot et al., 1992; Durieu-Trautmann et al., 1994; Rubin et al., 1991; Staddon et al., 1995; Wolburg et al., 1994). Der Verlust der *in vivo*-BHS-Charakteristika dieser kultivierten cerebralen Endothelzellen äußert sich

primär in deren niedrigen Werten des TERs, die zwischen 100 und $600 \Omega \times \text{cm}^2$ liegen. So erzielten Raub et al. (1992) in ihrem BHS-Kulturmodell TER-Werte von $160 \Omega \times \text{cm}^2$, Dehouck et al. (1990) dagegen durchschnittlich $661 \Omega \times \text{cm}^2$. Die trans-endothelialen Widerstandsmessungen des hier verwendeten PBCEC-Modells erreichten dagegen mit $2000 \Omega \times \text{cm}^2$ Werte, die der *in vivo*-Situation im Vergleich zu den bisherigen *in vitro*-Kulturmodellen am ähnlichsten waren.

Eine häufig genutzte Strategie, cerebralen Endothelzellen in Kultur die charakteristischen Eigenschaften der Blut-Hirn-Schranke zu verleihen, ist deren gemeinsame Kultivierung mit Astrozyten oder ihre Kultur in Astrozyten-konditioniertem Medium. Wie Astrozyten die cerebralen Endothelzellen und den molekularen Mechanismus ihrer Signalübermittlung auf die Endothelzellen beeinflussen, ist allerdings nicht genau bekannt. Dennoch sind zahlreiche BHS-Kulturmodelle aus Co-Kulturen cerebraler Endothelzellen mit Astrozyten entwickelt worden (Dehouck et al., 1990; Isobe et al., 1996; Hayashi et al., 1997; Stanness et al., 1997). Auch Astrozyten- oder C6-Glioma-Zell-konditioniertes Medium wird zur Induzierung der BHS-charakteristischen Eigenschaften der Endothelzellen *in vitro* verwendet (Rubin et al., 1991b; Raub et al., 1992; Hurst & Fritz, 1996; Rist et al., 1997). Rubin et al. (1991a) erreichten durch die Kultivierung cerebraler Endothelzellen mit Astrozyten-konditioniertem Medium in Kombination mit cAMP in ihrem Kultursystem TER-Werte von durchschnittlich $625 \Omega \times \text{cm}^2$ und Maximalwerte von $1500 \Omega \times \text{cm}^2$. Da aber der Effekt der Astrozyten auf die cerebralen Endothelzellen nicht genau bekannt ist und zudem die Induktion der barrierebildenden *tight junctions* in diesem Kontext *in vivo* noch nicht nachgewiesen werden konnte (Rubin & Staddon, 1999), verhindert die gemeinsame Kultur von Endothelzellen mit Astrozyten die Schaffung konstanter und chemisch definierter Kulturbedingungen.

4.2 Das BHS-Entzündungsmodell

4.2.1 Der Einfluss von Serum und Glucocorticoiden

Warum sollte auf Serum verzichtet werden ?

In den meisten Endothelzell-Kulturmodellen verschiedenster Tierspezies werden Standardkulturbedingungen mit hohen Konzentrationen von Serum angewandt (Rubin & Staddon, 1999). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Serum einen erheblichen Einfluss auf die Zellen ausübt. Durch den Entzug des permeabilitätssteigernden und entzündungsstimulierenden Serums war es möglich, TER-Werte der PBCEC von durchschnittlich $500 \Omega \times \text{cm}^2$ zu erzielen. Durch den Zusatz physiologischer Mengen an Hydrocortison wurde der transendotheliale Widerstand auf bis zu $2000 \Omega \times \text{cm}^2$ gesteigert. Die vergleichende transmissionselektronenmikroskopische Analyse des Serum-Effekts auf die PBCEC zeigte, dass die in Serum kultivierten Endothelzellen im Gegensatz zu den PBCEC, die unter serumfreien, Hydrocortison-haltigen Kulturbedingungen kultiviert wurden, erhebliche Unterschiede aufwiesen. So zeigten die PBCEC in serumfreien, Hydrocortison-haltigem Medium eine klar definierte *tight junction*-Region, verbunden mit einem flächig langgestreckten Zellkörper auf und waren fest mit dem Kultursubstrat verankert. Ausschließlich unter diesen Kulturbedingungen kam es zur Ausbildung Endothelzell-spezifischer Strukturen an den Kontaktstellen benachbarter Zellen, den sog. *marginal folds*, die als typische *in vivo*-Endothelzellstrukturen betrachtet werden. Insgesamt charakterisierte die ultrastrukturelle Beschaffenheit der PBCEC einen morphologischen Zustand, der vergleichbar mit der *in vivo*-Situation war.

Im Gegensatz dazu, verursachte der Serumzusatz von der basolateralen Zellseite in Abwesenheit von Hydrocortison ein Ablösen der Zellen vom Substrat. Darüber hinaus war die *tight junction*-Region unter dieser Kulturbedingung kaum entwickelt, die Zellen wirkten hypertrophisch und die Ausbildung der *marginal folds* unterblieb. Auch die rasterelektronenmikroskopischen Analysen zeigten, dass die Zellgrenzen unter serumhaltigen Kulturbedingungen wesentlich schwächer ausgeprägt waren. Diese morphologischen Unterschiede korrelierten direkt mit der impedanzspektroskopisch ermittelten Barrierefunktion der PBCEC unter den unterschiedlichen Kulturbedingungen. Die TER-Filtermessungen belegten, dass in Gegenwart von Serum im Kulturmedium die Barrierefunktion der Endothelzellen im Vergleich zum serumfreien, Hydrocortison-haltigen Kultursystem erheblich geschwächt wurde.

Die impedanzspektroskopischen TER-Filtermessungen ergaben weiterhin, dass der Einfluss des Serums eine Polarität besitzt. Nur bei Einwirken von der basolateralen Seite der PBCEC (entspricht aus anatomischer Sicht der Hirnseite) wurde der TER der PBCEC um ein Vielfaches gesenkt, was einem weitgehenden Verlust der Barriere-

refunktion der cerebralen Endothelzellen entsprach und was sich nach ultrastruktureller Analyse in der gestörten Integrität des Endothelzell-Monolayers deutlich widerspiegelte. Die Ergebnisse der impedanzspektroskopischen Messungen korrelieren also direkt mit denen der ultrastrukturellen Untersuchungen. Bei Einwirken von der apikalen Zellseite wurde der TER dagegen kaum beeinträchtigt. So zeigte auch die Untersuchung der PBCEC-Barrierefunktion mit Hilfe der ECIS-Methode, dass die Zugabe des Serums von der apikalen Seite, die Barrierefunktion der PBCEC kaum beeinflusste. Die Serum-Zugabe zu den PBCEC verursachte eine kurzzeitige und reversible Senkung der ECIS-Parameter-Werte von R_b und α , die jedoch annähernd wieder ihre Ausgangswerte erreichten.

Unter physiologischen Bedingungen werden im Säugetier schon in einem frühen Entwicklungsstadium Serumproteine im Gehirn ausgeschlossen (Saunders et al., 1991), so dass die Auswirkung der Serumpolarität in dem PBCEC-Kulturmodell auf eine physiologische Polarität der PBCEC deutet, die zahlreichen BHS-Kulturmodellen fehlt (Isobe et al., 1996). Dennoch wird in den meisten Kulturmodellen der Blut-Hirn-Schranke Serum verwendet, ohne auf die physiologische Polarität der cerebralen Endothelzellen zu achten. Interessanterweise spiegelte sich der polare Effekt des Serums nicht in der Expression der *tight junction*-assoziierten Proteine ZO-1, Claudin-5 und Occludin der PBCEC wieder. Unabhängig davon, ob die PBCEC von der apikalen oder basolateralen Zellseite mit serumhaltigem CDM inkubiert wurden, führte das Serum nicht zu einer signifikanten Umstrukturierung der genannten *tight junction*-Proteine.

Die Befunde dieser und weiterer Arbeiten (Krischke, 2000; Nitz, 2001) zeigten, dass die Wirkung des Serums auf die PBCEC-Kulturen sehr komplex und heterogen ist. Ausschlaggebend für den Verzicht auf Serum im Kulturmedium der PBCEC waren allerdings die Befunde der immunzytologischen Untersuchungen. Diese zeigten, dass die Inkubation der PBCEC in serumhaltigem Medium sowohl von der luminalen als auch von der abluminalen Zellseite entzündliche Veränderungen auslöste. Den Nachweis erbrachte die Expression des E-Selektins, einem Adhäsionsmolekül der sogenannten Adhäsionskaskade des entzündungsaktivierten Endothels. Die PBCEC, die unter serumfreien, Hydrocortison-haltigen Bedingungen kultiviert wurden, wiesen dagegen keine E-Selektin-Expression auf.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass der Serumzusatz zum Kulturmedium eine entzündungsinduzierende und permeabilitätssteigernde Wirkung auf die kultivierten cerebralen Endothelzellen ausübte. Eine erfolgreiche Charakterisierung des Transmigrationsprozesses der Leukozyten durch einen kontrolliert entzündungsaktivierten Endothelzell-Monolayer schließt ein serumhaltiges Kultursystem der BHS also aus.

Nichtsdestotrotz wird, ungeachtet des inflammatorischen Effekts und der polaritätsbedingten permeabilitätssteigernden Wirkung des Serums, in den meisten BHS-Kul-

turmodellen, die zur Untersuchungen entzündlicher Prozesse und der Charakterisierung der Endothelzell-Leukozyten-Interaktion eingesetzt werden, standardmäßig Serum ins Kulturmedium zugesetzt (Adamson et al., 2002; Etienne-Manneville et al., 2000; Frieser et al., 1997; Kallmann et al., 2000; Sixt et al., 2001; Sorokin et al., 1997; 1994; Wong et al., 1999). Auch in Kulturmodellen der peripheren vaskulären Endothelzellen, die zur Analyse entzündlicher Prozesse, insbesondere der Leukozyten-Endothel-Interaktion eingesetzt werden, wird serumhaltiges Kulturmedium verwendet (Nicholas et al., 1988; Del Maschio et al., 1996; Allport et al., 1997b; Burns et al., 1997; Sandig et al., 1997; Martin-Padura et al., 1998; Burns et al., 1999; Burns et al., 2000; Allport et al., 2002), ohne zuvor die unspezifischen Effekte des Serums auf die Endothelzellen zu analysieren.

Warum ist die Ausprägung der *tight junctions* im BHS-Modell so wichtig ?

Da das Ziel dieser Arbeit die Analyse des Transmigrationsmechanismus von Leukozyten durch das cerebrale Endothel der Blut-Hirn-Schranke war, stand die Untersuchung der Beteiligung der *tight junctions* während der Diapedese der Leukozyten im Fokus der Analysen. Eine umfassende Charakterisierung der *tight junction*-assoziierten Proteine der PBCEC vor Beginn der eigentlichen Endothel-Leukozyten-Interaktionsstudien war somit von essentieller Bedeutung.

Die Studien von Burns et al. (1997) zeigten beispielsweise, dass die durch Astrozyten-konditioniertes Medium induzierten *tight junctions* im HUVEC-Modell nicht kontinuierlich die Zellgrenzen säumen, denn an den Punkten, an denen drei Endothelzellen zusammenstoßen (*tricellular corners*) fanden sich ca. 10 µm große Lücken. Diese Diskontinuitäten konnten Burns und Mitarbeiter immunzytologisch durch den Nachweis der *tight junction*-Proteine ZO-1 und Occludin zeigen. So zeigten Burns et al., 1997; Burns et al., 2000), dass die Transmigration neutrophiler Granulozyten die Integrität der *tight junctions* des HUVEC-Monolayers nicht beeinträchtigte, da die Leukozyten durch die *tight junction*-freien *tricellular corners* transmigrierten. Derartige Befunde unterstreichen die Notwendigkeit, vorab der Leukozyten-Transmigrations-Experimente die Kontinuität der *tight junctions* in *in vitro*-Endothelzell-Kulturmodellen detailliert zu untersuchen. Unregelmäßigkeiten in der Ausbildung der *tight junctions* an den *tricellular corners* wurden auch von Barry et al. (1995) durch die immunzytologische Analyse des ZO-1-Proteins an Endothelzellen der Cornea nachgewiesen. Gleiches zeigten Walker et al. (1994) mit Hilfe von *freeze-fracture*-Analysen an Lungenkapillarendothelzellen. Obwohl davon ausgegangen werden sollte, dass ein Endothelzell-Monolayer eines Blut-Hirn-Schranke-Kulturmodells prinzipiell keine Unregelmäßigkeiten bezüglich der *tight junction*-Expression aufweist, kann es dennoch kulturbedingt

zu solchen Diskontinuitäten der Zell-Zell-Kontakte kommen, so dass eine entsprechende Untersuchung essentiell ist.

Zur detaillierten Charakterisierung der *tight junctions* und der Zellintegrität der cerebralen Endothelzellen in dem PBCEC-Modell wurden ultrastrukturelle, immunzytochemische und biophysikalische Analysen durchgeführt. Die immunzytologische Untersuchung der spezifischen *tight junction*-assoziierten Proteine, wie ZO-1, Occludin und Claudin-5 haben gezeigt, dass der Entzug von Hydrocortison aus dem serumfreien Kulturmedium einen entscheidenden Einfluss auf die Expression der untersuchten Proteine ausübte. Interessant war dabei, dass der Grad der Beeinträchtigung der untersuchten *tight junction*-Proteine, der sich in einer verzerrten und geschwächten Fluoreszenzmarkierung der Zellgrenzen manifestierte nicht identisch war. So wurde durch die Abwesenheit des Hydrocortisons im chemisch definierten Medium (CDM) der PBCEC die ZO-1-Expression am stärksten beeinträchtigt, die Occludin-Expression dagegen kaum. Das Claudin-5-Protein nahm diesbezüglich eine Mittelstellung ein. Wie die immunzytochemische Analyse zeigte, kam es dagegen in Gegenwart von Hydrocortison zu einer distinkten und verstärkten Ausprägung der untersuchten *tight junction*-assoziierten Proteine. Diskontinuitäten konnten nicht beobachtet werden. Sowohl die unbeeinträchtigte Expression der *tight junction*-assoziierten Proteine in Anwesenheit von Hydrocortison, als auch die durch den Entzug des Hydrocortisons verursachte Störung der Expression der untersuchten Proteine, spiegelte sich in den hohen bzw. erniedrigten transendothelialen Widerständen der PBCEC wieder.

4.2.2 Die Barrierefunktion

Wie wirkt sich Hydrocortison auf die Barrierefunktion der BHS *in vitro* aus ?

Zusätzlich zu den morphologischen und immunzytochemischen Analysen wurde das BHS-Entzündungsmodell mit Hilfe der sog. ECIS-Technik (*electrical cell-substrate impedance sensing*), einer relativ neuen impedanzspektroskopischen Methode, untersucht. Diese Technik wurde erstmals von Giaever & Keese (1991) und Lo et al. (1995) an Fibroblasten bzw. Epithelzellen angewandt. Mit der ECIS-Methode war es nicht nur möglich den transendothelialen Widerstand zu messen, sondern zeitgleich die den Gesamtwiderstand einer Zellschicht beschreibenden einzelnen Komponenten, den Zell-Zell-Kontakt (R_b), den Zell-Substrat-Kontakt (α) und die Membrankapazität (C_m) getrennt voneinander zu bestimmen. Die ECIS-Technik war damit zur Bearbeitung der Aufgabenstellung dieser Studie, der Leukozyten-Extravasation durch das Endothel der BHS *in vitro*, ein hervorragendes Werkzeug.

Die Fähigkeit, mit Hilfe der ECIS-Technik zeitaufgelöst Veränderungen der Zellmorphologie in Form der drei Parameter R_b , α und C_m zu bestimmen, war nicht nur zur Untersuchung des Einflusses inflammatorischer Substanzen oder Immunzellen auf die PBCEC wichtig, sondern wurde ebenfalls genutzt, um die Ausgangsbedingungen des Entzündungsmodells umfassender zu charakterisieren. So wurde die direkte Wirkung des Hydrocortisons auf den Zell-Zell-, den Zell-Substrat-Kontakt und die Membrankapazität während der Barriereentwicklung der PBCEC analysiert. Dabei konnte neben der Ausprägung der Zellmorphologie, vergleichend die zeitliche Reihenfolge der Entwicklung der drei Parameter während der Ausprägung der BHS-Barriereigenschaften bestimmt werden. Besonders interessant war dabei die Frage, ob durch den Hydrocortison-Zusatz zuerst der Zell-Substrat- oder der Zell-Zell-Kontakt ausgeprägt wurde. Die ECIS-Analyse des Hydrocortison-Effekts auf die Barriereentwicklung der PBCEC wurde vom 4. DIV, dem Kulturtag, an dem der Endothelzell-Monolayer das konfluente Entwicklungsstadium erreicht hatte und von serumhaltige auf serumfreie Kulturbedingungen umgestellt wurde, bis zum 6. DIV durchgeführt, der Tag an dem die BHS-Barrierefunktion der PBCEC normalerweise ausgeprägt war.

Die Ergebnisse der ECIS-Messung zeigen deutlich, dass während der Bildung der BHS-typischen Barrierefunktion der PBCEC zwei unterschiedliche Entwicklungsphasen definierbar waren, die sich in Anwesenheit von Hydrocortison besonders deutlich hervorhoben. Die primäre Phase zeichnete sich durch einen parallelen Anstieg von R_b und α aus. In der sekundären Entwicklungsphase trennte sich der Kurvenverlauf von α und R_b , wobei R_b weiterhin vergleichsweise steil anstieg, der Wert für α dagegen verlangsamt aber stetig zunahm. In Abwesenheit von Hydrocortison zeichnete sich der biphasische Verlauf von R_b und α nicht so deutlich ab, obschon er nachweisbar war. Im Gegensatz zu den Hydrocortison-haltigen Kulturbedingungen stieg der Wert für α kaum an, wohingegen der Wert für R_b erst in der sekundären Phase, also erst nach ca. 7 Stunden signifikant anstieg.

Insgesamt erreichten R_b und α in Anwesenheit von Hydrocortison wesentlich höhere Endwerte als ohne den Hydrocortison-Zusatz. Der Widerstand der Membrankapazität blieb unter beiden Versuchsbedingungen konstant. Bei dem barriereverstärkenden Effekt des Hydrocortisons handelte es sich generell um einen langandauernden Prozess, der einen Sättigungsverlauf aufwies und nach 2-3 Tagen sein Maximum erreichte.

Interessanterweise konnten Moy et al. (2000) bei der Untersuchung auf HUVECs zeigen, dass es während des regenerativen Widerstandsanstiegs des Endothelzell-Monolayers nach der durch die Histamin-Applikation verursachten Abnahme des transendothelialen Widerstands zuerst zu einer Verstärkung des Zell-Matrix-Kontakts und erst etwas verzögert zu einem Anstieg des Zell-Zell-Kontakts kam. Im Gegensatz da-

zu entwickelten sich bei der Hydrocortison-bedingten Barrierebildung der PBCEC der Zell-Matrix und der Zell-Zell-Kontakt in der Anfangsphase zeitgleich.

Daraus resultierte die Frage, ob die Festigung des Zell-Matrix-Kontakts und der Zell-Zell-Kontakte nach Umstellung der PBCEC auf chemisch definierte Kulturbedingungen mit Zusatz von Hydrocortison zwangsläufig parallel verläuft und ob somit eine Abhängigkeit in der Entwicklung der Parameter R_b und α besteht.

Die Barrierefunktion kultivierter Endothelzellen in Abhängigkeit vom Kulturtag

Moy et al. (2000) zeigten, dass die am Gesamtwiderstand einer konfluenten HUVEC-Zellschicht beteiligten Parameter R_b , α und C_m in Abhängigkeit vom Kulturtag der Zellen unterschiedlich ausgeprägt werden. HUVECs, die sich seit 5 Tagen in einem postkonfluenten Entwicklungszustand befanden, wiesen einen stärkeren Zell-Zell-Kontakt, also höhere R_b -Werte, dafür aber niedrigere Werte für C_m und α auf als diejenigen Zellen, die erst seit einem Tag einen konfluenten Zell-Monolayer ausgebildet hatten. Ähnliches konnten auch Davies et al. (1993) durch Interferenz-Reflektionsmikroskopie zeigen.

Die Untersuchungen des entzündlichen Prozesses und der Leukozyten-Endothel-Interaktion im BHS-Entzündungsmodell der vorliegenden Studie wurden grundsätzlich an dem gleichen Kulturtag durchgeführt, und zwar an demjenigen, an dem die ECIS-Parameter-Werte für R_b und α der PBCEC ihr Maximum erreichten, die Barrierefunktion der Endothelzellen also optimal ausgeprägt war.

Moy et al. (2000) postulierten zudem, dass die nach einem widerstandssenkendem Stimulus (Histamin) einsetzende Regeneration der Barrierefunktion einer Endothelzellschicht in Form der sequentiellen Entwicklung der Parameter R_b , α und C_m vom postkonfluenten Entwicklungsalter des Endothelzell-Monolayers abhängt. Der während des regenerativen Anstiegs des Gesamtwiderstands zuerst steigende Zell-Matrix-Kontakt der Endothelzellschicht, dem erst verzögert die Festigung des Zell-Zell-Kontakts folgte, war bei einem HUVEC-Monolayer zu beobachten, der erst seit einem Tag einen konfluenten Entwicklungszustand aufwies. Dieser Effekt konnte in dem HUVEC-Monolayer, der bereits vor 5 Tagen einen konfluenten Zustand erreicht hatte, nicht nachgewiesen werden.

Der Vergleich der Regenerationsphase der ECIS-Parameter R_b und α der PBCEC des 7. DIV zeigten nach der Zugabe von $TNF-\alpha$ einen identischen Kurvenverlauf wie die HUVECs, die seit einem Tag konfluent waren: der der Widerstandssenkung nach $TNF-\alpha$ -Zusatz folgende Wiederanstieg des Gesamtwiderstands erfolgte konstant durch den initialen Anstieg des Parameters α , dem der Anstieg von R_b zeitlich verzögert folgte. Dabei kam es entweder unabhängig voneinander zur Stärkung des Zell-

Substrat- und des Zell-Zell-Widerstands oder der schnellere Anstieg des Zell-Substrat-Widerstands war die Voraussetzung für die Stärkung des Zell-Zell-Kontakts.

Die Parameter R_b und α der PBCEC des 9. DIV wurden durch die TNF- α -Applikation dagegen irreversibel gesenkt, so dass ein Vergleich ihrer sequentiellen Regeneration nicht möglich war.

Die TNF- α induzierte Abnahme der ECIS-Parameter-Werte von R_b und α der PBCEC verschiedener Kulturtage (7. DIV und 9. DIV) verlief extrem unterschiedlich. Eine deutliche Parallele konnte zu den Untersuchungen von Moy et al. (2000) gezogen werden, die den Einfluss des pro-inflammatorischen Histamins auf HUVECs unterschiedlicher Kulturtage mit Hilfe der ECIS-Methode lokalisiert haben. Die Autoren konnten zeigen, dass sich Histamin, je nach Kulturtage der postkonfluenten HUVECs, unterschiedlich auf den Zell-Matrix-Kontakt auswirkte. In seit 5 Tagen postkonfluenten HUVECs wurde der Zell-Substrat-Kontakt (α) durch die Zugabe von Histamin nicht beeinflusst, wogegen der Zell-Zell-Kontakt (R_b) signifikant gesenkt wurde. Interessanterweise wurde in der vorliegenden Arbeit Identisches beobachtet. So kam es durch die Zugabe des TNF- α zu den PBCEC des 9. DIV ebenfalls nicht zu einer direkten Senkung des Wertes von α , wohingegen der Wert von R_b drastisch reduziert wurde. Im Gegensatz zum Verlauf des Wertes von R_b in den Studien von Moy et al. (2000), war die Schwächung des Zell-Zell-Kontakts der PBCEC allerdings irreversibel.

Die seit einem Tag einen konfluenten HUVECs wiesen dagegen eine fast gleichzeitige Senkung des Werte für α und R_b auf. Eine höhere zeitliche Auflösung zeigte allerdings, dass α etwas zeitverzögert im Vergleich zu R_b gesenkt wurde. Wie auch Histamin auf die HUVECs, so wirkte sich TNF- α direkt auf die Endothelzell-Adhäsion und die Zell-Zell-Kontakte der PBCEC des 7. DIV aus, wobei die Schwächung der interendothelialen Zell-Kontakte, wie auch im HUVEC-Modell von Moy et al. (2000) größer war. Ein etwas verzögerter Abfall der Werte des Zell-Matrix-Kontakts nach der Erniedrigung der Werte des Zell-Zell-Kontakts konnte teilweise beobachtet werden, war jedoch aufgrund des groben Zeitfensters und der Primärkultur-bedingten Schwankungen der PBCEC nicht konstant detektierbar.

Wie die Analyse des Effekts eines externen Stimulus (TNF- α) auf den Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakt der PBCEC mit Hilfe der hochsensitiven ECIS-Technik demonstrierte, differierten die Parameter R_b und α in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der eingesetzten PBCEC enorm. Die ECIS-Messungen der vorliegenden Arbeit und der Studie von Moy et al. (2000) verdeutlichten, dass es dabei nicht nur wichtig war, dass die Endothelzellen einen konfluenten Monolayer ausbildeten, sondern wie lange sie den konfluenten Entwicklungsstatus schon aufwiesen

Die Studien im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass die PBCEC auf den TNF- α -Stimulus mit einer simultanen Antwort der interendothelialen junctionalen Kontakt-

bereiche und der Zell-Matrix-Kontakte reagierten, so dass eine sequentielle und voneinander abhängige Beeinflussung der beiden Parameter R_b und α unwahrscheinlich ist. Dabei ist allerdings zu bedenken, dass die Auswirkung eines äußeren Stimulus auf die barrierebildenden Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte eines Endothelzell-Monolayers von der jeweiligen Kulturbedingung abhängig ist, wie die ECIS-Studien nach Zugabe des Apoptose-Induktors Cycloheximid gezeigt haben. So kam es durch die Zugabe von CHX in das serumhaltige Medium der PBCEC ebenfalls zu einem Zell-Zell-Kontakt-bedingten Abfall des Gesamtwiderstands, wogegen der Zell-Substrat-Kontakt fast unbeeinträchtigt blieb. Die PBCEC in serumfreiem, Hydrocortisonhaltigem Medium dagegen senkten den Widerstand ihres Zell-Zell- und ihres Zell-Substrat-Kontakts sowohl nach TNF- α als auch nach der Applikation von CHX dagegen zeitgleich. Diese Beobachtung demonstriert den enormen Einfluss der Kulturbedingung bei der Untersuchung der Auswirkung externer Stimuli, wie beispielsweise von Entzündungsaktivatoren, auf die Endothelzell-Barrierefunktion.

Ausschließlich die Anwendung der ECIS-Methode ermöglichte die notwendige detaillierte Beurteilung der Ausprägung der Barrierefunktion der BHS-*in vitro*, die für die Untersuchung der entzündlichen Prozesse essentiell war.

Der Zusammenhang zwischen der Barrierefunktion, der Zellmorphologie und der

Zellform

Parallel zu den ECIS-Analysen wurden REM-Analysen durchgeführt, in denen die biophysikalisch ermittelte Morphologie der PBCEC mit der mikroskopisch sichtbaren Ultrastruktur der Zellen in An- und Abwesenheit von Hydrocortison verglichen wurde. Der Vergleich der REM-Aufnahmen der PBCEC zeigte, dass sich nach der Umstellung der Endothelzellkulturen auf serumfreie, chemisch definierte Kulturbedingungen ausschließlich nach Zusatz von Hydrocortison an den Zellgrenzen der cerebralen Endothelzellen die *marginal folds* ausbildeten, wie sie auch *in vivo* auftreten. In Abwesenheit von Hydrocortison wiesen die PBCEC zwar eine intakte Zellintegrität auf, entwickelten jedoch die Endothelzell-spezifischen Auffaltungen an den Zellgrenzen nicht. Da eine Abnahme des Widerstands der Zell-Zell-Kontakte (R_b) mit einer Abstands-Vergrößerung zwischen benachbarten Zellen korreliert (Moy et al., 2000), wurde die funktionelle Veränderung von R_b mit den strukturellen, morphologischen Befunden der REM- und TEM-Aufnahmen der PBCEC verglichen. Da sich die Zellmembranen der aneinandergrenzenden Endothelzellen überlappten und die charakteristischen Aufwölbungen an den Zellgrenzen ausbildeten, war es allerdings schwierig, anhand der REM-Bilder eine Aussage über den Zell-Zell-Abstand zu treffen. Im Gegensatz dazu schienen die REM-Aufnahmen der PBCEC in CDM ohne Hydro-

cortison-Zusatz, denen im basolateralen Filterkompartiment Serum zugesetzt wurde, einen Abstand aufzuweisen. Die Möglichkeit, dass der Abstand zwischen den Zellen unmittelbar mit dem Parameter R_b und dem Entwicklungszustand der *marginal folds* korreliert, ist nicht auszuschließen. Da die TEM-Analyse der PBCEC, anders als die ECIS-Untersuchungen, nicht sequentiell, das heißt in geeigneten Zeitintervallen durchgeführt werden konnte, ist eine Korrelation beider Untersuchungen zum Abstand der Zellen zueinander nicht möglich.

Der ECIS-Parameter C_m , der die Membrankapazität der Endothelzellen beschreibt, ist ebenso wie der Parameter R_b und α an der Bildung des Gesamtwiderstands der Endothelzellschicht beteiligt. Je höhere Werte C_m erreicht, desto mehr Aufwölbungen bzw. Ausstülpungen weist die Plasmamembran auf, was in einer größeren Oberfläche resultiert (Moy et al., 2000). Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Schmid-Schonbein et al. (1995) überein, die anhand elektronenmikroskopischer Analysen zahlreiche Membran-Auffaltungen in Endothelzellen nachweisen konnten. Übereinstimmend, konnte in den REM-Analysen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich in Abwesenheit von Hydrocortison die Auffaltungen an den Zellgrenzen der PBCEC nicht entwickelten. Die *marginal folds* der Endothelzellen, die wie die TEM-Aufnahmen zeigten, eine erstaunliche Ausdehnung aufwiesen, bildeten sich in ihrer charakteristischen Form ausschließlich in Anwesenheit von Hydrocortison. Allerdings wiesen die in Hydrocortison-haltigem CDM kultivierten PBCEC im Vergleich zu denjenigen Endothelzellen, die in Abwesenheit von Hydrocortison ihre Barrierefunktion entwickelten identische C_m -Werte auf. Eine Korrelation der impedanzspektroskopisch ermittelten Membrankapazität mit der morphologischen Ausprägung der PBCEC-Zelloberfläche, insbesondere der *marginal folds*-Ausprägung konnte somit nicht gezogen werden.

Durch den immunzytologischen Nachweis ausgewählter *tight junction*-assoziierten Proteine wurde der Verlauf der PBCEC-Zellgrenzen und damit die Zellform der Endothelzellen dargestellt. Der Vergleich dieser immunzytologischen Untersuchungen, wie beispielsweise der des ZO-1-Proteins zeigte, dass sich der Verlauf der Zellgrenzen und korrelierend die Zellform der PBCEC, kultiviert unter chemisch definierte Kulturbedingungen ohne Hydrocortison deutlich von denjenigen Endothelzellen unterschied, die in Anwesenheit von Hydrocortison ihre BHS-typische Barrierefunktion entwickelten. Wie die ZO-1-Expression deutlich zeigte, wies der Zellkörper der PBCEC in Anwesenheit von Hydrocortison eine spindelförmige, langgestreckte Form auf, während die Zellgrenzen distinkt und geradlinig ausgeprägt waren. Im Gegensatz dazu kam es in Abwesenheit von Hydrocortison zu einer deutlichen Verzerrung der ohnehin deutlich schmaler entwickelten Zellgrenzen und zu einer Veränderung der Zellkörperform der PBCEC.

Tiruppathi et al. (1992) zeigten, dass eine durch einen Stimulus ausgelöste, impedanzspektroskopisch gemessene Erniedrigung des transendothelialen Widerstands eines Endothelzell-Monolayers, einhergeht mit einer Retraktion und folglich zu einer Veränderung des Zellkörpers führt. Die von Galdal et al. (1983) und Laposata et al. (1983) nachgewiesene Endothelzell-Retraktion, die von einem erhöhten parazellulären Transport von Makromolekülen begleitet wird, wurde der Bildung von Lücken in der Interzellularzone zugeschrieben. Tiruppathi et al. (1992) gelang es, die Korrelation der durch α -Thrombin (ein inflammatorischer Mediator) verursachten morphologischen Veränderung der Zellform mit der impedanzspektroskopischen Bestimmung des parazellulären Widerstands der Endothelzellen zeitaufgelöst nachzuweisen. In ihren Studien an BPMVEC (*b*ovine *p*ulmonary *m*icrovessel *e*ndothelial *c*ells) und BPAEC (*b*ovine *p*ulmonary *a*rtery *e*ndothelial *c*ells) konnten Tiruppathi und Mitarbeiter nachweisen, dass die durch α -Thrombin verursachte Retraktion der Endothelzellen mit einer Öffnung der interendothelialen *junctions* einherging.

Durch die ECIS-Technik war es in der vorliegenden Studie möglich, den Anteil des Widerstands der interendothelialen Kontaktzone (R_b) am Gesamtwiderstand zu bestimmen und mit der immunzytologisch dargestellten Zellform der nachgewiesenen *tight junction*-assoziierten Proteine der PBCEC zu vergleichen. Die Korrelation der R_b -Widerstandswerte der PBCEC mit der immunzytologischen ZO-1-Expression belegt, dass die Zellform einen erheblichen Einfluss auf die Integrität der interendothelialen Zell-Zell-Kontakte ausübt. Die vorliegenden immunzytologischen Analysen der *tight junction*-assoziierten Proteine wurden angefertigt, nachdem die PBCEC ihre maximale Barrierefunktion erreichten. Da es sich bei der Erhöhung des transendothelialen Widerstands der PBCEC durch Umstellung der Kultur von serumhaltige auf serumfreie Bedingungen, um einen sich langsam verstärkenden Effekt handelte, war eine sequentielle, zeitaufgelöste Anfertigung der Immunfluoreszenzen, parallel zur ECIS-Messung nicht notwendig. In der vorliegenden Studie war es ausreichend, die nach Erreichen der maximalen PBCEC-Barrierefunktion ermittelten R_b -Messwerte mit den immunzytologischen Befunden ihrer *tight junction*-assoziierten-Proteine gegenüberzustellen. Für das von Tiruppathi et al. (1992) eingesetzte α -Thrombin waren dagegen sequentiell durchgeführte Studien der Zellform parallel zur zeitaufgelösten ECIS-Messung wichtig, da der Effekt des α -Thrombins schnell einsetzte und zudem reversibel war.

Die immunzytologisch nachgewiesene Verzerrung der Zellgrenzen und Veränderung des Zellkörpers jener PBCEC, kultiviert in CDM ohne Hydrocortison-Zusatz, in Kombination mit einem sehr geringen Anstieg des R_b -Wertes, deuteten auf eine Weitung der interendothelialen *junctions* hin. Da das Aktin-Zytoskelett bekanntlich eine aktive Rolle bei der Erhaltung der Zellstruktur spielt (Ojakian, 1981; Werth et al., 1983; Yamasaki et al., 1983) und der *tight junction*-Komplex, z. B. via ZO-1, sowohl an das

Aktin-Skelett bindet als auch als *cross-linking*-Protein fungiert, ist eine parazelluläre Widerstandsveränderung durch die Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts eine folgerichtige Antwort der Endothelzellen. (Nusrat et al., 2000) postulierten, dass durch verschiedenste Stimuli (u. a. durch Hormone) die *tight junction*-Permeabilität durch eine Aktomyosin-Kontraktion und damit einer Zellform-Veränderung reguliert wird. Ihre Hypothese besagt, dass die ZO-1-Interaktion mit Cingulin und Aktin, die Cingulin-Interaktion mit Myosin und schließlich die als Brückenverbindung dienende Aktomyosin-Interaktion die *tight junction*-Integrität durch den perijunctionalen Aktomyosinring steuert und somit für den parazellulären Widerstand verantwortlich ist. Diese Vermutung scheint eine schlüssige Erklärung für die Auswirkung der Zellform auf den parazellulären Widerstand der Endothelzellen zu sein. Nach Hecht et al. (1996) erfolgt die parazelluläre Permeabilitätsregulierung einer Endothelzellschicht durch Phosphorylierungen der Aktin/Myosin-bundenen Proteine. Dass solche Phosphorylierungen einen Einfluss auf die Zellform und die Aufweitung der interendothelialen *junctions* haben, wurde schon von Ojakian (1981), Yamasaki et al. (1983) und Werth et al. (1983) gezeigt.

Die für die cerebralen Endothelzellen offensichtlich nicht optimal ausgeprägte Zellform, die sich in der gestörten *tight junction*-Integrität der PBCEC und ergo den niedrigen Werten des Parameters R_b widerspiegelte, wurde in der Immunfluoreszenz des ZO-1 Proteins bildlich dargestellt. Möglicherweise wurde durch die bei veränderter Zellform verursachte Verzerrung der interendothelialen Zell-Zell-Kontakte die Bindung des Antikörpers an sein Epitop beeinträchtigt oder der Antikörper band durch die Aufweitung des *tight junction*-Komplexes lediglich partiell, so dass die immunzytochemisch sichtbare ZO-1 Expression verzerrt und stellenweise schwach ausgeprägt wirkte.

Im Gegensatz dazu zeigte die distinkte, geradlinig verlaufende ZO-1-Färbung, dass die PBCEC, kultiviert in CDM mit Hydrocortison, spindelförmig geformt sind, und dass der interendotheliale *tight junction*-Komplex nicht auseinandergezerrt wurde. Dies spiegelte sich in den hohen R_b -Werten des parazellulären Widerstands wieder. Hydrocortison sorgt anscheinend für die Ausbildung einer Zellform, die für eine optimale Anordnung der interendothelialen Zell-Zell-Kontakte beziehungsweise einer maximierten *tight junction*-Integrität verantwortlich ist.

Inwiefern sich die Leukozyten und das zur Entzündungsaktivierung verwendete TNF- α auf die Zellstruktur und, damit korrelierend, auf den parazellulären Widerstand der PBCEC auswirkten, konnte ausschließlich an Zellen untersucht werden, die nicht schon kulturbedingt verzerrte Zellgrenzen und niedrige transendotheliale Widerstände aufwiesen. Das Entzündungsmodells diente dazu, den Einfluss der Leukozyten-Endothel-Interaktion beziehungsweise entzündlicher Prozesse allgemein auf die Barrierefunktion der PBCEC zu untersuchen. Da sich diese in den interendothelialen

Zell-Zell-Kontakten widerspiegelt, war ein optimaler Entwicklungszustand der *tight junction*-Integrität im Ausgangszustand notwendig. So postulierten beispielsweise Garcia et al. (1998), dass neben inflammatorisch wirkenden Substanzen auch mit dem Endothel interagierende neutrophile Granulozyten eine Kontraktion des Aktomyosins verursachen und als Folge die parazelluläre Permeabilität der Endothelzellen verändern. Hixenbaugh et al. (1997) konnten ebenfalls zeigen, dass durch die Interaktion Neutrophiler mit HUVECs eine Veränderung der Endothelzellstruktur hervorgerufen wurde. Die Autoren postulierten, dass die Phosphorylierung der kontraktilen Proteine und die dadurch verursachte Strukturveränderung der Endothelzellen die zentrale Rolle bei der transendothelialen Migration der neutrophilen Granulozyten spielen. Durch Immunzellen oder induzierte entzündliche Prozesse verursachte Veränderungen der PBCEC wären ohne einen optimal ausgeprägten und detailliert charakterisierten Ausgangszustand der cerebralen Endothelzellen nicht detektierbar.

4.2.3 Die Apoptoserate

Da in zukünftigen Studien zur transendothelialen Migration die Funktion apoptotischer Prozesse bei der Leukozyten-Diapedese beleuchtet werden sollte, war ein Apoptose-freies BHS-Modell essentiell. Zudem war zur korrekten Deutung des Einflusses der Leukozyten auf die PBCEC ein gesunder cerebraler Endothelzell-Monolayer, der nicht schon vor der Interaktion mit den Immunzellen apoptotische Prozesse aufwies, notwendig. Bisher ist nicht bekannt, welchen Einfluss Endothelzellen, in denen bereits kulturbedingt apoptotische Prozesse ablaufen, auf das transmigratorische Verhalten der Leukozyten ausüben. Ob Endothelzellen, in denen die Apoptose bereits eingeleitet wurde, in der Lage sind, ein korrektes, zur Leukozyten-Transmigration notwendiges Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen auszubilden, ist fraglich. Da die Endothelzellen an der Leukozyten-Diapedese als aktive Interaktionspartner involviert sind (Ebnet et al., 1996), ist eine durch Apoptose beeinträchtigte Endothelzellkultur aufgrund der daraus entstehenden unspezifischen molekularen Wirkmechanismen zur Untersuchung entzündlicher Prozesse und der transendothelialen Migration von Leukozyten ungeeignet. Daher wurde vor der Untersuchung der Leukozyten-Extravasation im BHS-Modell die Auswirkung der unterschiedlichen Kulturbedingungen auf die Apoptoserate der PBCEC bestimmt. Entsprechend wurde diejenige Kultur gewählt, die die niedrigste Apoptoserate mit einer maximalen Barrierefunktion und höchster *in vivo*-Kompatibilität vereinte.

4.2.3.1 Der Einfluss der Kulturbedingung auf die Apoptoserate

Glucocorticoide, wie z. B. Hydrocortison, sind neben ihren gewebespezifischen Wirkungen auch für ihre anti-apoptotische Wirkung bekannt. Demzufolge wurde analysiert, inwieweit der Zusatz von Hydrocortison zum Kulturmedium die Apoptoserate im BHS-Entzündungsmodell beeinflusst. Die Experimente ergaben, dass die basale Apoptoserate, quantifiziert durch die Messung der DNA-Fragmentierung und die Aktivierung der Effektor-Caspase-3, in den kultivierten Endothelzellen immer dann signifikant erniedrigt wurde, wenn dem Kulturmedium entweder Hydrocortison oder Serum zugesetzt wurde. Im Vergleich zwischen beiden Kulturbedingungen ließ sich kein Unterschied in der Apoptoserate detektieren. Die Ergebnisse zeigten weiterhin, dass Hydrocortison in Konzentrationen von 55, 550 oder 5500 nM gleichermaßen Apoptose-senkend wirkte. Die Apoptose-inhibierende Wirkung von Glucocorticoiden konnte auch von Messmer et al. (2000) nachgewiesen werden. Die Autoren konnten zeigen, dass die durch LPS bzw. TNF- α induzierte Apoptose bei glomerulären Endothelzellen zu 90 % inhibiert wird. Cox (1995) zeigten, dass Glucocorticoide eine anti-apoptotische Wirkung auf humane neutrophile Granulozyten ausübten, die durch TNF- α stimuliert worden waren. Da in dem Hydrocortison-haltigen PBCEC-Entzündungsmodell zur Untersuchung der transendothelialen Leukozyten-Migration neutrophile Granulozyten und zur Entzündungsstimulierung des Endothelzell-Monolayers TNF- α verwendet wurde, waren die Befunde von Cox (1995) besonders interessant.

Die Apoptosestudien der PBCEC zeigten weiterhin, dass sich ein erhöhter transendothelialer Widerstand nicht zwangsläufig in einer erniedrigten Apoptoserate der PBCEC widerspiegelte. So wurde trotz des hohen transendothelialen Widerstands der PBCEC von bis zu $800 \Omega \times \text{cm}^2$, kultiviert in CDM mit Zusatz von Serumersatz (*Serum Replacement II*, Fa. Sigma), eine im Vergleich zu den übrigen Kulturbedingungen stark erhöhte Apoptoserate der cerebralen Endothelzellen beobachtet. Basierend auf diesen Befunden wurde die Kultivierung der PBCEC trotz der hohen TER-Messwerte unter dieser Kulturbedingung unterlassen.

Ein Zusammenhang zwischen den TER-Filtermessungen und der Apoptosebestimmung ließ sich nur schwer herstellen, da die Endothelzellen zur TER-Messung auf Transwell[®]-Filtereinsätzen kultiviert wurden, bei denen die Komponenten des Mediums sowohl von der apikalen als auch von der basolateralen Seite der Zellen wirkten. Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden die PBCEC dagegen in Gefäßen kultiviert, die kein basolaterales Kompartiment aufwiesen (z. B. Petrischalen), so dass die Endothelzellen ausschließlich von der apikalen Seite vom Medium beeinflusst wurden. Der von der basolateralen Seite negative wirkende Effekt des Serums auf den transendothelialen Widerstand konnte somit nicht mit den Apoptosestudien korreliert werden. Durch die Kultivierung der PBCEC in Hydrocortison- und / oder Se-

rum-haltigem Medium von der apikalen Zellseite wurde die Apoptoserate gleichermaßen niedrig gehalten. Die Hydrocortison-bedingte Erhöhung der TER-Werte gegenüber den niedrigeren Werten unter serumhaltigen Kulturbedingungen war somit nicht ausschließlich durch eine verminderte Apoptoserate erklärbar.

4.2.3.2 Die Barrierefunktion im Kontext der CHX-induzierten Apoptose

Ein kausaler Zusammenhang zwischen einer erhöhten basalen Apoptoserate in den PBCEC in Abwesenheit von Hydrocortison und einer erhöhten Permeabilität des Endothelzell-Monolayers unter gleichen Bedingungen wurde mit Hilfe von Experimenten untersucht, in denen durch die Gabe von Cycloheximid (CHX) die Apoptose in den PBCEC gezielt chemisch induziert wurde. Der Verlauf der Apoptose im Hinblick auf strukturelle und funktionelle Veränderungen der Zellmorphologie wurde mit Hilfe der ECIS-Technik zeitaufgelöst verfolgt. Der Einfluss der durch Cycloheximid induzierten Apoptose auf die in Hydrocortison- und / oder Serum-haltigem Medium kultivierten PBCEC wurde ebenfalls impedanzspektroskopisch im ECIS-Experiment untersucht. Parallel zu den ECIS-Messungen wurde der Einfluss von CHX auf die Zellmorphologie der PBCEC unter verschiedenen Kulturbedingungen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten mikroskopisch verfolgt. Zusätzlich wurde die durch CHX induzierte Apoptoserate durch die Bestimmung der DNA-Fragmentierung und der Caspase-3-Aktivität ermittelt.

Der CHX-Einfluss auf den Zell-Zell- und den Zell-Substrat-Kontakt

Die ECIS-Studien ergaben unabhängig von der Kulturbedingung, dass die barrierebildenden *tight junctions* der PBCEC bereits in einem sehr frühen Stadium der Apoptose massiv gestört wurden. Der Zell-Substrat-Kontakt wurde dagegen, je nach Kulturbedingung, zu sehr unterschiedlichen Zeitpunkten beeinträchtigt. Zu diesen frühen Zeitpunkten der impedanzspektroskopisch ermittelten Beeinträchtigungen der Zell-Zell- und Zell-Substrat-Kontakte sind noch keine mikroskopisch ermittelten zellmorphologischen Änderungen zu detektieren. Erst mehrere Stunden nach totalem Zusammenbruch der endothelialen Barrierefunktion lösen sich auch mikroskopisch sichtbar die Zellen vom Substrat. Interessanterweise verhalten sich die Zell-Zell- und die Zell-Substrat-Kontakte der PBCEC, in Form der ECIS-Parameter R_b und α , unter den verschiedenen Kulturbedingungen nach Applikation des Apoptose-induzierenden Cycloheximids extrem unterschiedlich. Beim Vergleich der ECIS-Experimente zur CHX-induzierten Apoptose unterschiedlich kultivierter PBCEC ist allerdings zu bedenken, dass die Ausgangswerte der ECIS-Parameter R_b und α der verschiedenen

Kulturbedingungen, insbesondere zwischen den serumhaltigen Kulturen und denjenigen, die ohne Serum aber mit Hydrocortison kultiviert wurden, stark voneinander abwichen. So waren die Ausgangswiderstände der Zell-Zell-Kontakte in CDM mit Hydrocortison ohne Serum dreimal und die Zell-Substrat-Kontakte doppelt so hoch wie die von Endothelzellen, die unter serumhaltigen Kulturbedingungen oder in CDM ohne Zusätze kultiviert wurden.

In den PBCEC, die in serumfreiem CDM mit Hydrocortison kultiviert wurden, wurde der Widerstand der Parameter R_b und α gleichermaßen stark reduziert. Ein fast identisches Bild ergab sich beim Vergleich der Kurvenverläufe von R_b und α der in CDM ohne Zusätze kultivierten Endothelzellen. Allerdings wurde der Zell-Substrat-Kontakt unter dieser Kulturbedingung etwas zeitverzögert geschwächt. Bei der Reduktion des Widerstands des Zell-Zell-Kontakts spielt höchstwahrscheinlich die Aufweitung der interendothelialen Kontaktzone durch Spannungs- oder aber durch Formveränderung der Endothelzellen die entscheidende Rolle (Moy et al., 1993). Diese wiederum werden durch die Phosphorylierung der Aktin-Myosin-bindenden *tight junction*-assoziierten Proteine verursacht (Nusrat et al., 2000).

Bemerkenswerterweise wirkte sich in Anwesenheit von Serum im Medium, im Vergleich zu den serumfreien Kulturbedingungen der PBCEC, der Einfluss des Apoptose-Induktors sehr unterschiedlich aus. So wurde durch die Zugabe von CHX in das Endothelzell-Kulturmedium mit Serum der Zell-Substrat-Kontakt im Vergleich zu den übrigen Kulturbedingungen kaum beeinträchtigt. In Anwesenheit von Hydrocortison - im serumhaltigen Medium wurde zwar der Zell-Matrix-Kontakt geschwächt, allerdings langsamer und schwächer als in Abwesenheit von Serum. Auch die Senkung des Widerstands der interendothelialen Kontakte (R_b), induziert durch die CHX-vermittelte Apoptose, wurde durch den Zusatz von Serum im Kulturmedium der PBCEC verzögert und war weniger intensiv. Serum im Kulturmedium verzögerte die CHX-induzierte Reduzierung der Werte von R_b auf die Hälfte der Ausgangswerte im Vergleich zur serumfreien Kultur mit oder ohne Hydrocortison um das dreifache und die Reduzierung von α um fast das sechsfache.

Herren et al. (1998) konnten zeigen, dass in humanen Endothelzellen durch den Entzug von Wachstumsfaktoren Apoptose induziert wird, wodurch β -Catenin der *adherens junctions* gespalten wird. Die Spaltung des β -Catenins verhindert die Interaktion des α -Catenins mit dem Zytoskelett. Für die Spaltung des β -Catenins ist unter anderem die Effektorcaspase verantwortlich. (Herren et al., 1998) konnten ebenfalls zeigen, dass die Beeinträchtigung der *adherens junctions* während der Apoptose durch Spaltung des VE-Cadherins durch Matrixmetalloproteasen verursacht wird. Durch die Anwesenheit von Serum im Kulturmedium stehen den Endothelzellen Wachstumsfaktoren zur Verfügung, die nach Herren et al. (1998) Apoptose-senkend wirken und sich nach einer künstlichen CHX-induzierten Apoptose stabilisierend auf

die Zell-Zell- und die Zell-Substrat-Kontakte auswirken. Die Autoren diskutierten ebenfalls die Möglichkeit, dass die Serumbestandteile auf Enzyme wie Matrixmetalloproteasen der Caspase-Effektorkaspasen inhibierend wirken.

Der CHX-induzierte Abfall der Parameter R_b und α wurde in dem serumfreien, Hydrocortison-haltigen BHS-Modell, das in der vorliegenden Studie zur Charakterisierung der Leukozyten-Transmigration eingesetzt wurde, nicht verzögert. Der Abfall der ECIS-Parameter R_b und α erfolgte im Vergleich zu den übrigen Kulturbedingungen gleichzeitig und am schnellsten. Dieser Kurvenverlauf der für die PBCEC optimalen Kulturbedingung erscheint zunächst widersprüchlich, lässt sich aber durch die gesteigerte Sensibilität der hohen Zellwiderstände erklären, die durch entsprechend komplex entwickelte *tight junctions* und Zell-Substrat-Bindungen erreicht wurden. Zu beachten ist ebenfalls, dass der halbierte R_b -Wert von $320 \Omega \times \text{cm}^2$ immer noch höher war als die Ausgangswerte der übrigen Kulturbedingungen.

Die Messergebnisse der ECIS Experimente zur CHX-induzierten Apoptose verdeutlichten den hohen Einfluss der Kulturbedingungen auf die Barrierefunktion der cerebralen Endothelzellen. Die Darstellung der morphologischen Antwort der PBCEC in Form der ECIS-Parameter R_b und α auf einen Apoptose-induzierenden Stimulus zeigten, dass in Abhängigkeit von der Kulturbedingung extreme Unterschiede in der Ausprägung der Zell-Zell- und der Zell-Matrix-Kontakte resultierten, die sowohl im zeitlichen Verlauf als auch in ihrer Intensität stark differierten. So konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die Anwesenheit von Serum im Kulturmedium mehr als die übrigen Versuchsbedingungen auf die CHX-vermittelte Widerstandserniedrigung der ECIS-Parameter R_b und α verzögernd und dämpfend wirkte. Es kann allerdings bisher keine definitive Aussage darüber getroffen werden, in welcher Weise Serum oder Hydrocortison während der CHX-induzierten Apoptose die Zell-Zell- bzw. die Zell-Substrat-Kontakte beeinflussen.

Moy et al. (2000) ermittelten mit Hilfe der ECIS-Technik, dass die durch eine Histamin-Applikation verursachte Reduktion des Gesamtwiderstands eines HUVEC-Monolayers hauptsächlich durch den Widerstandsabfall der Zell-Zell-Kontakte ohne Beteiligung des Zell-Matrix-Kontakts verursacht wurde. Beim folgenden Anstieg des Gesamtwiderstands festigt sich zunächst der Zell-Matrix-Kontakt und, erst zeitlich verzögert, der Zell-Zell-Kontakt. Die Autoren verwendeten für die Ermittlung dieser Ergebnisse HUVECs, die in serumhaltigem Medium kultiviert wurden. Vergleicht man den Verlauf der ECIS-Parameter R_b und α der in serumhaltigem Medium kultivierten PBCEC nach der Applikation von CHX, so verhielten sie sich wie die von Moy et al. (2000) ermittelten Messwerte von R_b und α im HUVEC-Modell nach Zugabe von Histamin zu den Endothelzellen, die seit 5 Tagen einen konfluenten Zell-Monolayer aufwiesen: die initiale Widerstandssenkung des PBCEC-Monolayers wurde durch den drastischen Abfall von R_b verursacht, wohingegen α zunächst konstant blieb. Die

Frage, in welcher Reihenfolge und in welcher Intensität die Widerstände der Zell-Zell- bzw. der Zell-Substrat-Kontakte an einer Veränderung des Gesamtwiderstands einer Endothelzellschicht nach einem Stimulus beteiligt sind, scheint nach den Befunden dieser Arbeit abhängig vom Ausgangszustand, das heißt der Kulturbedingung der Endothelzellen zu sein. Inwieweit demzufolge die Ergebnisse der ECIS-Experimente von Moy et al. (2000) und Tiruppathi et al. (1992), die den Einfluss von Histamin bzw. α -Thrombin auf den parazellulären Widerstand des HUVEC-Monolayers untersuchten, durch eine Änderung der Kulturbedingung der HUVECs differieren würden, ist zu überdenken. Zwar wurden in der vorliegenden Studie und in den Arbeiten von Moy et al. (2000) und Tiruppathi et al. (1992) unterschiedliche Substanzen und Zellkultur-Modelle verwendet, sie zeigten aber dennoch Parallelen der Messwerte der ECIS-Parameter R_b und α als Antwort auf die Zugabe der jeweiligen Substanz. Möglicherweise wird unter gleichen Kulturbedingungen nach einer induzierten Widerstandserniedrigung, unabhängig durch welchen Stimulus, ein identischer Verlauf der Parameter R_b und α generiert.

Da Endothelzell-Kulturmodelle fast ausschließlich dazu genutzt werden, um den Einfluss verschiedenster Stimuli auf die Integrität des Endothelzell-Monolayers zu untersuchen, sind die Eigenschaften der Zell-Zell- bzw. der Zell-Substrat-Kontakte und ihre entsprechende Antwort auf verschiedene externe Reize von ausschlaggebender Bedeutung. Der Regulation der parazellulären Permeabilität einer Endothelzellschicht, speziell der des barrierebildenden cerebralen Endothels, liegen komplizierte molekulare Wirkmechanismen zugrunde, die nach wie vor nicht vollständig aufgeklärt werden konnten. Die Darstellung des zeitaufgelösten Verlaufs der ECIS-Widerstandswerte der Zell-Zell- und der Zell-Substrat-Kontakte der PBCEC verdeutlichte, dass es, je nach Kulturbedingung, trotz der Applikation eines identischen Stimulus zu einem unterschiedlichen Regulationsmuster des Zell-Zell- und des Zell-Matrix-Widerstands kam, was die Aufklärung des diffizilen Regulationsmechanismus der barrierebildenden *tight junctions* der Blut-Hirn-Schranke per se sehr erschwert und gleichzeitig demonstriert, dass die Analyse der Regulation der interendothelialen Kontakte während eines entzündlichen Prozesses sehr diffizil ist.

Die Einwirkzeit des CHX auf die PBCEC wurde mit Hilfe des Caspase-3-Assays und der DNA-Fragmentierung untersucht. Die Messungen der Caspase-3-Aktivität ergaben, dass die in Hydrocortison-haltigem CDM kultivierten PBCEC nach 16 Stunden den 50-fachen Wert im Vergleich zu den nicht CHX-behandelten Zellen aufwiesen. Die Induktion der Apoptose konnte erst nach 3 Stunden gemessen werden. Die Bestimmung der Caspase-3-Aktivität und die DNA-Fragmentierung belegten, dass die Apoptoserate der Endothelzellen in CDM mit Zusatz von Hydrocortison und/oder Serum nach 16-stündiger Inkubation mit CHX gleichmäßig erhöht wurde. Die PBCEC, die in Medium ohne Hydrocortison- und Serum-Zusatz kultiviert wurden, wiesen

dagegen eine wesentlich höhere Apoptoserate auf. Da die Apoptoserate dieser Kulturbedingung allerdings auch ohne chemische Induktion deutlich höher war als bei den übrigen Kulturbedingungen, kam die Zugabe von CHX zuden PBCEC einer Verstärkung der ohnehin schon eingeleiteten Apoptose gleich.

Der Vergleich der CHX-induzierten Apoptoserate der PBCEC mit den impedanzspektroskopisch ermittelten ECIS-Messwerten zeigte, dass sich das CHX unmittelbar nach Zugabe auf die Zell-Zell- und die Zell-Substrat-Kontakte auswirkte. Zu diesem frühen Zeitpunkt konnte durch die Caspase-3-Aktivitätsmessung noch keine Apoptose in den PBCEC nachgewiesen werden. Den ECIS-Messungen zufolge war zum Zeitpunkt, zu dem sich durch die Caspase-3-Aktivitätsmessung ein deutlich erhöhter Wert nachweisen ließ, die Endothelzell-Integrität bereits vollkommen zerstört.

Wie die ECIS-Experimente und die Caspase-3-Aktivitätsmessungen zusammenfassend verdeutlichten, pufferte Serum zwar die Apoptose-induzierende Wirkung des CHX auf den Zell-Zell- und den Zell-Substrat-Kontakt erheblich ab, zeigte damit aber gleichzeitig, dass die Empfindlichkeit der Barriere gegenüber äußeren Einflüssen erheblich eingeschränkt wird. Da Serum ohnehin unkontrollierte Entzündungsreaktionen in den Endothelzellen auslöste und in den Transwell[®]-Filtersystemen von der basolateralen Zellseite einen stark Widerstandssenkenden Effekt auf die PBCEC ausübte, wurde auf Serum im Kulturmedium verzichtet. Das in den PBCEC durch Inkubation in serumhaltigem Medium von der basolateralen Zellseite zusätzlich zu der barriereschwächenden und entzündungsstimulierenden Wirkung Apoptose induziert wurde, ist vorstellbar, konnte aus versuchspraktischen Gründen jedoch nicht gezeigt werden. Hydrocortison im serumfreien Kulturmedium der PBCEC puffert die CHX-induzierte Apoptoserate zwar ebenso ab wie Serum im Medium, induzierte allerdings gleichzeitig eine sehr hohe Empfindlichkeit der interendothelialen wie auch der Zell-Substrat-Kontakte auf externe Stimuli, was speziell in Bezug auf die Charakterisierung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion von enormer Relevanz war.

4.2.4 TNF- α als Entzündungsinduktor

Als Grundlage für die Entwicklung des *in vitro*-Entzündungsmodells der Blut-Hirnschranke wurde das Hydrocortisonhaltige Kulturmodell gewählt, das neben seinem Vorzug der hohen *in vivo*-Kompatibilität der Endothelzellen und der gesenkten Apoptoserate die Applikation verschiedener Zellkulturzusätze unter chemisch definierten Bedingungen zuließ. Gleichwohl stellte sich die Frage, ob in Gegenwart von Hydrocortison, das bekanntermaßen eine entzündungshemmende Wirkung hat, tatsächlich eine Entzündungsreaktion induzierbar war.

Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Lipopolysaccharid (LPS) oder Interleukin-1 β (IL-1 β) sind bekannte Entzündungsmediatoren, die die Neusynthese und Zelloberflächenexpression von E-Selektin induzieren (Bolton et al., 1998; Kubes and Ward, 2000). In dem BHS-Entzündungsmodell der vorliegenden Arbeit wurde TNF- α als Entzündungsmediator eingesetzt. TNF- α ist ein 17 kDa großes pro-inflammatorisches Protein, das hauptsächlich von mononukleären Zellen abgegeben wird und die Barrierefunktion sowohl von Epithel- als auch von Endothelzellen beeinflusst (Nusrat et al., 2000). Es fungiert *in vivo* hauptsächlich als pro-inflammatorisches Cytokin, das zur Hochregulierung der Adhäsionsmoleküle auf der Endothelzelloberfläche dient und somit die Transmigration der Leukozyten aus den Blutgefäßen in das entzündete Gewebe einleitet (Barten et al., 1994).

Auf die zur Auslösung entzündlicher Prozesse in Endothelzell-Kulturen häufig verwendeten Cytokin-Mixturen wurde in der vorliegenden Arbeit verzichtet, da die Wirkmechanismen der unterschiedlichen Cytokine zu komplex sind und damit unüberschaubar gewesen wären. So konnten beispielsweise Wong et al. (1999) zeigen, dass die gemeinsame Applikation von TNF- α und IFN- γ (Interferon- γ) zu einem fokalem Verlust von Cadherin-5 der interendothelialen *junctions* führte, was wiederum den interzellulären Zusammenhalt der Endothelzellen beeinträchtigte und ein Eindringen von Blutzellen und Makromolekülen in das Gewebe zur Folge hatte. Auch Blum et al. (1997) konnten nachweisen, dass durch gleichzeitigen Zusatz von TNF- α und IFN- γ die parazelluläre Permeabilität von mikrovaskulären Endothelzellen gesteigert wurde. JAM, ein *tight junction*-assoziiertes Protein, das beim *tight junction-assembly* regulierend mitwirkt (Liu et al., 2000), wird durch die gemeinsame Inkubation von TNF- α und IFN- γ in HUVECs umverteilt. Andere Cytokine, wie IL-1 β (Interleukin-1 β), IL-4 und IL-13, beeinträchtigen die Barrierefunktion von Endothel- und Epithelzellen, indem sie den transendothelialen Widerstand senken (Edens & Parkos, 2000).

Der Einfluss von TNF- α auf die PBCEC

In Gegenwart der im Arbeitskreis standardmäßig verwendeten Hydrocortison-Konzentration von 550 nM induzierte der Zusatz von 2 ng/ml TNF- α zum Kulturmedium der PBCEC die Zelloberflächenexpression von E-Selektin. Selbst in Gegenwart von 0,2 ng/ml TNF- α im Kulturmedium war E-Selektin in geringerer Konzentration immunzytochemisch noch nachweisbar. Der durch TNF- α in Gegenwart von Hydrocortison verursachte entzündliche Prozess im Entzündungskulturmodell der BHS, der die transiente Zelloberflächenexpression des E-Selektins induzierte, machte dieses Protein zu einem idealen Entzündungsmarker. Zur Optimierung des BHS-Entzündungskulturmodells, d. h. zur Erzielung einer maximalen E-Selektin-Expression in Kombination mit einem maximalen transendothelialen Widerstand, wurden die Zellkulturen

bei konstanter TNF- α Konzentration von 2 ng/ml und steigender Hydrocortison-Konzentration kultiviert. Der transendotheliale Widerstand der PBCEC zeigte einen Hydrocortison-konzentrationsabhängigen Sättigungsverlauf, der bei 55 nM sein Maximum erreichte und sich durch eine weitere Erhöhung der Hydrocortison-Konzentration nicht mehr steigern ließ. Sowohl die immunzytologischen als auch die REM-Analysen und impedanzspektroskopischen Studien zeigten, dass die Kultur in chemisch definiertem Medium mit 55 nM Hydrocortison, anstatt der im Arbeitskreis üblichen 550 nM, zu einer physiologischen Ausprägung der barrierebildenden PBCEC führte, die damit einhergehend eine maximierte E-Selektin-Expression nach der Entzündungsstimulierung zuließ. Somit war es gelungen, ein optimiertes endotheliales Entzündungskulturmodell zu etablieren, das eine maximale E-Selektin-Expression mit einem hohen transendothelialen Widerstand kombinierte.

Generell bewirken Cytokine eine Umverteilung der *tight junction*-assoziierten Proteine bzw. beeinträchtigen das Aktin-Zytoskelett (Nusrat et al., 2000). In der vorliegenden Studie konnte dagegen gezeigt werden, dass TNF- α in einer Konzentration von 2 ng/ml trotz der nachgewiesenen Entzündungsreaktion zu keiner Beeinträchtigung der Barrierefunktion und Morphologie der cerebralen Endothelzellen führte. Durch die Inkubation der PBCEC mit 2ng/ml TNF- α wurde die Endothelzellintegrität nicht gestört. So wurde der transendotheliale Widerstand der PBCEC, kultiviert auf den Transwell[®]-Filtersystemen, durch 0,2 und 2 ng/ml TNF- α kaum beeinträchtigt und stieg nach 4 bzw. 6 Stunden wieder auf den Ausgangswert an. Demgegenüber wirkten sich 20 ng/ml TNF- α nachweislich TER-senkend aus. Mit Hilfe der ECIS-Technik wurde der Einfluss des TNF- α auf den Zell-Substrat- und den Zell-Zell-Kontakt der cerebralen Endothelzellen quantitativ und zeitaufgelöst getrennt voneinander, aber dennoch simultan, verfolgt. Die ECIS-Studien zeigten, dass es nach der Applikation von 2 ng/ml TNF- α zu den PBCEC zu einer reversiblen Senkung der ECIS-Parameter R_b und α kam, die nach ca. 4-5 Stunden wieder das Niveau des Ausgangswertes erreichte. Diese biphasische Antwort des transendothelialen Widerstands nach TNF- α -Zugabe, die nicht nur in den ECIS-, sondern auch in den TER-Messungen der auf Transwell[®]-Filtersystemen kultivierten PBCEC beobachtet werden konnte, wurde auch von Marano et al. (1993) an der retinalen Epithelzelllinie LLC-PK1 gezeigt. Die Autoren konnten nachweisen, dass die anfängliche Reduktion des TERs bei ansteigender parazellulärer Permeabilität der Epithelzellen gefolgt wurde von einer Zunahme des TERs, der mit einer reduzierten Anionselektivität der *tight junctions* korrelierte. In der Studie von Marano et al. (1993) wurde die Rolle der Tyrosinkinasen und der Proteinkinase A für den Effekt von TNF- α diskutiert. Schmitz et al. (1999) zeigten allerdings, dass die Applikation von TNF- α zu den Epithelzelllinien HT29 und Caco-2 zu einer irreversiblen Reduzierung des TERs führte, ohne dass ein erneuter TER-An-

stieg folgte. Die Autoren konnten durch *freeze-fracture* Elektronenmikroskopie einen Verlust der *tight junction*-Strang-Komplexität nachweisen. Da das Zytoskelett ein integriertes dreidimensionales Netzwerk aus Filamenten und Adhäsionsproteinen darstellt, in dem die Zell-Zell-Regionen über mechanische Kräfte mit dem Zell-Substrat-Kontakt verbunden sind (Wang et al., 1993a), ist die Aufklärung des biphasischen Verlaufs der Parameter R_b und α , nach Zugabe von $\text{TNF-}\alpha$ zur Endothelzellkultur, sehr komplex.

Das Zytoskelett als integrative Struktur erlaubt zwei unterschiedliche Wirkungswiesen äußerer Stimuli auf die Barrierefunktion der Endothelzellen: entweder wird der Zell-Matrix-Kontakt via Signaltransduktion beeinflusst, was ein Abrunden der Zellen verursacht und folglich den Zell-Zell-Kontakt schwächt, oder die interendothelialen *junctions* werden durch die Aktivierung der Signaltransduktion direkt beeinflusst, was mit einer reaktiven Schwächung des Zell-Substrat-Kontakts einhergehen würde. Da der interendotheliale Kontakt und der Zell-Matrix-Kontakt der Endothelzellen aus jeweils unterschiedlichen Proteinkomplexen aufgebaut sind und dementsprechend unterschiedlich reguliert werden, war es zunächst wichtig, den Wirkort der entzündungsstimulierenden Substanz in der Endothelzell-Kultur mit Hilfe der ECIS-Methode zu lokalisieren. Derartige, durch Anwendung der biophysikalischen ECIS-Methode ermittelte Befunde, die bisher ausschließlich *in vitro* erzielbar sind, könnten als Grundlage zur Aufklärung der Regulation von Ödemen dienen, die durch inflammatorische Mediatoren ausgelöst werden und denen eine endotheliale Barrierschwächung vorhergeht.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Umstellung des Mediums der primärkultivierten PBCEC von serumhaltige auf serumfreie, Hydrocortison-haltige Kulturbedingungen grundsätzlich am gleichen Kulturtag und richtete sich nicht nach dem jeweiligen Wachstumszustand der PBCEC. Daher waren wachstumsbedingte Unregelmäßigkeiten der Endothelzellen bezüglich der Antwort auf äußere Stimuli zu beachten, wie sie auch Moy et al. (2000) in den HUVECs unterschiedlichen postkonfluenten Alters nach Histamin-Zugabe im ECIS-Experiment beobachten konnten. So zeigten sich in der vorliegenden Studie entsprechende Schwankungen der Parameter R_b und α nach Applikation von $\text{TNF-}\alpha$ zu den PBCEC. Trotz dieser Primärkultur-bedingten Unregelmäßigkeiten war das beschriebene Verlaufsmuster der ECIS-Parameter R_b und α nach $\text{TNF-}\alpha$ Zugabe dennoch konstant vergleichbar (s. o.). Aufgrund der impedanzspektroskopisch nachgewiesenen, transienten und geringfügigen Schwächung der Barrierefunktion durch $\text{TNF-}\alpha$ erfolgte die Applikation der Immunzellen erst, nachdem die Barrierefunktion der cerebralen Endothelzellen wieder ihren Ausgangszustand erreicht hatte.

Da $\text{TNF-}\alpha$ neben seiner entzündungsstimulierenden auch eine Apoptose-induzierende Wirkung hat (Polnovsky et al., 1994), war ein Vergleich der ECIS-Messdaten zum

Einfluss von TNF- α und CHX auf die PBCEC durchaus möglich, wenngleich der molekulare Wirkmechanismus unterschiedlich ist. So war sowohl nach der Applikation von CHX, als auch von TNF- α ein gemeinsamer Abfall der Werte von R_b und α zu beobachten, der nach der CHX-Zugabe im Gegensatz zu TNF- α irreversibel war. TNF α wurde allerdings gezielt in einer Konzentration eingesetzt, die nicht zu einer Schädigung der Zell-Zell- und der Zell-Substrat-Kontakte führte.

Die REM-Analysen der vorliegenden Studie ergaben ebenfalls, dass durch eine mehrstündige Inkubation von 2 ng/ml TNF- α keine morphologischen Veränderungen des PBCEC-Monolayers verursacht wurden. Die *marginal folds* an den Zellgrenzen der Endothelzellen zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine normale Ausprägung. Auch die immunzytologischen Untersuchungen der *tight junction*-assoziierten Proteine ZO-1, Claudin-5 und Occludin zeigten, dass durch eine 4-stündige Inkubation der PBCEC mit 2 ng/ml TNF- α die Expression und Lokalisation dieser Proteine nicht beeinträchtigt wurden. Die Immunoblot-Analyse zeigten ebenfalls, dass durch 2 ng/ml TNF- α die quantitative Expressionsrate der untersuchten barrierebildenden *tight junction*-assoziierten Proteine der PBCEC nicht reduziert wurde. Die Occludin-Expression der PBCEC im Western-Blot schien durch den Zusatz von 2 ng/ml TNF- α sogar verstärkt zu werden. Dagegen kam es durch die Inkubation mit 20 ng/ml TNF- α zu einer eindeutigen quantitativen Beeinträchtigung des Occludin-Proteins, wohingegen das Claudin-5 unbeeinträchtigt blieb. Auch Wojciak-Stothard et al. (1998) konnten nachweisen, dass in HUVECs durch die Applikation von TNF- α interzelluläre Lücken entstanden, die mit einer Dispersion von VE-Cadherin der *adherens junctions* in Verbindung gebracht werden konnten.

Insgesamt konnte durch die Inkubation der cerebralen Endothelzellen mit TNF- α in einer Konzentration von 2ng/ml weder impedanzspektroskopisch noch morphologisch oder immunzytochemisch eine Beeinträchtigung beobachtet werden. Der Vergleich der ECIS-Messungen mit den immunzytologischen Untersuchungen der PBCEC zeigte zudem, dass die durch TNF- α hervorgerufene transiente Beeinträchtigung der BHS-Barrierefunktion offensichtlich nicht von einer Zellformveränderung begleitet wurde.

4.2.5 Das BHS-Entzündungsmodell als Modell für Transmigrations studien

Die Etablierung des Entzündungsmodells der Blut-Hirn-Schranke diene in erster Linie der Analyse der transendothelialen Leukozyten-Migration. Dabei stand die noch heute kontrovers diskutierte Frage im Vordergrund, ob die Immunzellen die Endothelzell-Barriere trans- oder parazellulär durchqueren. Zur Bearbeitung speziell dieser

Fragestellung musste das gewählte BHS-Entzündungsmodell bestimmte Ansprüche erfüllen, die in derartigen Studien häufig vernachlässigt wurden.

Falls die neutrophilen Granulozyten die Endothelzellschicht parazellulär überwinden, müssten sich die endothelialen Zellen voneinander separieren, damit die Neutrophilen zwischen ihnen hindurchwandern könnten. Die Schwachstellen der Endothelzell-Monolayer *in vitro* sind generell diejenigen Regionen, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu den interendothelialen *junctions* befinden und dementsprechend den Leukozyten, quasi kulturbedingt, vorgeben dort zu transmigrieren (Kvietys & Granger, 1997). Zudem verursachen zahlreiche inflammatorische Mediatoren, die *in vitro* eingesetzt werden um den zur Leukozyten-Transmigration notwendigen entzündlichen Prozess zu induzieren, per se Aufweitungen (*gaps*) der interendothelialen Kontaktzone, so dass *in vitro* häufig die Leukozyten-Transmigration durch diese parazellulären Öffnungen beschrieben wird. Da diese *gaps* in *in vivo*-Entzündungsmodellen bisher nicht beobachtet werden konnten, scheinen sie hauptsächlich ein *in vitro*-Phänomen zu sein (Kvietys & Sandig, 2001), so dass die parazelluläre Transmigration der Neutrophilen *in vitro* kritisch zu beleuchten ist.

Auch die Analyse und Beurteilung des Einflusses der Endothelzell-Neutrophilen-Interaktion auf die festen endothelialen Zell-Kontakte sind *in vitro* problematisch, da die interendothelialen *junctions in vitro* normalerweise schwächer entwickelt sind als *in vivo*. Hinzu kommt, dass die Proteinkomplexe der *tight junctions* kultivierter Endothelzellen im Vergleich zu den interendothelialen Zell-Kontakten *in vivo* fragiler aufgebaut sind. Durch inflammatorische Substanzen bzw. durch die Interaktion mit Leukozyten können diese leichter umorganisiert werden, was wiederum den parazellulären Transmigrationsweg der Immunzellen artifiziell begünstigen würde (Kvietys & Sandig, 2001).

Somit ist es sehr schwierig, *in vitro* die transendotheliale Leukozyten-Migrationsroute korrekt zu analysieren und Kulturartefakte auszuschließen. *In vitro*-Studien, in denen die Interaktion des Endothelzell-Monolayers mit Neutrophilen analysiert wurde, zeigten zudem oftmals, dass sich die Endothelzellen nach einigen Stunden der Interaktion vom Substrat lösten, da aufgrund des unfenestrierten Substrats der Kulturgefäße die transmigrierten Leukozyten in unmittelbarer Nähe der Endothelzellen blieben und durch ihre sezernierten Proteasen nachträglich die Endothelzellen schädigten (Kvietys & Sandig, 2001). Weitere *in vitro*-Untersuchungen zeigten, dass Neutrophile bei Einsatz eines Elastase-Inhibitors im HUVEC-Modell allein aufgrund der unterschiedlichen Beschichtung des Kulturgefäßes ein völlig unterschiedliches Transmigrationsverhalten aufwiesen (Furie et al., 1987; Huber & Weiss, 1989; Yoshida et al., 1995; Cepinskas et al., 1997).

Das in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der Leukozyten-Transmigration verwendete Entzündungsmodell der Blut-Hirn-Schranke zeigte eine hohe *in vivo*-Kom-

patibilität, was sich zum einen in den festen und komplex ausgeprägten *tight junctions*, die hohe transendotheliale Widerstände verursachten, und zum anderen morphologisch durch die distinkte Ausprägung der *marginal folds* entlang der Endothelzellgrenzen belegt wurde. Die hochsensitiven ECIS-Analysen zeigten zudem, dass die interendothelialen Zell-Kontakte, dargestellt in Form des ECIS-Parameters R_b , sehr hohe Werte erreichten und extrem empfindlich auf äußere Einflüsse reagierten. Die Membrankapazitäts-Werte (C_m) belegten eine gleichmäßig intakte Zellmembran der cerebralen Endothelzellen. Eine gestörte Integrität des Endothelzell-Monolayers in Form von Fenestrierungen oder Schwachstellen in der Region der interendothelialen Kontaktzone sowie *in vitro*-typische Beeinträchtigungen der Komplexität der *tight junction*-Strukturen konnten, den vielfältigen Untersuchungen zufolge, ausgeschlossen werden. Insbesondere zeigten sowohl die immunzytochemischen als auch die elektronenmikroskopischen Studien, dass es durch die Zytokin-induzierte Entzündungsaktivierung der PBCEC zu keiner Beeinträchtigung der Endothelzellform kam. Auch eine sogenannte *gap*-Bildung in der interendothelialen Kontaktzone der entzündungsstimulierten PBCEC, wie sie (Kvietys & Sandig, 2001) beschrieben und die die parazelluläre Transmigration der Leukozyten begünstigen würde, wurde durch das Monitoring der Zellmorphologie mit Hilfe der ECIS-Technik ausgeschlossen. Die Immunzellen wurden nämlich erst zu den Endothelzellen gegeben, nachdem die transiente Widerstandserniedrigung des Zell-Zell- und des Zell-Substrat-Kontakts nach der Cytokin-bedingten, reversiblen, geringfügigen Senkung ihr Ausgangsniveau fast wieder erreicht hatten. Die ebenfalls zeitaufgelöste Kontrolle der Membrankapazität gewährleistete während der Entzündungsstimulierung und der anschließenden Leukozyten-Transmigration eine permanente Kontrolle der Zellmembran. Durch die Messung des Parameters α (Zell-Matrix-Kontakt) wurde während der Endothelzell-Leukozyten-Interaktion kontinuierlich der Zusammenhalt der Endothelzellen mit dem Substrat kontrolliert. Die hohen Werte für α zeigten, dass die PBCEC sehr fest auf ihrem Substrat verankert waren.

Wie die umfassende Charakterisierung der PBCEC vor und nach der Entzündungsstimulierung belegte, wies das BHS-Entzündungsmodell keine typischen kulturbedingten Artefakte auf. Vielmehr wies es eine sehr hohe *in vivo*-Kompatibilität auf. Somit war es erstmals möglich, die Endothelzell-Leukozyten-Interaktion bzw. die Immunzell-Transmigration *in vitro* unter Ausschluss der charakteristischen *in vitro*-Artefakte und unter standardisierten Bedingungen durchzuführen. Dies wäre *in vivo* aufgrund der Unregelmäßigkeiten und komplexen Regelmechanismen nicht möglich gewesen. Zudem wären sowohl die impedanzspektroskopischen Untersuchungen, insbesondere die ECIS-Messungen, als auch die immunzytochemischen Analysen *in vivo* nicht durchführbar gewesen.

4.3 Die Endothelzell-Neutrophilen-Interaktion

Ziel dieser Forschungsarbeit war die zell- und molekularbiologische Analyse des Transmigrationsmechanismus von Leukozyten über die Blut-Hirn-Schranke. Durch die Anwendung eines vielfältigen Methodenspektrums in Kombination mit einer relativ neuen, biophysikalischen, nicht-invasiven Methode, der sogenannten ECIS-Technik, wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass das finale Ereignis der Adhäsionskaskade der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, die transendotheliale Migration der Leukozyten, sehr komplexen Mechanismen unterliegt.

Die initiale Phase der entzündungsinduzierten Adhäsionskaskade der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, das sogenannte 'Roller', und die anschließende feste Adhäsion der Leukozyten auf der Endothelzell-Oberfläche sind relativ gut untersucht. Dagegen ist die Frage, wie die Immunzellen die endotheliale Barriere überwinden können, obwohl selbst kleine Moleküle dazu nicht in der Lage sind, bis heute nicht befriedigend beantwortet worden (Rubin & Staddon, 1999). Selbst grundlegende Vorgänge des Leukozyten-Durchtritts, z. B. die Lokalisation ihres Transmigrationsweges, die zur Aufklärung des Mechanismus der Leukozyten-Diapedese essentiell sind, werden noch heute kontrovers diskutiert (Kvietys & Sandig, 2001).

Generell unterscheidet sich die Leukozyten-Migration durch das Endothel peripherer Gefäße grundlegend von der Immunzell-Diapedese mikrovaskulärer cerebraler Endothelzellen, die durch ihre festen Zell-Zell-Kontakte (*tight junctions*) eine hohe Barrierefunktion aufweisen. Die Möglichkeit der Leukozyten, während der Transmigration den 'Weg des geringsten Widerstands' zu wählen, wie dies beim fenestrierten Endothel oder beim Endothelzelltyp mit *tight junction*-freien Bereichen (*tricellular corners*) der Fall ist, scheidet beim unfenestrierten cerebralen Endothel aus. Das erschwert die Charakterisierung der Transmigration von Immunzellen durch die Blut-Hirn-Schranke mit intakter Barrierefunktion.

Durch den festen *tight junction*-vermittelten Verbund der cerebralen Endothelzellen ist die Blut-Hirn-Schranke für Leukozyten unpassierbar, so dass es ausschließlich unter pathologischen Bedingungen zu einer Extravasation von Plasmaproteinen, gefolgt oder begleitet von der Leukozyten-Diapedese in das Gehirnparenchym kommt (Perry et al., 1997). Dabei ist keineswegs geklärt, ob die Immunzellen die parazelluläre Route, d. h. den Weg durch die interendothelialen *junctions* hindurch wählen bzw. dort entlang geleitet werden, oder ob sie die vaskuläre Barriere transzellulär, d. h. durch die Endothelzelle hindurch, überwinden. Elektronenmikroskopisch sind beide Transmigrationswege bereits nachgewiesen worden (Greenwood et al., 1994). Ebenfalls ungeklärt ist, inwieweit sich der molekulare Mechanismus der Leukozyten-Diapedese durch das gesunde cerebrale Endothel von der im pathologischen Zustand unterscheidet. Auch die Frage, inwiefern sich die Transmigrationsmechanis-

men verschiedener Immunzelltypen unterscheiden und welche Adhäsionsmoleküle durch die Interaktion mit unterschiedlichen Immunzelltypen von den Endothelzellen exprimiert werden, ist noch nicht beantwortet (Perry et al., 1997).

Während akuter und chronischer Entzündungsreaktionen der Blut-Hirn-Schranke sowie unter gesunden Bedingungen dringen jeweils unterschiedliche Immunzell-Typen in das Gehirn-Parenchym ein. Deren Adhäsion und Transmigration unterliegen verschiedenen molekularen Mechanismen. Daher war es notwendig zu differenzieren, unter welcher Bedingung die transendotheliale Leukozyten-Migration untersucht werden sollte und welcher Immunzelltyp dementsprechend einzusetzen war. Dass neutrophile Granulozyten bei akuten Entzündungsreaktionen eine große Rolle spielen, wurde von Anthony et al. (1997) gezeigt, die im ZNS-Parenchym von Nagetieren nach traumatischen Verletzungen und nach Injektion von IL-1 β ins ZNS-Parenchym Neutrophile in hoher Anzahl nachwiesen.

In der vorliegenden Studie wurde die Leukozyten-Diapedese einerseits am akut entzündungsaktivierten und, zum Vergleich, am gesunden, nicht stimulierten, cerebralen Endothel untersucht, was den Einsatz neutrophiler Granulozyten notwendig machte. Im Vergleich zu den Neutrophilen wurden T-Helferzellen in den Transmigrationsstudien der vorliegenden Arbeit verwendet, die bei chronischen Erkrankungen des ZNS, wie beispielsweise der Multiplen Sklerose, eine große Rolle spielen.

4.3.1 Der Einfluss der Neutrophilen auf die Barrierefunktion

Mit Hilfe der ECIS-Technik wurde die quantitative Veränderung der Endothelzell-Morphologie in Form der ECIS-Parameter R_b (Zell-Zell-Kontakt), α (Zell-Substrat-Kontakt) und C_m (Membrankapazität) während der PBCEC-Neutrophilen-Interaktion untersucht. Die Sensitivität des Verfahrens zur Bestimmung des elektrischen Widerstands der interendothelialen Zell-Zell-Kontakte macht die ECIS-Technik zu einem vielseitigem Werkzeug bei der Untersuchung der cerebralen endothelialen Barrierefunktion (Lo et al., 1995) und deren Regulation während der Endothelzell-Leukozyten-Interaktion. Die Technik wurde bereits von (Tiruppathi et al., 1992) eingesetzt, um die morphologischen Änderungen von Endothelzellen aus Lungenarterien und -kapillaren unter dem Einfluss der pro-inflammatorischen Substanz α -Thrombin zeitaufgelöst zu untersuchen. Moy et al. (2000) setzten die ECIS-Methode ein, um den Einfluss Zytoskelett-vermittelter isometrischer Spannungsveränderungen auf die Zell-Zell- und Zell-Substrat-Kontakte von HUVECs durch die Applikation von Histamin zu quantifizieren. Die von Moy et al. (2000) und Tiruppathi et al. (1992) durchgeführten ECIS-Untersuchungen wurden bereits im Zusammenhang mit der TNF- α induzierten Entzündungsstimulierung und dem CHX-Einfluss auf die PBCEC diskutiert.

In der vorliegenden Studie wurde erstmals mit Hilfe der ECIS-Technik die Auswirkung neutrophiler Granulozyten auf die einzelnen, die Endothelzellmorphologie beschreibenden Komponenten der BHS (R_b , α und C_m) untersucht. So wurde mit der ECIS-Technik der Einfluss der Neutrophilen auf die Barrierefunktion der *tight junctions* und des Zell-Matrix-Kontakts der PBCEC zeitgleich und dennoch separat bestimmt. Die Möglichkeit zur anschließenden Korrelation der Ergebnisse der ECIS-Messungen mit denen der elektronenmikroskopischen, immunzytochemischen und impedanzspektroskopischen Untersuchungen belegte, dass die Methoden-Kombination für die Bearbeitung der gewählten Aufgabenstellung optimal war.

4.3.1.1 Die Rolle der E/L-Ratio

Die Befunde der ECIS-Messungen zeigten eindeutig, dass das Ausmaß der Beeinträchtigung von R_b und α direkt mit der Anzahl der applizierten neutrophilen Granulozyten korrelierte. Die hohe Empfindlichkeit der interendothelialen Zell-Zell-Kontakte in Kombination mit der hohen Sensitivität der ECIS-Technik ermöglichte es, selbst minimale Beeinträchtigungen der Endothelzell-Morphologie während der Leukozyten-PBCEC-Interaktion zu detektieren.

Die Zugabe von Neutrophilen zu den entzündungsaktivierten bzw. nicht aktivierten PBCEC in einer E/L-Ratio (Endothelzell-Leukozyten-Ratio) von 1:17 bzw. 1:20 führte im ECIS-Experiment zu einer erheblichen Senkung des Widerstands der interendothelialen Kontaktzone (R_b) und des Zell-Substrat-Kontakts (α). Interessanterweise wurde nach Zugabe von Neutrophilen zu den PBCEC in einer E/L-Ratio von 1:17 der ECIS-Parameter R_b zwar signifikant erniedrigt, stieg allerdings nach Erreichen des Tiefpunkts wieder bis auf ca. 60 % seines Ausgangswertes an. Demgegenüber kam es nach Applikation der Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:20 nicht zu einem Widerstandsanstieg der Zell-Zell-Kontakte und des Zell-Substrat-Kontakts. Dennoch verursachte die Zugabe der Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:20 keinen Integritätsverlust der *tight junctions*, was einem Zusammenbruch der Barrierefunktion gleichgekommen wäre. Ähnliche Befunde ergaben die Albumin-Permeabilitäts- und TER-Messungen von Huang et al. (1993) im HUVEC-Modell nach der Applikation neutrophiler Granulozyten. Die Autoren zeigten, dass die Interaktion von Neutrophilen mit dem HUVEC-Monolayer in einer E/L-Ratio von 1:10 keine Veränderung des transendothelialen Widerstands verursachte. Erst die Applikation der Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:25 bzw. 1:50 bewirkte einen starken Abfall des TERs. Huang et al. (1993) folgerten, dass ausschließlich die E/L-Ratio für die Veränderung der Endothelzell-Permeabilität verantwortlich ist, indem die Neutrophilen in niedriger E/L-Ratio bei Kontakt mit den HUVECs die Lücken zwischen den Endothelzellen verschließen.

Dadurch, dass die Neutrophilen in den interzellulären Raum der Endothelzellen wandern, wird die Permeabilität des HUVEC-Monolayers nicht beeinträchtigt. Dagegen wird durch eine hohe E/L-Ratio eine Permeabilitätssteigerung dadurch hervorgerufen, dass sich eine höhere Anzahl von Neutrophilen im Zell-Zwischenraum befindet. So werden durch die adhärierenden Neutrophilen via Signaltransduktion interzelluläre Lücken im HUVEC-Monolayer verursacht, die durch die nicht transmigrierenden Leukozyten nicht verschlossen werden, was eine Permeabilitätserhöhung des Endothelzell-Monolayers zur Folge hat (Huang et al., 1993).

Del Maschio et al. (1996) untersuchten den Einfluss von Neutrophilen auf die *adherens junctions* TNF- α -entzündungsstimulierter HUVECs. Sie zeigten mittels HRP (*horse-radish-peroxidase*) -Permeabilitätsmessungen, dass bereits eine E/L-Ratio von 1:10 die Permeabilität des HUVEC-Monolayers um das Vierfache ansteigen ließ. Die Erhöhung der Neutrophilen-Zahl auf eine E/L-Ratio ab 1:40 führte zu einem totalen, irreversiblen Zusammenbruch der Barrierefunktion der PBCEC. Huang et al. (1988; 1993) postulierten, dass eine E/L-Ratio ab 1:25 ohnehin unphysiologisch sei. In dieser hohen E/L-Ratio verursachte bereits die Adhäsion Chemokin-stimulierter Neutrophiler ohne anschließende Transmigration die Erniedrigung des transendothelialen Widerstands und die Steigerung der Albumin-Permeabilität des HUVEC-Monolayers. Dagegen führte die Zugabe von Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:10 zu keiner Veränderung des transendothelialen Widerstands (Huang et al., 1993).

Vollkommen gegensätzliche Befunde zeigten dagegen die impedanzspektroskopischen Untersuchungen von Burns et al. (2000), die selbst nach Applikation von Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:20 im ECIS-Experiment keine Beeinträchtigung der Barrierefunktion der HUVECs beobachteten. Nach Burns et al. (2000) verursacht die Neutrophilen-Adhäsion eine intrazelluläre Calcium-Erhöhung, durch die der junctionale Komplex der HUVECs kontrahiert oder verschoben wird. Auf diese Weise durchqueren die Leukozyten ohne Beeinträchtigung der interzellulären *junctions* den Endothelzell-Monolayer.

Der sehr niedrige transendotheliale Widerstand des von Burns et al. (2000) für die ECIS-Analysen eingesetzten HUVEC-Monolayers bei gleichzeitig serumhaltigen Kulturbedingungen lässt allerdings vermuten, dass schwache externe Stimuli aufgrund der geringen Empfindlichkeit der Barrierefunktion dieser Endothelzellen nicht detektiert werden konnten. In der von Burns et al. (2000) durchgeführten ECIS-Analyse wurde zudem ausschließlich der Gesamtwiderstand des HUVEC-Monolayers nach der Neutrophilen-Zugabe dargestellt, so dass sich geringe Änderungen speziell des Zell-Zell-Kontakts im Kurvenverlauf des Gesamtwiderstands nicht widerspiegeln konnten. Die PBCEC der vorliegenden Arbeit, deren Barriereigenschaften denen der Blut-Hirn-Schranke entsprachen, bildeten auf den ECIS-Goldelektroden einen bis zu 100-fach höheren TER aus als die von Burns et al. (2000) verwendeten HUVECs,

die einen transendothelialen Widerstand von maximal $11 \Omega \times \text{cm}^2$ entwickelten. Das von Burns et al. (2000) verwendete HUVEC-Modell mit induzierter Erhöhung der *tight junction*-Expression wies zudem Diskontinuitäten der festen Zell-Zell-Kontakte an den sogenannten *tricellular corners* auf, was sich im extrem niedrigen transendothelialen Widerstand dieses Endothelzell-Monolayers widerspiegelte. So stellte sich ohnehin die Frage, inwieweit die Anwendung der ECIS-Technik in Endothelzell-Systemen, wie dem von Burns et al. (2000) verwendeten HUVEC-Modell, überhaupt sinnvoll ist.

Das in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der Leukozyten-Transmigration verwendete BHS-Modell wies dagegen eine hohe Anzahl komplex aufgebauter *tight junctions* auf, die ohne Diskontinuitäten entlang der Zellgrenzen verliefen. Die Voruntersuchungen des PBCEC-Modells zeigten, dass die Zell-Zell-Kontakte und der Zell-Substrat-Kontakt unter Serum-freien, Hydrocortison-haltigen Kulturbedingungen höchste Sensibilität auf äußere Stimuli aufwiesen. So ließ sich mit Hilfe der ECIS-Technik zeigen, dass selbst die Applikation von Neutrophilen in einer niedrigen E/L-Ratio einen deutlich messbaren Effekt auf den Widerstand der Zell-Zell-Kontakte der PBCEC ausübte. Sogar durch die Zugabe von neutrophilen Granulozyten in einer E/L-Ratio von 1:5 wurde eine reversible Schwächung des interendothelialen Widerstands der *tight junctions* auf die Hälfte ihres Ausgangswertes nachgewiesen. Auch der Zell-Substrat-Kontakt der PBCEC wurde geschwächt, allerdings reversibel und wesentlich geringfügiger als der Zell-Zell-Kontakt. Die Membrankapazität blieb dagegen unbeeinflusst. Die Beeinträchtigung der Zell-Zell-Kontakte durch die Interaktion der PBCEC mit Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:2 war schwächer als bei einer E/L-Ratio von 1:5, aber immer noch nachweisbar.

Während Huang et al. (1993) eine Beeinträchtigung der Barrierefunktion des HUVEC-Monolayers erst ab einer E/L-Ratio von 1:25 beobachteten, konnte hier mit Hilfe der hoch sensitiven ECIS-Methode erstmals gezeigt werden, dass die Neutrophilen den Widerstand der interendothelialen Zell-Zell-Kontakte auch bei einer geringen E/L-Ratio (von 1:2 bzw. 1:5) beeinträchtigten. Der Vergleich der ECIS-Messungen mit denen der zeitgleich durchgeführten TER-Filtermessungen zeigte, dass durch die Applikation der Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:5 keine Veränderung des TER messbar war. Dagegen war im ECIS-Experiment nach Zugabe der Neutrophilen in der gleichen E/L-Ratio eine deutliche Widerstandserniedrigung von R_b (Zell-Zell-Kontakt) zu beobachten.

Im Gegensatz zu den ECIS-Analysen war bei den TER-Filtermessungen erst nach einer Zugabe der Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:20 eine signifikante Beeinträchtigung der Barrierefunktion der cerebralen Endothelzellen nachzuweisen. Der widerstandssenkende Effekt der Neutrophilen auf den Zell-Zell-Kontakt wurde durch die Entzündungsaktivierung der PBCEC mit TNF- α im Vergleich zu den nicht akti-

vierten PBCEC generell verstärkt. Da sich der Gesamtwiderstand einer Endothelzellschicht aus dem Zell-Zell- und dem Zell-Substrat-Kontakt, sowie der Membrankapazität zusammensetzt (Moy et al., 2000), ist zu vermuten, dass die TER-Filtermessungen der PBCEC, bei denen der TER als Gesamtwiderstand bestimmt wurde, nicht hinreichend sensitiv waren, um die ohnehin geringe und reversible Widerstandserniedrigung ausschließlich der Zell-Zell-Kontakte differenzieren zu können. Da die TER-Filtermessungen nicht zeitaufgelöst, sondern lediglich zu bestimmten Zeitpunkten erfolgten und jede Messung eine erhebliche Störung des Kultursystems bedeutete, war die Wahrnehmung einer geringfügigen Schwächung der Barrierefunktion der PBCEC ohnehin problematisch.

Der Zell-Zell- und der Zell-Substrat-Kontakt der PBCEC

Die Absenkung der Parameter R_b und α des PBCEC-Monolayers durch die Zugabe von Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:17 erfolgte zeitgleich innerhalb von 30 bis 40 Minuten. Dabei war die Absenkung des Zell-Matrix-Kontakts wesentlich geringfügiger als die des interendothelialen Widerstands. Der Zell-Substrat-Kontakt, der nach Zugabe einer geringen Neutrophilen-Zahl (E/L-Ratio 1:5) kaum beeinträchtigt wurde, wurde dagegen bei einer E/L-Ratio von 1:17 vorübergehend, aber dennoch deutlich, geschwächt. Dieser Effekt wurde durch eine Erhöhung der E/L-Ratio auf 1:20 noch verstärkt. Die Membrankapazität wurde durch die Neutrophilen auch in einer erhöhten E/L-Ratio nicht beeinträchtigt. Die vorliegenden Studien zeigen deutlich, dass das Maß und die Reversibilität der gestörten *tight junction*-Integrität durch die E/L-Ratio bestimmt wurde.

Die Zunahme der Endothelzell-Permeabilität *in situ* wird mit der Entstehung von kleinen Lücken zwischen den aneinandergrenzenden Endothelzellen in Zusammenhang gebracht, die bei der reversiblen Barrierebildung wieder geschlossen werden (Wu and Baldwin, 1992; Leach et al., 1995). Die ECIS-Analyse zeigte zudem, dass die transiente Schwächung der Barrierefunktion, die nach Kontakt mit den Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:5 bis 1:17 in einer Senkung des transendothelialen Widerstands resultierte, fast ausschließlich durch den parazellulären Widerstandsabfall verursacht wurde. Nach Moy et al. (2000) werden die Endothelzellen durch den verursachten Reiz nicht durch zentripetale Spannungserhöhung auseinandergezogen, sondern direkt an den Zell-Zell-Kontakten geschwächt. Die verbleibende Zellspannung verursacht die Bildung kleiner Lücken in der interendothelialen Zellkontaktzone, was letztlich die Reduzierung des ECIS-Parameters R_b zur Folge hat.

Trotz des durch die Neutrophilen-Interaktion verursachten gemeinsamen Abfalls der ECIS-Parameter R_b und α der PBCEC, erreichte der Wert des Zell-Substrat-Kontakts (α) in der Regenerationsphase wesentlich früher wieder seinen Ausgangswert als der

Wert für den Zell-Zell-Kontakt (R_b). Dieser sank bei Einsatz einer höheren E/L-Ratio (ab 1:20) entweder stetig weiter oder aber erreichte lediglich die Hälfte oder ein Viertel seines Ausgangswiderstands. Unabhängig von dem teilweise kompletten Verlust der Barrierefunktion durch die irreversible Öffnung oder Zerstörung der *tight junctions* der PBCEC, wurde der ursprüngliche Zustand der Zell-Substrat-Adhäsions-Kontakte wieder hergestellt. Dieser Befund läßt eine voneinander unabhängige molekulare Modellierung jener Kontakte möglich erscheinen, die den beiden ECIS-Parametern R_b und α zugrunde liegen. Der von Moy et al. (2000) nach der Histamin-Zugabe zum HUVEC-Monolayer beobachtete Einfluss auf die Parameter R_b und α zeigte, dass der Abfall des Gesamtwiderstands hauptsächlich durch den Parameter R_b verursacht wurde. Der Zell-Substrat-Kontakt wurde dagegen etwas verzögert, nach Senkung des R_b -Wertes, reduziert. Die Autoren konnten allerdings nachweisen, dass während der Regenerationsphase zunächst der Zell-Substrat-Kontakt wieder anstieg und etwas verzögert der Zell-Zell-Kontakt gestärkt wurde. Nach Moy et al. (2000) erlaubte diese zeitliche Verzögerung des Anstiegs der Parameter R_b und α in der Regenerationsphase zwei Schlussfolgerungen: entweder werden der Zell-Zell- und der Zell-Matrix-Kontakt unabhängig voneinander gestärkt, wobei sich der Widerstand des Parameters α schneller regeneriert als R_b , oder aber durch die mit der Stärkung des Zell-Substrat-Kontakts einhergehende Spannungsveränderung wird die Barrierebildung der interendothelialen Kontakte erst ermöglicht. In den Studien von Moy et al. (2000) erreichten die ECIS-Parameter R_b und α nach dem Histamin-verursachten Widerstandsabfall des HUVEC-Monolayers letztlich wieder vollständig ihre Ausgangswerte.

Die Barrierefunktion der primärkultivierten cerebralen Endothelzellen war zu Beginn der ECIS-Langzeit-Messung je nach Entwicklungszustand der PBCEC zwar maximal ausgeprägt, sie wurde im Verlauf des Experiments allerdings kulturbedingt, und zwar unabhängig von externen Stimuli, geringfügig geschwächt. Dieser Aspekt wurde daher bei der Bewertung der Regenerationsphase der ECIS-Parameter mitberücksichtigt. In der vorliegenden Arbeit zeigte die ECIS-Analyse der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion bei einer E/L-Ratio von 1:20 deutlich, dass die reversible Festigung des Zell-Substrat-Kontakts unabhängig vom Verlust der Barrierefunktion der interendothelialen *tight junctions* erfolgte, welcher durch die Immunzellen verursacht worden war. Dieser Befund erlaubte die Schlussfolgerung, dass der durch die Neutrophilen verursachte molekulare Wirkmechanismus der Regulation des Zell-Substrat-Kontakts unabhängig von der Regulation des barrierebildenden junctionalen Komplexes erfolgte. Dieser Effekt ist den ECIS-Analysen zufolge abhängig von der gewählten E/L-Ratio. Erst nach Zugabe von Neutrophilen in einer E/L-Ratio ab 1:30 wurde auch der Zell-Substrat-Kontakt irreversibel um bis zu maximal 60 % gesenkt. Die barrierebil-

denden *tight junctions* der PBCEC verloren bei derart hohen E/L-Ratios dagegen vollständig ihre Integrität.

4.3.1.2 Der Zeitverlauf der Barrierefunktionsstörung durch die Neutrophilen

Die Frage, in welchem zeitlichen Rahmen die Transmigration der Neutrophilen erfolgt, ist ein sehr wichtiger Aspekt im Kontext der Untersuchung zur Endothelzell-Barrierefunktion und wird noch heute kontrovers diskutiert.

So stellten Burns et al. (1997) die Ergebnisse von Del Maschio et al. (1996) in Frage, welche bei einer Einzelmessung 60 Minuten nach der Neutrophilen-Applikation zu den HUVECs in einer E/L-Ratio von 1:10 eine 4-fache Permeabilitätserhöhung beobachteten. Nach Burns et al. (1997) und Huang et al. (1988) ist die Transmigration von Neutrophilen bereits 10 Minuten nach deren Zugabe abgeschlossen. Die Aussage von Burns et al. (1997) setzte allerdings voraus, dass die Neutrophilen den HUVEC-Monolayer innerhalb von 10 Minuten erreichten und mit den Endothelzellen interagierten, bis sie schließlich transmigrierten. Sowohl die ECIS-Messungen als auch die TER-Filtermessungen der vorliegenden Studie zeigten, dass die Barrierefunktion des PBCEC-Monolayers durch die Neutrophilen-Interaktion innerhalb eines mehrstündigen Zeitfensters beeinträchtigt wurde. Die Zeitdauer der Widerstandssenkung bis zum Wiedererreichen des Maximums nach Reduzierung des ECIS-Parameters R_b erstreckte sich insgesamt über einen Zeitraum von mindestens 5-6 Stunden. Das von Burns et al. (2000) in der ECIS-Analyse als Positiv-Kontrolle verwendete Histamin wirkte sich dagegen bereits nach Sekunden nach seiner Zugabe widerstandssenkend aus, indem es die interendothelialen Zell-Kontakte lockerte (Killackey et al., 1986; Huang et al., 1993). Die hier durchgeführte ECIS-Analyse zum Zeitverlauf der PBCEC-Neutrophilen-Interaktion wirft die Frage auf, ob die Wirkung des Histamins überhaupt als Kontrolle zum zeitlichen Ablauf der Interaktion der Neutrophilen mit dem HUVEC-Monolayer geeignet war.

Bolton et al. (1998) konnten mittels HRP-Permeabilitäts-Untersuchungen *in vivo* nachweisen, dass erst 4 Stunden nach Injektion des pro-inflammatorischen Cytokins IL-1 β (Interleukin-1 β) in das Gehirnparenchym von Ratten eine Neutrophilen-Adhäsion und die damit verbundene Funktionsstörung der BHS einsetzte. Die Autoren zeigten weiterhin, dass 8-12 Stunden nach Injektion von IL-1 β die Barrierefunktion der BHS wieder regeneriert war und die zuvor adhärenenten Neutrophilen nicht mehr auf dem Endothel nachzuweisen waren. Die Beeinträchtigung der Barrierefunktion der PBCEC durch die Zugabe von Neutrophilen setzte in der vorliegenden Studie zwar schon nach ca. 20 Minuten ein, allerdings wurden die Immunzellen direkt auf den bereits seit 4 Stunden entzündungsaktivierten Monolayer appliziert. In der von Bolton et al. (1998) durchgeführten Studie wurde das entzündungsstimulierende IL-

1 β in das ZNS-Parenchym lebender Ratten injiziert, so dass das zur Immunzell-Adhäsion notwendige Adhäsionsprotein-Profil zunächst auf der Endothelzelloberfläche exprimiert werden musste. So wird beispielsweise das für den initialen Kontakt der Leukozyten notwendige E-Selektin erst 2-4 Stunden nach Aktivierung des Endothels mit IL-1 β oder TNF- α durch *de novo* Synthese auf der Zelloberfläche exprimiert und lässt sich in einem Zeitraum von 4-8 Stunden nach Entzündungsaktivierung nachweisen (Bevilacqua et al., 1987; Abbassi et al., 1993). *In vivo* müssen die Neutrophilen zunächst chemotaktisch mit dem Blutstrom zum Entzündungsherd transportiert werden, was *in vitro* ebenfalls entfiel. Die Zeitspanne von 4 Stunden nach IL-1 β -Injektion in das Gehirn-Parenchym mit der Folge der Neutrophilen-Adhäsion und anschließender Beeinträchtigung der Barrierefunktion der BHS entfiel somit in den vorliegenden *in vitro*-Studien. Daher stimmte die von Bolton et al. (1998) ermittelte Dauer der Barrierefunktions-Störung zeitlich mit derjenigen der *in vitro*-ECIS-Analysen der PBCEC-Neutrophilen-Interaktion überein.

Wie der Vergleich der von Bolton et al. (1998) durchgeführten *in vivo*-Analysen mit den hier ermittelten impedanzspektroskopischen *in vitro*-Befunden zeigt, wies der mehrstündige Verlauf der Endothelzell-Neutrophilen-Interaktion eine sehr hohe *in vivo*-Kompatibilität auf. Beim Transmigrations-Ereignis selbst handelt es sich allerdings wahrscheinlich um einen schnellen Vorgang. Inwiefern sich diesbezüglich Unterschiede zwischen Endothelzellen peripherer Gefäße und solchen cerebralen Ursprungs ergeben, sei in Frage gestellt.

Die Aussage der Permeabilitätsmessungen

Prinzipiell war nicht sichergestellt, dass die Transmigration der Leukozyten tatsächlich simultan erfolgte, so dass eine Korrelation der TER-Messungen der PBCEC mit der Transmigration der Neutrophilen durch den Endothelzell-Monolayer problematisch ist. So zeigten die REM-Analysen der vorliegenden Studie eindeutig, dass alle Interaktionsstadien der Neutrophilen-Adhäsionskaskade während der Neutrophilen-PBCEC-Wechselwirkung unter entzündlichen Bedingungen gleichzeitig vertreten waren. Eine simultane Transmigration der Neutrophilen konnte nicht nachgewiesen werden. Diese Beobachtung zeigte eindeutig, dass die Korrelation der Leukozyten-induzierten Permeabilitätserhöhung eines Endothelzell-Monolayers mit der Transmigration nicht möglich ist. Vielmehr ist die Leukozyten-Transmigration als separates Ereignis der Endothelzell-Leukozyten-Interaktion zu untersuchen. Da die Permeabilitäts- und Widerstandsmessungen lediglich Aussagen über die Endothelzell-Leukozyten-Interaktion erlauben, sind diese zur Charakterisierung der Transmigration nur in Kombination mit einer detaillierten elektronenmikroskopischen Analyse aussagekräftig.

Die ECIS-Untersuchungen dieser und anderer Arbeiten zeigten, dass die Neutrophilen-Endothelzell-Interaktion zwar nachweislich die Barrierefunktion der Endothelzellen beeinflusst, der Neutrophilen-bedingte Stimulus jedoch geringer ist als jener von pro-inflammatorischen Substanzen, wie z. B. α -Thrombin oder Histamin. Die impedanzspektroskopische Analyse der Barrierefunktion eines Endothelzell-Monolayers erforderte somit ein Zellkultursystem, das durch seine komplexe Ausprägung der interendothelialen Zell-Kontakte in Verbindung mit der hochsensitiven ECIS-Methode in der Lage war, auf einen schwachen Stimulus ausreichend empfindlich zu reagieren. Trotz identischer Fragestellung und Anwendung gleicher Methoden ist deshalb der Vergleich der Endothelzell-Neutrophilen-Interaktion in verschiedenen Endothelzell-Modellen mit unterschiedlichen Barriereigenschaften und Sensibilitäten gegenüber externen Stimuli, problematisch.

4.3.2 Die *tight junction*-assoziierten Proteine und die Barrierefunktion

Zur Analyse ausgewählter *tight junction*-assoziiierter Proteine der PBCEC unter entzündlichen Bedingungen und/oder während der PBCEC-Neutrophilen-Interaktion wurden Western-Blot- und Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt. Diese sollten Aufschluss darüber geben, inwiefern die Inkubation der PBCEC mit TNF- α bzw. mit den Neutrophilen zu einer Beeinträchtigung der einzelnen *tight junction*-Proteine führte. Besonders interessant war dabei die Analyse derjenigen Entzündungsbedingung bzw. der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion in einer E/L-Ratio, die zu einer Permeabilitätssteigerung der PBCEC führte. Auf diese Weise war es möglich, die Beeinträchtigung des TERs bzw. des ECIS-Parameters R_b mit der Veränderung einzelner *tight junction*-assoziiierter Proteine zu vergleichen. Obwohl die molekulare Struktur der *tight junctions* relativ gut untersucht ist, ist noch wenig über deren Regulation unter pathophysiologischen Bedingungen bekannt (Huber et al., 2001). Im Allgemeinen erfolgt die Regulation der *tight junction*-assoziierten Proteine durch Signaltransduktions-Mechanismen, an denen die Signal-Moleküle cAMP, Calcium (Ca^{2+}), G-Proteine, Phospholipase C, kleine GTP-bindende Proteine und Protein Kinase C beteiligt sind (Gonzalez-Mariscal et al., 1985; Balda et al., 1993; Jou et al., 1998; Mullin et al., 1998).

4.3.2.1 ZO-1, Occludin und Claudin-5

Die Analysen von Huber et al. (2001), die den Effekt einer induzierten peripheren Entzündungsreaktion auf die Expression der *tight junction*-assoziierten Proteine Occludin, ZO-1 und Claudin-1 in Korrelation zur Permeabilität der BHS *in vivo* untersuch-

ten, zeigten erstaunliche Parallelen zu den Immunoblot-Befunden der vorliegenden Studie. So zeigten die Autoren, dass die Induktion einer peripheren Entzündungsreaktion durch die Injektion entzündungsstimulierender Substanzen, wie Formalin und λ -Carrageenan, in die Pfötchen von Ratten die Permeabilität der BHS *in vivo* erheblich steigerte. Die parallel zu den Permeabilitätsmessungen durchgeführten Western-Blot-Analysen zeigten, dass die Occludin-Expression der untersuchten cerebralen Kapillarendothelzellen reduziert wurde, wogegen die ZO-1- und die Aktin-Expression gesteigert wurden. Claudin-1 wurde dagegen quantitativ unverändert exprimiert.

Die Western-Blot-Analysen der hier untersuchten *tight junction*-assoziierten Proteine der PBCEC korrelieren weitestgehend mit den von Huber et al. (2001) durchgeführten Immunoblot-Analysen der entzündungsaktivierten Kapillarendothelzellen der Ratte *in vivo*. So wurde nach einer 4-stündigen Inkubation der PBCEC mit 20 ng/ml TNF- α die Permeabilität des cerebralen Endothelzell-Monolayers erhöht. Die Western-Blot-Analysen der mit 20 ng/ml TNF- α entzündungsaktivierten PBCEC zeigten, dass die Expression des *tight junction*-Proteins Occludin signifikant erniedrigt wurde, ZO-1 dagegen etwas stärker und Claudin-5 auf gleichem Niveau exprimiert wurde. Die parallel zu den Western-Blots durchgeführten Immunfluoreszenzen der PBCEC zeigten, dass durch deren Entzündungsaktivierung die Lokalisation der *tight junction*-assoziierten Proteine verändert wurde. So erschien sowohl die Claudin-5- als auch die ZO-1-Expression an den Zellgrenzen der PBCEC verzerrt. ZO-1 wurde geringfügig ins Zytosol der PBCEC umverlagert.

Weder die Western-Blot-Analysen noch die Immunfluoreszenzen der PBCEC, die mit 2 ng/ml TNF- α entzündungsaktiviert worden waren, zeigten eine Veränderung der untersuchten *tight junction*-assoziierten Proteine Occludin, ZO-1 und Claudin-5. Wie die immunzytochemischen Analysen zeigen, war es entscheidend, TNF- α in einer Konzentration einzusetzen, die nicht schon vor der Inkubation der PBCEC mit den Neutrophilen zu einer Veränderung der Expression der *tight junction*-Proteine führte.

Occludin

Das *tight junction*-assoziierte Protein Occludin, das als integrales Protein vier transmembrane Domänen aufweist, ist besonders in den *tight junctions* der Blut-Hirnschranke hoch konzentriert (Hirase et al., 1997). Balda et al. (1996) und McCarthy et al. (1996) konnten nachweisen, dass eine Überexpression des Occludins direkt mit einem Anstieg des TER des Endothelzell-Monolayers korrelierte. Obwohl Morita et al. (1999a) zeigten, dass Occludin zur Bildung der *tight junctions* nicht unbedingt notwendig ist, belegten Balda et al. (1993), dass der interendotheliale transendotheliale Widerstand erst durch die Anwesenheit von Occludin in den *tight junctions* erheblich

gesteigert wird. Untersuchungen von Wong & Gumbiner (1997) und Balda et al. (1996) demonstrierten, dass Occludin sowohl strukturell als auch funktionell eine Schlüsselrolle innerhalb der *tight junctions* spielt. Somit ist Occludin höchstwahrscheinlich in den Regulations-Mechanismus der Permeabilitätssteigerung eines Endothelzell-Monolayers während einer entzündlichen Reaktion involviert (Sakakibara et al., 1997). Auch Bolton et al. (1998) zeigten, dass eine durch Interleukin-1 β verursachte Steigerung der Permeabilität der BHS mit einer reduzierten Occludin-Expression korrelierte.

Unter physiologischen Bedingungen basiert der Regulations-Mechanismus der *tight junctions* auf Phosphorylierungen (Nigam et al., 1991; Sakakibara et al., 1997; Wong & Gumbiner, 1997). So wird Occludin an Serin, Threonin und Tyrosin phosphoryliert (Sakakibara et al., 1997; Singer et al., 1994; Staddon et al., 1995). Gloor et al. (1997) zeigten, dass eine stark erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung die Permeabilität cerebraler Endothelzellen deutlich erhöht. Eine verminderte Occludin-Expression cerebraler Kapillarendothelzellen, die von Huber et al. (2001) nach Applikation eines peripheren Entzündungsstimulus beobachtet wurde, wurde von den Autoren mit einer entzündungsinduzierten Steigerung der Tyrosin-Phosphorylierung in Zusammenhang gebracht. Möglicherweise ist die hohe Konzentration von Glycin und Tyrosin des primären extrazellulären *Loops* des Occludins für dessen hohe Tyrosin-Phosphorylierung verantwortlich (Furuse et al., 1994).

Inwiefern die verminderte Expression des PBCEC-Occludins durch die Inkubation mit 20 ng/ml TNF- α mit einer erhöhten Tyrosin-Phosphorylierung einherging, konnte anhand der durchgeführten Western-Blot-Analysen nicht beurteilt werden. Die Occludin-Immunoblot-Analysen der vorliegenden Studie zeigen, dass das Occludin nicht als einzelne distinkte Bande vorlag, sondern vielmehr als ein multiples, weit aufgespreitetes Bandenmuster, dessen kleinste Molekulargewichts-Bande am stärksten ausgeprägt war. Auch Furuse et al. (1993) und Saitou et al. (1997) beobachteten dieses charakteristische Occludin-Bandenmuster im Western-Blot.

Sakakibara et al. (1997) zeigten, dass durch die Phosphorylierung der Serin- und Threonin-Reste des Occludins dessen Bande im Immunoblot nach oben (in Richtung des geringeren Molekulargewichts) verschoben wurde und somit in der SDS-PAGE als multiples Banden-Profil erschien. Die Bande des geringsten Molekulargewichts, die nach unten das multiple Banden-Profil abschließt und am stärksten ausgeprägt ist, entspricht der unphosphorylierten bzw. wenig phosphorylierten Form des Occludins. Dagegen entsprechen die Banden des höheren Molekulargewichts, die sich der dominanten unteren Bande nach oben anschließen, der phosphorylierten Form des Occludins (Sakakibara et al., 1997).

Sakakibara et al. (1997) zeigten zudem, dass nicht jeder Occludin-Antikörper in der Lage ist, sowohl die phosphorylierte Form als auch die dephosphorylierte Form des

Occludins im Western-Blot nachzuweisen. Die Immunoblot-Analysen der Autoren zeigten, dass einer der verwendeten monoklonalen Occludin-Antikörper ausschließlich die phosphorylierte Form des Occludins erkannte, nicht aber die dephosphorylierte Form, was sich im Fehlen der unteren dominanten Bande äußerte. Dagegen konnten die Autoren durch den Einsatz eines anderen monoklonalen Antikörpers sowohl die phosphorylierte als auch die dephosphorylierte Form des Occludins nachweisen.

Das Occludin-Bandenmuster der Western-Blots der vorliegenden Arbeit war identisch mit dem von Sakakibara et al. (1997) nachgewiesenen Bandenmuster bei der Verwendung jenes Antikörpers, der beide Occludin-Formen nachweisen konnte. Dies manifestierte sich in der dominanten unteren Bande des Occludins der PBCEC und dem nach oben verschobenen multiplen Bandenmuster. Stevenson & Goodenough (1984) und Stevenson et al. (1988a) zeigten, dass nur die phosphorylierte Form des Occludins für das regelrechte *tight junction-assembly* verantwortlich ist. Das Occludin in nicht oder nur wenig phosphorylierter Form ist in der basolateralen Membran der Zelle verteilt, wogegen ausschließlich das phosphorylierte Occludin selektiv in den *tight junctions* akkumuliert ist. Die Phosphorylierung des Occludins nimmt somit eine Schlüsselrolle für das *tight junction-assembly* ein (Sakakibara et al., 1997).

Das in den vorliegenden Immunoblots nachgewiesene phosphorylierte Occludin der nicht oder mit 2 ng/ml TNF- α entzündungsaktivierten PBCEC verdeutlichte somit die hohe Konzentration ihrer komplex organisierten *tight junctions*. Auch die Zugabe von Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:5 zu den PBCEC veränderte diesen Status der Occludin-Phosphorylierung nicht. Damit einhergehend blieb der TER unter diesen Bedingungen unverändert hoch. Eine Entzündungsstimulierung der PBCEC mit 20 ng/ml TNF- α führte dagegen zu einer erheblichen Reduzierung des oberen multiplen Occludin-Bandenmusters, während die charakteristische dominante untere Bande unverändert ausgeprägt war. Eine identische Reduktion des Bandenmusters wurde durch die Inkubation der PBCEC mit Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:20 nachgewiesen. Dieser Befund zeigte, dass durch die Inkubation der PBCEC mit 20 ng/ml TNF- α das Occludin teilweise dephosphoryliert wurde. Im Gegensatz zur phosphorylierten Form des Occludins, die für ein intaktes *tight junction-assembly* sorgt (Sakakibara et al., 1997), führt eine Dephosphorylierung des Occludins zu einem Integritätsverlust der *tight junctions* und damit zu einer Schwächung der Barrierefunktion des Endothelzell-Monolayers. Die durch die Inkubation der PBCEC mit 20 ng/ml TNF- α bzw. mit Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:20 verursachte Dephosphorylierung spiegelte sich dementsprechend in der impedanzspektroskopisch nachgewiesenen Schwächung der Barrierefunktion der PBCEC wieder.

Da durch die Inkubation mit 2 ng TNF- α zwar nachweislich eine Entzündungsreaktion der Endothelzellen ausgelöst wurde, die Occludin-Expression im Western-Blot je-

doch unverändert blieb, konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der Entzündungsreaktion der PBCEC und der Dephosphorylierung des Occludins hergestellt werden. Offensichtlich ist die eingesetzte Konzentration des TNF- α der ausschlaggebende Faktor für die Occludin-Expression. Inwiefern dieser Befund TNF- α -spezifisch war, kann aufgrund fehlender entzündungsstimulierender Vergleichssubstanzen nicht gesagt werden.

ZO-1

Im Gegensatz zur Beeinträchtigung der Occludin-Expression der PBCEC durch die Inkubation der Endothelzellen mit 20 ng/ml TNF- α zeigten die Immunoblot-Analysen, dass die ZO-1 Expression nicht beeinflusst, sondern teilweise sogar geringfügig verstärkt wurde. Auch die Inkubation der PBCEC mit Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:5 führte zu keiner Veränderung der ZO-1 Expression. Die Doppelbande, die stets beim ZO-1-Nachweis im Western-Blot zu sehen war, zeigt die zwei alpha-Isoformen des ZO-1 Proteins, die durch ein alternatives RNA-splicing entstehen (Willott et al., 1992). Auch Huber et al. (2001) wiesen im Western-Blot eine Verstärkung der ZO-1-Expression der Kapillarendothelzellen von Ratten nach, nachdem sie zuvor eine periphere Entzündungsstimulierung induziert hatten.

ZO-1 kann ebenso wie Occludin an seinen Serin-, Threonin- und Tyrosin-Resten phosphoryliert werden (Singer et al., 1994; Staddon et al., 1995; Balda et al., 1996; Collares-Buzato et al., 1998). So wurde von Huber et al. (2001) auch für ZO-1 ein durch die Entzündungsstimulierung verschobenes Phosphorylierungs-Muster für die veränderte ZO-1-Expression diskutiert, was möglicherweise einen Kompensationsmechanismus der Endothelzellen darstellt, um vermehrt *tight junction*-Proteine aus dem Zytoplasma in der Zellmembran anzureichern (Huber et al., 2001). Der Western-Blot des hier eingesetzten ZO-1-Antikörper erlaubte keine Aussage zum Phosphorylierungs-Status des Proteins und konnte obige Frage damit nicht beantworten.

Blum et al., (1997) zeigten, dass die Inkubation von mikrovasculären Endothelzellen mit Cytokinen zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts und zu einer Veränderung der *tight junctions* führt. Da ZO-1 mit dem Aktin-Zytoskelett interagiert (Nusrat et al., 2000) und sich die Entzündungsaktivierung der cerebralen Endothelzellen in einer erhöhten Expression von ZO-1 und Aktin widerspiegelte, führt möglicherweise die Umstrukturierung des Zytoskeletts zu der erhöhten Expression des ZO-1-Proteins (Huber et al., 2001). Interessant war in diesem Kontext die durch die PBCEC-Neutrophilen-Interaktion bei einer E/L-Ratio von 1:20 verursachte Umverteilung des ZO-1 von den Zellgrenzen in das Zytosol der PBCEC und weiter zu deren Zellkern. Inwiefern diese Umverteilung des ZO-1 mit der Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts korreliert, müssten weitere Untersuchungen zeigen. Da allerdings bei der Umverlage-

zung des ZO-1-Proteins eine Zellformveränderung der PBCEC beobachtet werden konnte, ist eine durch die Neutrophilen-Interaktion verursachte Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts der PBCEC denkbar.

Claudin-5

Die Claudin-5-Expression blieb durch die Inkubation der PBCEC mit 20 ng/ml TNF- α unverändert. Auch die Inkubation der PBCEC mit Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:5 und 1:20, die eine signifikante Senkung des TER und des ECIS-Parameters R_b verursachte, führte im Western-Blot zu keiner Veränderung der Claudin-5-Expression. Huber et al. (2001) zeigten ebenfalls eine unveränderte Claudin-Expression der cerebralen Kapillarendothelzellen nach Induktion einer peripheren Entzündungsreaktion. Allerdings untersuchten die Autoren die Claudin-1- und nicht die Claudin-5-Expression.

Die Claudine sind als dimerisierte Stränge in die Plasmamembran eingebettet und interagieren mit den Claudinen der Nachbarzellen. Die Impermeabilität der *tight junctions* ist abhängig von der Intensität der Interaktion zwischen den Claudin-Strängen und variiert entsprechend den beteiligten Claudin-Typen (Furuse et al., 1999). Über die Claudin-Typen der BHS ist noch wenig bekannt (Huber et al., 2001). Morita et al. (1999b) zeigten, dass Claudin-5 nicht in Kapillarendothelzellen vorkommt.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Claudin-5-Expression der BHS während einer entzündlichen Reaktion und während der Neutrophilen-Endothelzell-Interaktion untersucht. Die unveränderte Expression von Claudin-5 während der Entzündungsaktivierung mit 20 ng/ml TNF- α lässt vermuten, dass die *tight junctions* der BHS trotz der Senkung des TERs intakt blieben. Dieser Befund unterstreicht die Ergebnisse von Furuse et al. (1999), die zeigten, dass die Claudine die Proteine sind, die die Aufrechterhaltung der *tight junction*-Integrität sicherstellen.

Insgesamt zeigten die Western-Blot-Analysen nach Entzündungsaktivierung der PBCEC mit 2 ng/ml TNF- α und der PBCEC-Neutrophilen-Interaktion bei einer E/L-Ratio von 1:5, dass die *tight junction* Proteine Occludin, ZO-1 und Claudin-5 unverändert exprimiert wurden. Ausschließlich unter Bedingungen, die den TER des Endothelzell-Monolayers signifikant senkten (20 ng/ml TNF- α bzw. E/L-Ratio von 1:20), wurde die Occludin-Expression beeinträchtigt. Claudin-5 und ZO-1 wurden dagegen gleichbleibend exprimiert. Daraus lässt sich schließen, dass die Dephosphorylierung des Occludins unter entzündlichen Bedingungen bzw. während der PBCEC-Neutrophilen-Interaktion wahrscheinlich eine Schlüsselrolle bei der *tight junction*-Regulation spielt.

Der Einfluss von Fixierungsartefakten

Durch die parallel zu den ECIS- und TER-Messungen durchgeführten immunzytologischen Analysen (Immunfluoreszenzen) einzelner *tight junction*-assoziierter Proteine sollte geprüft werden, inwiefern sich die impedanzspektroskopisch nachgewiesene Beeinträchtigung der Barrierefunktion der PBCEC durch die Neutrophilen in Abhängigkeit von der eingesetzten E/L-Ratio anhand einer veränderten Expression der untersuchten Proteine bestätigen ließ. Die immunzytologischen Studien zeigten, dass die untersuchten *tight junction*-assozierten Proteine kontinuierlich entlang der Zellgrenzen verliefen. Diskontinuitäten entlang der Zell-Zell-Kontakte oder die sogenannten *tricellular corners*, die von Simionescu et al. (1976), Walker et al. (1994) und Yee & Revel (1975) in Endothelzell-Monolayern nachgewiesen wurden, traten im PBCEC-Monolayer nicht auf. Somit zeichneten sich die PBCEC vor Zugabe der Neutrophilen durch eine intakte BHS-charakteristische Integrität aus.

Burns et al. (2000) zeigten in ihren immunzytologischen Analysen, dass durch die Interaktion neutrophiler Granulozyten mit den entzündungsstimulierten HUVECs die Expression der *tight junction*-assozierten Proteine ZO-1 und ZO-2 nicht beeinträchtigt wurde. Die zunächst beobachtete verminderte Expression von ZO-1 und ZO-2 wurde von Burns et al. (2000) Fixierungsartefakten zugeschrieben. So postulierten die Autoren, dass das Verschwinden bzw. die Verminderung der Expression der untersuchten Proteine nachträglich durch die Freisetzung der Neutrophilen-Proteasen verursacht wurde, da diese durch die Fixierung nicht inaktiviert wurden. Ginzberg & Downey (1999) wiesen die Proteine ZO-1 und β -Catenin intestinaler Epithelzellen (T_{84} -Zellen) nach der Transmigration neutrophiler Granulozyten durch die Postfixierung der Epithelzellen mit Ameisensäure immunzytochemisch nach. Fixierte man die Epithelzellen allerdings nach der Transmigration der Neutrophilen ausschließlich mit Paraformaldehyd, so konnte keine Expression des ZO-1 bzw. des β -Catenins beobachtet werden, was eindeutig auf einem Fixierungsartefakt beruhte. Nach Ginzberg & Downey (1999) konnten die Proteasen der Neutrophilen durch die Fixierung mit 2 %-igem Paraformaldehyd nicht inaktiviert werden. Durch die anschließende Permeabilisierung der Zellen mit Triton-X-100, die notwendig war um das zytoplasmatische Eindringen des Antikörpers zu ermöglichen, gelangten die Neutrophilen-Proteasen in die Epithelzellen und verursachten dort den nachträglichen Abbau der junctionalen Proteine. Burns et al. (2000) konnten nach der Inkubation des entzündungsaktivierten HUVEC-Monolayers mit neutrophilen Granulozyten in einer E/L-Ratio von 1:2 ebenfalls zeigen, dass die Expression von ZO-1, ZO-2 und Occludin durch die ausschließliche Fixierung mit 2 %-iger Paraformaldehyd-Lösung vollständig zurückging. Im Gegensatz dazu wurden die Proteine der HUVECs durch Postfixie-

rung in 1 %-iger Ameisensäure nach der Neutrophilen-Interaktion unvermindert exprimiert.

Die für diese Studie eingesetzten PBCEC wurden nach der Inkubation mit den Neutrophilen intensiv mit PBS gewaschen und anschließend 10 Minuten mit einer Methanol-Eisessigsäure-Lösung (97:3) fixiert. Die Nachfixierung erfolgte kurz vor der Einbettung der Proben mit einer 4 %-igen Paraformaldehyd-Lösung. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit eindeutig demonstriert werden, dass das Maß der Expression der untersuchten *tight junction*-assoziierten Proteine mit der E/L-Ratio korrelierte und dieser Effekt nicht auf einem Fixierungsartefakt beruhte. Die immunzytologischen Analysen zeigten, dass die Applikation einer hohen Anzahl Neutrophiler zu den PBCEC die Expression der untersuchten *tight junction*-assoziierten Proteine signifikant reduzierte. Nach der Interaktion der neutrophilen Granulozyten mit den cerebralen Endothelzellen in einer E/L-Ratio von 1:20 kam es zu einer signifikanten Reduzierung der ZO-1- bzw. der Claudin-5-Expression. Allerdings wurde die Claudin-5 Expression weit weniger geschächt als die des ZO-1. Eine PBCEC-Neutrophilen-Inkubation im E/L-Verhältnis von 1:5 dagegen ließ die ZO-1- und die Claudin-5-Expression dagegen unvermindert. Auch nach einer Inkubationszeit der Neutrophilen mit den PBCEC von 2 Stunden konnte keine Verminderung der ZO-1- oder der Claudin-5-Expression beobachtet werden. Erstmals konnte somit nachgewiesen werden, dass durch eine Erhöhung der E/L-Ratio auf 1:20 auch die Claudin-5-Expression cerebraler Kapillarendothelzellen beeinträchtigt wurde. Die Entzündungsaktivierung durch TNF- α vor der Applikation der Neutrophilen war dabei unerheblich.

Das *tight junction*-assoziierte ZO-1-Protein, ein Mitglied der MAGUK (*membrane-associated guanylate kinase homologue*)-Familie, wird durch einen externen Stimulus direkt in die Signaltransduktion miteinbezogen (Anderson, 1996). Staddon et al. (1995) und Stevenson et al. (1989) zeigten, dass das ZO-1-Protein cerebraler vaskulärer Endothelzellen und MDCKs (*mardin-darby canine kidney cells*) während einer erhöhten Endothelzell-Permeabilität phosphoryliert wird. Da durch die Phosphorylierung eines Proteins das Bindungsverhalten des jeweiligen Antikörpers erheblich beeinträchtigt werden kann, wäre die Phosphorylierung des ZO-1-Proteins der PBCEC durch die Neutrophilen-Adhäsion und die damit verbundene geringere Bindungsaffinität des Antikörpers eine mögliche Erklärung für den deutlich geschwächten immunzytologischen ZO-1-Nachweis.

Burns et al. (2000) zeigten ein nach ihren Befunden auf Fixierungsartefakten beruhendes Verschwinden der ZO-1-Expression der HUVECs schon bei einer E/L-Ratio von 1:2. Zur Fixierung für den Nachweis der ZO-1-Expression verwendeten die Autoren 1 %-ige Ameisensäure-Lösung. Die Expression von Occludin wurde dagegen nach Inkubation des Endothels mit Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:20 nicht re-

duziert, wenn der HUVEC-Monolayer vor der Fixierung intensiv gewaschen und somit der Grossteil der adhärenen Leukozyten entfernt wurde.

Da die PBCEC vor ihrer Fixierung sowohl gründlich gewaschen wurden, als auch mit einer Methanol-Eisessiglösung fixiert wurden, war sichergestellt, dass der immunzytologisch nachgewiesene Einfluss der Immunzellen auf die Expression der *tight junction*-assoziierten Proteine der PBCEC nicht auf der nachträglichen Aktivität freigesetzter Neutrophilen-Proteasen beruhte.

4.3.3 Transmigration oder Adhäsion ?

Im Zusammenhang mit der Endothelzell-Neutrophilen-Interaktion wird die Permeabilität der BHS und des Endothels peripherer Gefäße erhöht und führt zur Extravasation von Plasmaproteinen. Die Endothelzellen nehmen dabei aktiv an dem Prozess teil (Perry et al., 1997). Der molekulare Mechanismus, der durch die Bindung der Neutrophilen an die Endothelzell-Oberfläche die Permeabilität des Endothelzell-Verbands erhöht, ist allerdings noch nicht aufgeklärt. Bei der Analyse der durch die Neutrophilen-Adhäsion bedingten Permeabilitätserhöhung des Endothelzell-Monolayers, die mit der anschließenden Transmigration der Neutrophilen in Zusammenhang steht, ist es insbesondere bei der BHS notwendig, zwischen der Permeabilität für molekulare Bestandteile des Blutes (Plasma und Plasmaproteine) und derjenigen für Zellen zu unterscheiden (Perry et al., 1997). Die Erhöhung der Permeabilität der BHS *in vivo*, verbunden mit einem Einstrom von Plasmaproteinen ins ZNS-Parenchym während einer akuten Entzündungsreaktion, kann sowohl durch die Neutrophilen-Endothelzell-Interaktion verursacht, als auch unabhängig von der Immunzell-Transmigration ausgelöst werden (Wedmore & Williams, 1981).

In der vorliegenden Studie erfolgte vor der Applikation der Neutrophilen die Entzündungsstimulierung der PBCEC, deren Einfluss auf die Barrierefunktion mit Hilfe der ECIS-Analyse zeitaufgelöst kontrolliert wurde. Die Neutrophilen wurden dementsprechend zu einem Zeitpunkt zu den PBCEC appliziert, an dem die durch die Entzündungsstimulierung reduzierten ECIS-Werte α und R_b wieder ihr Ausgangsniveau erreicht hatten. Auch ohne die Entzündungsaktivierung der PBCEC wurden durch die Zugabe der Neutrophilen die Zell-Zell-Kontakte und der Zell-Substrat-Kontakt der Endothelzellen in Abhängigkeit von der E/L-Ratio teilweise stark beeinträchtigt. Die Permeabilitätserhöhung der PBCEC erfolgte somit ausschließlich durch die Interaktion mit den Neutrophilen und nicht durch die TNF- α -induzierte Entzündungsreaktion.

Die impedanzspektroskopischen und immunzytochemischen Analysen geben allerdings keinen Aufschluss darüber, ob der barriereschwächende Effekt der Neutrophilen auf die cerebralen Kapillarendothelzellen durch die Transmigration oder be-

reits durch die Adhäsion der Immunzellen auf der Endothelzell-Oberfläche verursacht wurde. Auch inwieweit die Neutrophilen die Permeabilität des PBCEC-Monolayers durch die Sekretion von Zytokinen erhöhten, konnte anhand der durchgeführten Studien nicht beantwortet werden. Die Ausschüttung der Zytokine IL-1 β , TNF- α und IL-8 durch aktivierte Neutrophile, durch die eine Permeabilitätserhöhung der Blut-Hirn-Schranke verursacht wurde (Duchini et al., 1996), wurde von Cassatella (1995) nachgewiesen. Der immunzytochemische Nachweis des E-Selektins der PBCEC in der vorliegenden Arbeit zeigte, dass eine Entzündungsstimulierung der PBCEC bereits durch deren Interaktion mit den Neutrophilen erfolgte, so dass eine Permeabilitätserhöhung des Monolayers durch die Neutrophilen-vermittelte Entzündungsstimulierung nahe liegt

Mit Hilfe der ECIS-Messungen wurden erste Anhaltspunkte ermittelt, wie und in welchem Maße die Morphologie der cerebralen Endothelzellen durch die Interaktion mit den Neutrophilen beeinflusst wurde. Dennoch war es nicht möglich, die Transmigration der Neutrophilen allein anhand der ECIS-Ergebnisse nachzuweisen. Aufschluss darüber sollten die REM-Analysen der PBCEC geben, die auf Transwell[®]-Filtersystemen kultiviert wurden. Dabei wurde die E/L-Ratio berücksichtigt. Da vor der REM-Analyse der TER bestimmt wurde, konnten beide Ergebnisse anschließend verglichen werden.

Die REM-Aufnahmen zeigten, dass die Senkung des TER nach Interaktion der PBCEC mit Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:20 nicht mit einer entsprechend hohen Transmigrationsrate der Neutrophilen einherging, sondern unabhängig von der Entzündungsstimulierung relativ wenig Transmigrations-Ereignisse auftraten. Der Großteil der applizierten Neutrophilen adhärierte lediglich auf dem PBCEC-Monolayer. Wie die ECIS-Analysen zeigten, führte erst die Zugabe von Neutrophilen in E/L-Ratios ab 1:30, die nach Huang et al. (1993) ohnehin unphysiologisch sind, zu einem völligen Zusammenbruch der Barrierefunktion des Monolayers. Das von der Neutrophilen-Zahl abhängige Ausmaß der Beeinträchtigung der Barrierefunktion bei hohen E/L-Ratios ist offensichtlich die Folge einer Signalverstärkung.

Die Neutrophilen-Adhäsion, die durch das Öffnen der interendothelialen *junctions* die Endothelzell-Permeabilität erhöht und somit die anschließende Transmigration vorbereitet, erleichtert *in vivo* die Ödem-Bildung, welche ein wichtiger Bestandteil der Immunabwehr ist (Larsen et al., 1980; Wedmore and Williams, 1981; Yi & Ulich, 1992; Del Maschio et al., 1996). Die Leukozyten-Transmigration dagegen könnte, auf unterschiedlichen molekularen Wirkmechanismen basierend, als davon unabhängiges Ereignis erfolgen. Die hier nachgewiesene, durch die Neutrophilen-Adhäsion verursachte Permeabilitätserhöhung der PBCEC, weicht somit nicht von der *in vivo*-Situation ab.

Zahlreiche Autoren machen die Neutrophilen-Adhäsion für die Permeabilitätserhöhung des Endothelzell-Monolayers verantwortlich. So konnten Huang et al. (1993) nachweisen, dass durch die alleinige Adhäsion Chemokin-stimulierter Neutrophiler die Permeabilität des HUVEC-Monolayers erheblich gesteigert wurde. Del Maschio et al. (1996) zeigten ebenfalls, dass schon die Adhäsion neutrophiler Granulozyten auf der Zelloberfläche TNF- α -stimulierter HUVECs eine Permeabilitätserhöhung verursachte. Diese Permeabilitätserhöhung wurde nicht durch Proteasen oder Sauerstoff-reaktive Metabolite vermittelt, sondern unabhängig davon durch die Neutrophilen-Adhäsion. Eine Permeabilitätserhöhung durch Neutrophilen-Adhäsion auf den Endothelzellen wurde auch von Bolton et al. (1998) *in vivo* an der Blut-Hirn-Schranke nach Induktion einer akuten Entzündungsreaktion nachgewiesen. Die Autoren injizierten das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 β ins ZNS-Parenchym von Ratten, was zur Adhäsion von Neutrophilen auf der cerebralen Endothelzell-Oberfläche und schließlich zum Zusammenbruch der Barrierefunktion der BHS führte. Ob die Permeabilitätserhöhung des Endothelzell-Monolayers eine unabdingbare Voraussetzung für eine anschließende Transmigration darstellt, ist allerdings noch nicht geklärt (Del Maschio et al., 1996; Allport et al., 1997a; Perry et al., 1997).

Simultane Neutrophilen-Transmigration ?

Eine simultane Neutrophilen-Diapedese durch den entzündungsaktivierten PBCEC-Monolayer ließ sich anhand der REM-Untersuchungen nicht belegen. Um den Kurvenverlauf der ECIS-Werte α und R_b mit dem Stadium der PBCEC-Neutrophilen-Interaktion morphologisch korrelieren zu können, wurde während markanter ECIS-Verlaufspunkte zeitgleich eine sequentielle elektronenmikroskopische Analyse der PBCEC durchgeführt. So wäre zu vermuten gewesen, dass die erste Phase des Widerstandsabfalls von R_b nach Applikation der Neutrophilen mit deren Selektin-vermittelten Adhäsion (‘Rollen’) auf der Endothelzell-Oberfläche korrelierte. Die weitere Senkung der Parameter α und R_b wäre dann mit der festen LFA-1/ICAM-1-vermittelten Adhäsion der Neutrophilen auf der Endothelzell-Oberfläche zu erklären. Die Neutrophilen-Transmigration entspräche der Modellvorstellung zufolge dem Minimum der Werte α und R_b . Die Beendigung der transendothelialen Migration entspräche der Regeneration der Barrierefunktion der PBCEC mit der Folge eines Wiederanstiegs von α und R_b . Die REM-Untersuchungen zeigten allerdings deutlich, dass der Verlauf der ECIS-Parameter nicht mit den oben beschriebenen PBCEC-Neutrophilen-Interaktionsstadien übereinstimmte.

Generell verdeutlichte der Vergleich der ECIS-Ergebnisse mit den REM-Untersuchungen, dass die Permeabilitätserhöhung der interendothelialen Kontakte und des Zell-Substrat-Kontakts der PBCEC zum Großteil durch die Selektin-vermittelte bzw.

festen LFA-1/ICAM-1-Adhäsion der Neutrophilen verursacht wurde. Eine simultane Neutrophilen-Diapedese durch den entzündungsaktivierten PBCEC-Monolayer ließ sich anhand der REM-Untersuchungen nicht belegen. Diese Beobachtung erlaubt folgende Schlussfolgerung: entweder reichte die induzierte Entzündungsstimulierung der PBCEC nicht aus, um eine simultane Transmigration der Immunzellen auszulösen oder es fehlte der für die Neutrophilen-Transmigration notwendige Chemokin-Stimulus, der im ECIS-Experiment methodisch bedingt nicht von der basolateralen Zellseite (Gehirnseite) induziert werden konnte. So zeigten auch Bolton et al. (1998), dass nach Injektion von IL-1 β in das ZNS adulter Ratten keine Neutrophilen ins Gehirn transmigrierten. Dagegen zeigten Experimente, in denen Bell et al. (1996) MIP-2 (*macrophage inflammatory protein-2*) ins Mäusegehirn-Parenchym injizierten, dass das Chemokin einen drastischen Einstrom von Neutrophilen ins ZNS verursachte. Generell üben Chemokine der C-X-C-Familie eine hohe chemotaktische Wirkung auf Neutrophile aus (Miller et al., 1992). Dieser chemotaktische Stimulus wurde den Neutrophilen in den Experimenten der vorliegenden Arbeit nicht angeboten.

Die Diapedese von Neutrophilen durch das cerebrale Endothel ins ZNS-Parenchym schädigt die Blut-Hirn-Schranke (Perry et al., 1997). Eine gleichzeitige Transmigration der Neutrophilen würde bei einer akuten Entzündungsreaktion der BHS zu ihrem völligen Zusammenbruch führen, was innerhalb von Minuten zu starken Blutungen ins Gehirnparenchym und schließlich zum Tod des Organismus führen würde. Da *in vivo* der Blutstrom dafür sorgt, dass permanent Leukozyten zum Ort der Entzündung des Endothels hingeleitet und nicht-adhärenente Neutrophile wieder abtransportiert werden, findet sich zu keinem Zeitpunkt ein solches Übermaß an Neutrophilen auf der Endothelzell-Oberfläche, wie dies *in vitro* im abgeschlossenen Kulturgefäß nach Zugabe einer hohen Neutrophilen-Anzahl (E/L-Ratio ab 1:20) der Fall ist. Eine simultane Transmigration in einem Ausmaß, wie sie *in vitro* induziert wird (E/L-Ratio ab 1:20) wäre also unphysiologisch, so dass *in vivo* eine 'bedarfsabhängige' Transmigration der Neutrophilen wahrscheinlich ist, wie es die REM-Analysen der PBCEC-Neutrophilen-Interaktion auch vermuten lassen.

Mechanismen der Permeabilitätserhöhung durch die Neutrophilen-Adhäsion

Im Zusammenhang mit der durch die Neutrophilen-Adhäsion verursachten Erhöhung der Endothelzell-Permeabilität, die auch in der vorliegenden Studie der Endothelzell-Neutrophilen-Interaktion beobachtet werden konnte, werden verschiedenen Regulationsmechanismen diskutiert. So werden nach Del Maschio et al. (1996) durch die Adhäsion der Neutrophilen intrazelluläre Signale in der Endothelzelle ausgelöst, die zu einer Umstrukturierung des VE-Cadherin/Catenin-Komplexes führen, was wiederum die Permeabilität des von ihnen untersuchten HUVEC-Monolayers erhöht. Die

Beeinträchtigung des VE-Cadherin-Komplexes der *adherens junctions* von HUVECs durch adhätierende Neutrophile wurde ebenso von Allport et al. (1997a) beobachtet. Der Effekt des VE-Cadherin/Catenin-Abbaus, der 5 Minuten nach dem Neutrophilen-Kontakt sein Maximum erreichte, wurde von Del Maschio und Mitarbeitern allerdings ausschließlich in HUVECs beobachtet, die zuvor mit TNF- α aktiviert worden waren. Tinsley et al. (1999) postulierten, dass durch die adhätierenden Neutrophilen die Barrierefunktion regelrecht gesteuert wird, indem die Immunzellen das β -Catenin und das VE-Cadherin der *adherens junctions* durch die Änderung der Konformation beeinflussen und somit die Permeabilität des untersuchten Rinder-Koronar-Endothelzell-Monolayers hochregulieren. Die von Del Maschio et al. (1996) und Allport et al. (1997a) nachgewiesene Störung der *adherens junction*-Integrität entzündungsstimulierter HUVECs durch die Neutrophilen-Interaktion wurde auch von Bolton et al. (1998) an der BHS *in vivo* gezeigt.

Calcium als Regulator

Lorenzon et al. (1998) zeigten, dass *cross-linking* von E- oder P-Selektin oder VCAM-1 bei aktivierten Endothelzellen einen intrazellulären Calcium-Anstieg verursacht, was wiederum die Befunde von Su et al. (2000) bestätigte, die einen Calcium-Anstieg in unmittelbarer Nähe des transmigrierenden Leukozyten ermittelten. Dieser Calcium-Anstieg korreliert unmittelbar mit einer Permeabilitätserhöhung des Endothelzell-Monolayers. Huang et al. (1993) und Pfau et al. (1995) konnten nachweisen, dass die Adhäsion von Neutrophilen die Konzentration des zytosolischen Calciums in den Endothelzellen erhöhte, was wiederum zu einer Permeabilitätssteigerung des Endothelzell-Monolayers führte. Die gesteigerte Ausschüttung des zytosolischen Calciums könnte für eine Aktivierung des Calpains verantwortlich sein, welches wiederum die Lyse des VE-Cadherin/Catenin-Komplexes verursacht und dadurch die Permeabilität des Endothelzell-Monolayers steigert Del Maschio et al. (1996). Der transiente Anstieg des intrazellulären Calciums in Endothelzellen, der durch adhätierende Neutrophile ausgelöst wird und eine Permeabilitätserhöhung des Endothelzell-Monolayers verursacht, ist für die anschließende Transmigration offensichtlich essentiell (Huang et al., 1993).

Gautam et al. (2001) zeigten, dass Neutrophile das Heparin-bindende Protein Azurocidin sezernieren, welches einen intrazellulären Calcium-Anstieg in den Endothelzellen bewirkt. Das durch die Neutrophilen-Adhäsion ausgeschüttete intrazelluläre Calcium fungiert den Untersuchungen von Hixenbaugh et al. (1997) zufolge als *second messenger*, der durch Ca^{2+} -Calmodulin die MLCK (*myosin light chain kinase*) aktiviert, die eine Phosphorylierung von Serin19 und Threonin18 der MLC (*myosin light chain*) verursacht. Diese Phosphorylierung führt zur isometrischen Retraktion der En-

dothelzellen, was wiederum die interzellulären *junctions* reversibel öffnet und zur Permeabilitätserhöhung der Endothelzellen führt (Huang et al., 1993; Hixenbaugh et al., 1997; Gautam et al., 2001).

Das Aktin-Zytoskelett

Da die Proteinkomplexe der *tight junctions* und der *adherens junctions* der interendothelialen Kontaktzone und die am Zell-Matrix-Kontakt beteiligten Moleküle mechanisch über das filamentöse Zytoskelett in Verbindung stehen, können lokale Spannungsveränderungen via Signaltransduktion in der Zelle in die distalen Endothelzellbereiche übertragen werden (Wang et al., 1993a; Maniotis et al., 1997). So zeigten (Yoshida et al., 1996), dass E-Selektin mit dem Aktin-Zytoskelett in Verbindung steht. Das bedeutet, dass nicht nur die feste LFA-1/ICAM-1-vermittelte Adhäsion der Neutrophilen via Signal-Transduktion eine Permeabilitätserhöhung des Endothelzell-Monolayers verursacht, sondern dass dies schon die ESL-1/E-Selektin-Bindung bei der Neutrophilen-Endothel-Interaktion auslösen kann. Dieser von Yoshida et al. (1996) nachgewiesene Befund stimmt unmittelbar mit den REM-Analysen der vorliegenden Arbeit überein, die zeigten, dass die applizierten Neutrophilen zum Großteil in noch kugelförmiger Form auf dem PBCEC-Monolayer lagen, sich also noch nicht in der festen ICAM-1/LFA-1-Adhäsionsphase befanden und somit eindeutig Selektin-vermittelt auf der Endothelzell-Oberfläche gebunden waren. Demzufolge ist die E-Selektin/ESL-1-vermittelte Signal-Transduktion, die über das Aktin-Zytoskelett die Permeabilität des Endothelzell-Monolayers erhöht, möglicherweise mitverantwortlich für die Neutrophilen-bedingte Reduzierung des TERs der PBCEC.

Ein zusätzlicher Einfluß der rasterelektronenmikroskopisch beobachteten ICAM-1/LFA-1-vermittelt fest adhärennten Neutrophilen, die vergleichsweise selten auf dem PBCEC-Monolayer zu beobachten waren, konnte bei der Neutrophilen-vermittelten Regulierung der Öffnung der interendothelialen Zell-Kontakte ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Aus *in vitro*-Studien an cerebralen vaskulären Endothelzellen sowie an HUVECs ist bekannt, dass ICAM-1 durch das *cross-linking*-Protein α -Aktinin mit dem Zytoskelett interagiert und via Signal-Transduktion die Umstrukturierung der junctionalen Zell-Kontakte verursacht (Carpen et al., 1992). Durieu-Trautmann et al. (1994) konnten zudem in *cross-linking*-Experimenten nachweisen, dass das auf der Oberfläche von immortalisierten cerebralen Endothelzellen exprimierte ICAM-1 zu einer Erhöhung der Tyrosin-Phosphorylierung des Aktin-bindenden Cortactins führte. Der Neutrophilen-Adhäsions-bedingte Anstieg der Tyrosin-Phosphorylierung und die damit verbundene Permeabilitätserhöhung wurden mit einem klassischen *outside-in* Signal-Transduktionsmechanismus in Verbindung gebracht. Bolton et al. (1998) belegten einen unmittelbaren Zusammenhang der LFA-1/ICAM-

1-vermittelten Neutrophilen-Adhäsion (Marlin & Springer, 1987) mit einem Anstieg von Tyrosin-Phosphorylierungen in den Endothelzellen. Die durch die Adhäsion der Neutrophilen verursachte Tyrosin-Phosphorylierung korrelierte direkt mit der Beeinträchtigung der BHS. In Parenchym-Bereichen, in denen zwar eine erhöhte ICAM-1-Expression, aber keine Neutrophilen-Adhäsion erfolgte, konnten weder eine Beeinträchtigung der BHS noch Tyrosin-Phosphorylierungen nachgewiesen werden. Eine erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung wurde ausschließlich in unmittelbarer Nähe der β 2-Integrin-vermittelten Adhäsion der Neutrophilen, nicht aber in Bereichen schon transmigrierter Neutrophiler beobachtet (Bolton et al., 1998).

4.3.4 Neutrophilen-Proteasen und Cytokine

Die Rolle der Neutrophilen-Proteasen bei der Transmigration durch Endothelzell-Monolayer ist bis heute noch nicht geklärt und wird nach wie vor kontrovers diskutiert (Allport et al., 2002). Im Vordergrund stehen dabei die zu der Klasse der Serin-Proteasen gehörige Elastase und die zu den Matrixmetalloproteasen (MMPs) gehörige Gelatinase B (MMP-9). Die MMPs spielen bei entzündlichen Prozessen eine wichtige Rolle (Krane, 1994; Goetzl et al., 1996). Insbesondere die MMP-9 übt eine wichtige Funktion bei der Transmigration Neutrophiler durch die extrazelluläre Matrix aus (Delclaux et al., 1996).

Cepinskas et al. (1999), die die Funktion der Elastase während der Neutrophilen-Transmigration untersuchten, zeigten, dass PAF (*platelet activating factor*)-aktivierte Neutrophile ihre endogene Elastase an die Zelloberfläche befördern, wo sie Membran-gebunden bleibt. Die Autoren konnten weiterhin nachweisen, dass die Neutrophilen die Elastase an ihren Pseudopodien lokalisieren, die den Endothelzell-Monolayer penetrieren und somit die Transmigration einleiten. In der Literatur wird als Neutrophilen-Transmigrationsroute die parazelluläre Diapedese favorisiert (Kishimoto & Anderson, 1992; Granger et al., 1995; Burns et al., 1997; Panes & Granger, 1998), bei der die Neutrophilen mittels endogener Proteasen den endothelialen *junction*-Komplex schwächen, um mit ihren Lamellipodien in die interendotheliale Zone vorzudringen. Demgegenüber zeigten Furie et al., (1987), Huber & Weiss (1989) und Allport et al. (2002), dass an der Neutrophilen-Transmigration keine Proteasen beteiligt sind. Die Autoren konnten nachweisen, dass weder MMP-9 noch Elastase zur Neutrophilen-Transmigration im Mäuse-Endothelzell-Modell notwendig waren.

Zahlreiche Studien belegen, dass die Funktionen der MMPs und der Cytokine bei der Neutrophilen-Transmigration durch deren teilweise wechselseitigen Regulationsmechanismen extrem komplex sind, so dass die Funktionen einzelner MMPs oder Cytokine bei der Leukozyten-Diapedese schwer zu bestimmen sind. So zeigten Pugin et al. (1999), dass die Proteasen einerseits durch die Wechselwirkung mit anderen Pro-

teasen aktiviert werden können und andererseits durch spezifische Inhibitoren, die TIMPs (*tissue inhibiting of matrix metalloproteases*) wiederum deaktiviert werden (Overall, 1994). Zudem werden die Proteasen durch die Interaktion mit verschiedenen Cytokinen aktiviert bzw. inaktiviert. So aktiviert TGF- β (*transforming growth factor*) zwar zahlreiche Serin-Proteasen, inhibiert jedoch wiederum die MMPs. TNF- α dagegen aktiviert die meisten MMPs (Borden & Heller, 1997). Diese Befunde verdeutlichen, dass die Wahl des Entzündungsmediators zur Untersuchung der Proteasen-Beteiligung bei der Neutrophilen-Transmigration von ausschlaggebender Bedeutung ist.

Die Untersuchungen der vorliegenden Studie sollten Aufschluss darüber geben, inwieweit die von den Neutrophilen sezernierten Proteasen (u. a. MMP-9) die Morphologie des PBCEC-Monolayers und insbesondere dessen interendotheliale *tight junctions* während der Endothelzell-Neutrophilen-Interaktion beeinträchtigen. Zu diesem Zweck wurde die MMP-Zusammensetzung des von den Neutrophilen konditionierten Mediums bestimmt und dessen Einfluss auf die PBCEC untersucht.

Der Einfluss des Neutrophilen-konditionierten Mediums auf die PBCEC–Barrierefunktion

Zur Untersuchung des Effekts des Neutrophilen-konditioniertes CDMs (NkCDMs) auf die PBCEC während der Neutrophilen-Interaktion wurde zunächst die MMP-Zusammensetzung des NkCDMs von unterschiedlicher Konditionierungsdauer (4 Minuten bis 16 Stunden) zymographisch untersucht. Die MMP-Analyse des NkCDMs zeigte, dass die Neutrophilen unabhängig von der Konditionierungsdauer in großem Umfang MMP-9 und geringfügig MMP-2 ins Kulturmedium sezernierten. Die zymographische Untersuchung des nur wenige Minuten Neutrophilen-konditionierten NkCDMs zeigte allerdings, dass die MMP-9-Ausschüttung geringer war als die des mehrstündigen NkCDMs, welches zudem noch eine geringe Menge an MMP-2 aufwies. Pugin et al. (1999) zeigten, dass durch die Stimulation der Neutrophilen mit LPS, TNF- α oder IL-8 die Sekretion von proMMP-9 induziert wird. In der vorliegenden Studie kam es dagegen auch ohne Zugabe von Stimulantien in das CDM der Neutrophilen zu einer enormen Ausschüttung der (pro)MMP-9. Die Vitalitätsuntersuchung der Neutrophilen zeigte allerdings, dass die Immunzellen präparationsbedingt geringfügig vorstimuliert waren. Das könnte der Grund für die hohe MMP-9-Sekretion bei fehlender chemischer Stimulation der Neutrophilen gewesen sein.

Zwar sezernieren verschiedenste Immunzell-Typen wie Neutrophile, Monozyten und Macrophagen MMP-9 (Murphy et al., 1982; Nielsen et al., 1996), allerdings stammt der Hauptanteil der schnell sezernierten proMMP-9 im Blut von Neutrophilen (Pugin

et al., 1999). Die Autoren fanden schon 10 bis 20 Minuten nach Aktivierung von Neutrophilen die proMMP-9 im umgebenden Medium. Die Monozyten benötigten dagegen 7 Stunden nach Induktion mit einem aktivierenden Stimulus, bis geringe Mengen von proMMP-9 im Kulturmedium nachgewiesen werden konnten. Pugin et al. (1999) zeigten, dass die von degranulierten Neutrophilen sezernierte proMMP-9 nicht durch *de novo*-Synthese gebildet wurde. Die Speicherung von Gelatinase B in Neutrophilen-Granula, auch in spezifischen Gelatinase-Granula (Hibbs et al., 1985; Borregaard et al., 1995), ermöglicht eine schnelle Ausschüttung der proMMP-9 am Entzündungsherd (Sengelov et al., 1995).

Die vorliegende zymographische Analyse des NkCDMs zeigte, dass die Neutrophilen bereits nach einer kurzen CDM-Konditionierung von 4 Minuten große Mengen MMP-9 ins CDM sezernierten. Eine Neutrophilen-bedingte Konditionierung des CDMs war somit unvermeidbar, da vom Waschen der Neutrophilen und deren Resuspension in frischem CDM bis zu deren Applikation zu den PBCEC grundsätzlich einige Minuten verstrichen. In jedem Fall wurde also Neutrophilen-konditioniertes CDM zusammen mit den Immunzellen zu den PBCEC appliziert, unabhängig davon, ob die Neutrophilen vor ihrer Zugabe gewaschen wurden. Die Analyse der Auswirkungen des NkCDMs war folglich essentiell, um den reinen Neutrophilen-Effekt von dem ihres NkCDMs auf die PBCEC abgrenzen zu können. Zur Untersuchung des Einflusses der Neutrophilen-Proteasen auf die PBCEC wurde deshalb zunächst der Effekt des NkCDMs in Abwesenheit der Neutrophilen untersucht. In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Neutrophilen nach Resuspension in frischem CDM (NfCDM) und vergleichsweise in ihrem NkCDM zu den PBCEC gegeben. Neutrophile sezernieren neben MMPs auch verschiedene andere Proteasen und Cytokine in ihr umgebendes Medium (Edens & Parkos, 2000), die bei der Analyse des Einflusses des NkCDMs auf die PBCEC berücksichtigt werden müssen. Deshalb war es nicht möglich, die alleinige Bedeutung der MMP-9 während der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion zu definieren.

Die TER-Filtermessungen zeigten, dass die Inkubation der PBCEC mit dem NkCDM den TER nicht beeinträchtigte, was auf eine intakte *tight junction*-Region schließen lässt. Die ECIS-Messungen zeigten dagegen, dass der Zell-Zell-Kontakt der PBCEC durch die Zugabe des NkCDMs geringfügig und reversibel gesenkt wurde. Das zu den PBCEC gegebene NkCDM entsprach dabei einer Menge, die einer E/L-Ratio von 1:30 entsprechen hätte d. h., dass es durch ca. 21 Millionen Neutrophile konditioniert worden war. Durch die Inkubation der PBCEC mit dem mehrstündig konditionierten NkCDM kam es zu einer gleichzeitigen und reversiblen geringfügigen Senkung der ECIS-Werte R_b und α . Allerdings war das Maß der Reduzierung beider Parameter bei Zugabe des NkCDMs verschiedener Neutrophilen-Präparationen sehr unterschiedlich. So übte das NkCDM einiger Präparationen keine Wirkung auf den

Zell-Zell- und den Zell-Substrat-Kontakt aus, in anderen Fällen dagegen führte es sogar zu einer irreversiblen Senkung von R_b . Der Wert von α , der nur sehr geringfügig gesenkt wurde, regenerierte dagegen stets. Da das Ausmaß der präparationsbedingten Voraktivierung der Neutrophilen unterschiedlich war, differierte entsprechend auch deren Proteasen-Sekretion ins umgebendes Medium. Deshalb war die standardisierte Untersuchung zum Einfluss des NkCDMs auf die Endothelzell-Neutrophilen-Interaktion von grundsätzlicher Bedeutung.

Weitere ECIS-Studien zeigten, dass es unerheblich war, ob die Neutrophilen in ihrem mehrstündig konditioniertem oder resuspendiert in frischem CDM zu den PBCEC gegeben wurden. In beiden Fällen wurden die Parameter R_b und α in Abhängigkeit von ihrer E/L-Ratio gesenkt, ohne dass die NkCDM-Neutrophilen-Suspension einen besonderen Effekt ausübte. Eine parallel durchgeführte ECIS-Messung, in der Neutrophilen in frischem CDM (E/L-Ratio 1:20) und das NkCDM ohne Neutropile zu den PBCEC appliziert wurde zeigte, dass ausschließlich in Anwesenheit der Neutrophilen R_b signifikant gesenkt wurde. Dieser Befund demonstriert, dass das NkCDM in Abwesenheit der Neutrophilen nicht für deren beobachtete Auswirkung auf die interendothelialen Zell-Kontakte der PBCEC verantwortlich war. Dennoch zeigen die Untersuchungen zum Einfluss des NkCDMs auf die PBCEC, dass dieses, wenn auch nur in geringem Maße und nur bei Einsatz in sehr hoher Konzentration, einen Effekt auf die ECIS-Parameter R_b und α ausübte.

Bei der Beurteilung dieses Effekts ist allerdings zu bedenken, dass Neutrophile nicht nur MMP-9 und MMP-2, sondern auch pro-inflammatorische Cytokine sezernieren. Die Auswirkung der von transmigrierenden Leukozyten sezernierten Cytokine auf die parazelluläre Permeabilität des Endothelzell-Monolayers im Rahmen eines entzündlichen Prozesses ist nicht zu unterschätzen (Edens & Parkos, 2000). So verursachen beispielsweise IL-1 β und TNF- α einen Anstieg der Permeabilität des peripheren wie des cerebralen Endothels (Duchini et al., 1996). Cassatella (1995) zeigte, dass aktivierte Neutrophile pro-inflammatorische Cytokine wie IL-1 β , TNF- α und IL-8 ausschütten, die die parazelluläre Permeabilität der untersuchten Kapillarendothelzellen erhöhen (Yi & Ulich, 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde durch die immunzytochemischen Befunde gezeigt, dass allein durch die Zugabe der Neutrophilen eine entzündliche Reaktion der PBCEC mit der Folge der Expression des Entzündungsmarkers E-Selektin ausgelöst wurde. Dieser immunzytochemische Nachweis zeigt deutlich, dass Neutrophile nicht nur Proteasen, sondern auch entzündungsaktivierende Mediatoren sezernieren. Der hier durchgeführte Superoxid-Assay gab Aufschluss über die Aktivität der frisch präparierten Neutrophilen. Er zeigte, dass sich die Neutrophilen auch ohne chemisch induzierte Aktivierung in einem aktivierten Zustand befanden. Aufgrund der Primärkultur-bedingten Schwankungen der Aktivität der Neutrophilen traten erhebliche Unterschiede in der Zusammensetzung des NkCDMs auf,

so z. B. in der Menge der sezernierten Cytokine, was sich wiederum auf das Maß der Senkung von R_b und α auswirkte. Wie schon die impedanzspektroskopischen Untersuchungen des TNF- α -Effekts auf die PBCEC demonstrierten, war die Auswirkung des Cytokins auf den TER stark konzentrationsabhängig. Interessanterweise zeigte der Vergleich von R_b und α nach Applikation von 2 ng/ml TNF- α zu den PBCEC annähernd identische Kurvenverläufe wie nach Zugabe des NkCDMs. Diese Beobachtung erlaubt die Annahme, dass der Effekt des NkCDMs auf die interendotheliale Zell-Kontaktzone von den sezernierten Cytokinen der Neutrophilen stammte. Die konditionierten Medien der Transwell®-Filtersysteme, die während der PBCEC-Neutrophilen-Interaktion entnommen und zymographisch untersucht wurden, zeigten prinzipiell das gleiche MMP-Bandenmuster wie das NkCDM in Abwesenheit von Neutrophilen. Der direkte Einfluss der Endothelzell-Neutrophilen-Interaktion auf die MMP-Sekretion der Neutrophilen konnte somit nicht beurteilt werden. Die MMP-2, die im Medienüberstand der Endothelzell-Neutrophilen-Interaktion nachgewiesen wurde, stammte entweder von Serum-Rückständen der PBCEC oder wurde von den Neutrophilen bei der Interaktion verstärkt sezerniert. Das nur wenige Minuten konditionierte NkCDM zeigte allerdings den gleichen MMP-9-Gehalt wie das PBCEC-Neutrophilen-konditionierte Medium, nachdem dort Neutrophile in frischem CDM zu den Endothelzellen gegeben worden waren. Daraus ist zu folgern, dass die MMP-9 möglicherweise schon vor der Zugabe zu den PBCEC von den Neutrophilen sezerniert wurde. Ob die Neutrophilen die aktive oder die inaktive Form der MMP-9 sezernierten, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Allerdings ist wahrscheinlich, dass die Neutrophilen während der Interaktion zunächst die inaktive proMMP-9 sezernierten. Die Tätigkeit aktiver MMPs, die bei der Neutrophilen-Transmigration für die proteolytische Zersetzung der Endothelzell-Basalmembran sorgen, würde wahrscheinlich in einer Reduzierung des ECIS-Parameters α resultieren, die jedoch nicht beobachtet wurde. Auch *in vivo* wird nach einem Stimulus, wie durch LPS oder TNF- α , zunächst die inaktive proMMP-9 von den Neutrophilen ins Blut sezerniert (Pugin et al., 1999). Die Neutrophilen-Adhäsion auf der Endothelzell-Oberfläche verursacht eine gemeinsame Ausschüttung von proMMP-9 und Elastase, die nach Meinung von Delclaux et al. (1996) zur Aktivierung von proMMP-9 führen könnte. Beide aktiven Enzyme stünden dann für die Transzytose der Neutrophilen durch die extrazelluläre Matrix zur Verfügung. Pugin et al. (1999) wiesen dagegen schon im Plasma von Patienten, die zuvor einen pro-inflammatorischen Stimulus erhielten, die aktivierte Form der MMP-9 nach.

Die zymographische Untersuchung des Mediums im basolateralen Filterkompartiment nach der PBCEC-Neutrophilen-Interaktion in der apikalen Filterkammer wies keine MMP-9 auf. Die MMP-9 durchdrang den PBCEC-Monolayer also nicht, sondern verblieb während der PBCEC-Neutrophilen-Interaktion im Medium des apikalen Filterkompartiments. Eine wesentliche Rolle könnte dabei die geringe Porengröße

der Filtermembran des Transwell®-Filters (0,4 µm) spielen, die verhinderte, dass die Neutrophilen nach ihrer Transmigration in die basolaterale Kammer gelangten. Dadurch, dass die Neutrophilen nach Durchquerung der Endothelzellschicht in der Basalmembran der Endothelzellen quasi 'stecken' blieben, kam es möglicherweise nicht zur Aktivierung der während der Transmigration sezernierten (pro)MMP-9, so dass die Neutrophilen die Basalmembran der PBCEC nicht proteolytisch zersetzen konnten. Damit korreliert der unveränderte Wert von α , welcher belegt, dass es durch die Inkubation der PBCEC mit den Neutrophilen in einer E/L-Ratio von bis zu 1:17 zu keiner Beeinträchtigung der extrazellulären Matrix kam. Ob die (pro)MMP-9 erst während der Neutrophilen-Transmigration oder bereits vorher, noch im Blutstrom, in ihre aktive Form überführt wird, ist noch unklar (Pugin et al., 1999).

Würden die auf den PBCEC adhärenen bzw. die in oder auf der Basalmembran befindlichen Neutrophilen die MMP-9 in aktiver Form sezernieren, so würde dies zu irreversiblen Schäden der extrazellulären Matrix führen. Wie allerdings die impedanzspektroskopischen, morphologischen und immunzytochemischen Analysen zeigten, wurde der PBCEC-Monolayer inklusive der extrazellulären Matrix nach Applikation von Neutrophilen bis zu einer E/L-Ratio von 1:17 nicht proteolytisch geschädigt. Selbst die Zugabe von Neutrophilen in ihrem NkCDM, das den zymographischen Analysen zufolge eine hohe Menge der MMP-9 aufwies, führte zu keiner Schädigung des Endothelzell-Matrix-Kontakts. Da die MMPs zum Schutz der Endothelzellen zunächst als inaktive Proenzyme ausgeschüttet werden und wahrscheinlich erst während der Endothelzell-Neutrophilen-Interaktion in ihre aktive Form überführt werden (Delclaux et al., 1996), wäre es denkbar, dass sie, wie auch die übrigen in den NkCDM vorhandenen Proteasen, in ihrer inaktiven Form vorlagen und somit die interendothelialen Zell-Kontakte der PBCEC nicht beeinträchtigten. Allport et al. (2002) postulierten, dass ausschließlich die extrazelluläre Matrix, nicht aber die Endothelzellen selbst von der MMP-9 und der Elastase abgebaut werden, so dass diese Proteasen keine Funktion bei der eigentlichen Transmigration durch den Endothelzell-Monolayer ausüben.

Der Einfluss des NkCDMs auf die *tight junctions*

Die vorliegenden immunzytochemischen Untersuchungen zeigten, dass die Inkubation der PBCEC mit Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:20 zu einer signifikanten Senkung der Expression der *tight junction*-assoziierten Proteine ZO-1, Occludin und Claudin-5 führte. Allport et al. (1997a), Del Maschio et al. (1996) und Moll et al. (1998), die einen Verlust des VE-Cadherin-Komplex der *adherens junctions* während der Neutrophilen-Endothelzell-Interaktion beobachteten, konnten nachweisen, dass dieser Abbau von den Neutrophilen-Proteasen verursacht wurde. Erstaunlicherweise

zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass im Gegensatz zur Neutrophilen-PBCEC-Interaktion bei einer E/L-Ratio von 1:20 die Applikation des NkCDMs in einer Menge, die der gleichen E/L-Ratio entsprach, zu keiner Beeinträchtigung der ZO-1, Occludin und Claudin-5 Expression führte.

Die Immunoblot-Analysen der PBCEC zeigten dagegen, dass die Inkubation der PBCEC mit NkCDM in einer Menge, die einer E/L-Ratio von 1:30 entsprach, die Occludin-Expression beeinträchtigte. So führte die Inkubation mit dem NkCDM zu einer vergleichsweise starken Dephosphorylierung des Occludins der PBCEC. Einer ebensolche Dephosphorylierung des Occludins zeigten auch die Western-Blot-Analysen der PBCEC die mit einer erhöhten Konzentration von TNF- α (20 ng/ml) behandelt wurden. Möglicherweise verursachte die erhöhte Konzentration der von den Neutrophilen in das CDM ausgeschütteten Cytokine diese Dephosphorylierung des Occludins. Die Expression des *tight junction*-assoziierten Claudin-5 wurde durch das NkCDM dagegen nicht beeinträchtigt.

Wachtel et al. (1999) zeigten, dass Occludin im HUVEC-Modell durch MMPs proteolytisch gespalten wurde, was sich im Auftreten einer Bande von 50 kDa widerspiegelte, wogegen die Occludin-charakteristische breite Bande von 61 kDa verschwand. Die vorliegenden Immunoblot-Analysen zeigten dieses 50 kDa-Spaltprodukt des Occludins nach Inkubation der PBCEC mit dem NkCDM dagegen nicht. Das Occludin der PBCEC wurde demnach durch die nachgewiesenen MMPs bzw. die übrigen Neutrophilen-Proteasen nicht angegriffen, was ein weiteres Indiz dafür ist, dass die nachgewiesenen, von den Neutrophilen sezernierten MMP-9 und -2 in inaktiver Form vorlagen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Effekt der Neutrophilen auf den PBCEC-Monolayer im Rahmen der Endothelzell-Neutrophilen-Interaktion Neutrophilen-spezifisch war und nicht durch NkCDM allein imitiert werden konnte.

4.4 Die Endothelzell-Lymphocyten-Interaktion

Die Fähigkeit von Lymphocyten die Endothelzell-Barriere zu passieren wurde in den vergangenen Jahren intensiv untersucht. Dabei zeigte sich, dass unterschiedliche Subpopulationen der Lymphocyten in verschiedene Gewebetypen eindringen (Pryce et al., 1997). So transmigrieren naive T-Zellen, die dem Thymus entstammen, selektiv in die peripheren Organe des Immunsystems (HEV (*high endothelial venules*)-Route). Im Gegensatz dazu patrouillieren Gedächtnis-T-Zellen, wie beispielsweise Lymphocyten, die ihr Antigen auf den APC (*antigen presenting cells*) erkennen, zwischen den peripheren Organen und den lymphatischen Organen (Mackay et al., 1990). Mackay et al. (1992) postulierten, dass durch die spezifischen Antigene der jeweiligen Gewebe entsprechende Oberflächen-Rezeptoren bzw. Rezeptor-Kombinationen exprimiert werden, die eine Migration in diejenigen Gewebe ermöglicht, in denen die Lymphocyten erstmals auf ihr Antigen gestoßen sind. Im ZNS wurden bisher keine speziellen *Homing*-Mechanismen für die Lymphocyten-Transmigration beobachtet und die Adhäsionsmoleküle, die zur transendothelialen Lymphocyten-Migration benötigt werden, unterscheiden sich nicht von denjenigen, die bei anderen Endothelzelltypen beschrieben wurden (Male et al., 1994; Greenwood et al., 1995). Im ZNS ist zudem die MHC (*major histocompatibility complex*)-Expression sehr gering und APCs fehlen völlig (Hart & Fabre, 1981), so dass dem Gehirn eine notwendige Voraussetzung zur T-Zell-Einwanderung und somit zur Immunüberwachung fehlt (Wekerle, 1993). Allerdings werden die MHCs, die normalerweise nicht im Gehirn auftreten, durch starke inflammatorische Stimuli induziert (Wekerle et al., 1986; Lampson, 1987).

Es ist bekannt, dass unter normalen, physiologischen Bedingungen der Eintritt von Lymphocyten in das ZNS im Vergleich zu anderen Organen sehr gering ist (Pryce et al., 1997). Die Fähigkeit der Lymphocyten *in vitro* an Endothelien cerebralen oder retinalen Ursprungs zu binden, ist wesentlich geringer als deren Bindungsvermögen an unspezialisierte Endothelzell-Monolayer (Wang et al., 1993b; Male et al., 1994). Das Endothel bildet für die Lymphocyten-Migration somit nicht nur eine strukturelle, sondern auch eine funktionelle Barriere, die durch eine reduzierte bzw. differenzierte Expression von Adhäsionsmolekülen den Lymphocyten die transendotheliale Migration ermöglicht (Pryce et al., 1997). Dennoch migrieren Lymphocyten in geringer Anzahl in das gesunde Gehirn (Hickey et al., 1991). Unter entzündlichen Bedingungen kommt es sogar zu einer drastischen Erhöhung von in das Gehirn eindringenden Lymphocyten (Fabry et al., 1994; Greenwood et al., 1995).

In zahlreichen Studien, in denen die Expression Cytokin-vermittelter Adhäsionsmoleküle im Zusammenhang mit der Lymphocyten-Transmigration untersucht wurde, wur-

den HUVEC-Modelle verwendet, die jedoch aus physiologischer Sicht für diese Analysen völlig ungeeignet sind (Male et al., 1990).

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde die Interaktion von CD4⁺-T-Helferzellen mit den cerebralen Kapillarendothelzellen im Vergleich zu jener neutrophiler Granulozyten *in vitro* untersucht. Wie die Ergebnisse der impedanzspektroskopischen, der immunzytochemischen und der elektronenmikroskopischen Analysen zusammenfassend zeigten, traten erhebliche Unterschiede zwischen beiden Immunzelltypen auf. Dies betraf sowohl den Einfluss auf die Barrierefunktion der PBCEC und auf deren *tight junction*-Region als auch deren morphologisch sichtbare Interaktion mit den Endothelzellen. So zeigten die TER-Filtermessungen, dass sich die Zugabe der T-Helferzellen zu den PBCEC nachweislich kaum auf die Barrierefunktion der PBCEC auswirkte. Auch die Erhöhung der E/L-Ratio der T-Helferzellen auf 1:20 übte sich im Gegensatz zu den Neutrophilen nur sehr geringfügig aus. Demgegenüber zeigten die ECIS-Messungen generell eine größere Beeinflussung der interendothelialen Zellkontaktzone (R_b), die sich durch die Erhöhung der E/L-Ratio auf 1:20 noch verstärkte. Allerdings kam es in Abhängigkeit der verschiedenen T-Zell-Präparationen diesbezüglich zu starken Schwankungen in der Auswirkung der T-Helferzellen auf die ECIS-Parameter R_b und α der PBCEC. Dargestellt wurde nur die maximale Beeinträchtigung der T-Helferzellen auf die Barrierefunktion der Endothelzellen. Die impedanzspektroskopische Analyse zum Einfluß des T-Helferzellen-konditionierten Mediums (ThkCDM) auf die PBCEC zeigte weder in den Befunden der TER-Filtermessungen noch in den ECIS-Studien einen Effekt auf die Barrierefunktion der cerebralen Endothelzellen. Die immunzytochemische Untersuchung demonstrierte zudem, dass die T-Helferzellen-PBCEC-Interaktion unabhängig von der E/L-Ratio die ZO-1-Expression nicht beeinflusste. Auch das ThkCDM veränderte die ZO-1-Expression nicht. Wie die Experimente demonstrierten, war es unerheblich, ob die PBCEC vor der Zugabe der T-Helferzellen mit 2 ng/ml TNF- α entzündungsstimuliert wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurden nicht-vor-aktivierte CD4⁺-T-Helferzellen zu den entzündungsaktivierten PBCEC appliziert. (Hughes et al., 1988) zeigten in ihren Studien, in denen cervikale Lymphozyten zu kultivierten cerebralen Kapillarendothelzellen appliziert wurden, dass die Adhäsionsrate der Lymphozyten von der zur Endothelzell-Aktivierung eingesetzten Konzentration von TNF- α abhing. TNF- α steigert unter anderem die MHC I-Klasse in HUVECs und induziert Oberflächen-Antigene, die eine wichtige Rolle in der Endothelzell-Lymphozyten-Interaktion spielen (Pober et al., 1986). Wong et al. (1999) zeigten, dass durch die Entzündungsstimulierung der humanen mikrovaskulären Endothelzellen mit TNF- α *in vitro* die Adhäsion peripherer T-Zellen aus dem Blut um das 5-fache gesteigert wurde. Die Autoren zeigten weiterhin, dass die transendotheliale Migration der Lymphozyten durch die TNF- α -Stimulierung der Endothelzellen um das 30-fache gesteigert wurde. Hughes et al. (1988), die

5 und 25 ng/ml TNF- α zur Endothelzell-Stimulation einsetzten, konnten nachweisen, dass die Lymphozyten deutlich effektiver und in höherer Anzahl beim Einsatz von 25 ng/ml TNF- α adhärirten. Möglicherweise war die verwendete TNF- α -Konzentration von 2 ng/ml in der vorliegenden Arbeit nicht ausreichend, um eine T-Zell-Adhäsion zu induzieren. Da Hughes et al. (1988) eine Mischung von Lymphozyten in ihren Experimenten einsetzten, blieb allerdings unklar, welcher T-Zelltyp vermehrt adhärirte, so dass eventuell die CD4⁺-Zellen, die in der vorliegenden Studie verwendet wurden, nicht zu den von Hughes et al. (1988) beobachteten Lymphozyten gehörten. Die impedanzspektroskopischen Studien der vorliegenden Arbeit zeigten zudem, dass die Zugabe von 20 ng/ml TNF- α zu den Endothelzellen den TER der PBCEC signifikant senkte. Eine Erhöhung der TNF- α -Konzentration in Hinsicht auf eine Analyse des Effekts der T-Zellen auf die Barrierefunktion der PBCEC war somit ohnehin ausgeschlossen.

Die CD4⁺-T-Zellen wurden in dieser Arbeit durch Antikörper-vermittelte Selektion aus dem Lymphozyten-Gemisch des cervikalen Lymphknotens selektiert. Zu diesem Zweck wurde ein CD4⁺-Antikörper eingesetzt, der wiederum mit einem magnetischem *bead* gekoppelt wurde. Mit Hilfe eines Magneten wurden schließlich die mit dem CD4⁺-Antikörper markierten Zellen aus dem Zell-Gemisch herausgezogen. Die Entfernung des Antikörpers vom CD4-Rezeptor war allerdings nicht möglich. Ausschließlich der *bead* konnte von den T-Zellen entkoppelt werden. Nach Masuyama et al. (1987) ist die MHC II und die CD4-Rezeptor-Klasse in den Adhäsionsprozess der Lymphozyten und der Endothelzellen involviert. Es ist nicht auszuschließen, dass durch den Antikörper-besetzten CD4-Rezeptor der T-Zellen die Adhäsion bzw. Transmigration an die PBCEC beeinträchtigt wurde.

Pryce et al. (1997) zeigten, dass B-Zellen wesentlich effizienter auf dem cerebralen Endothel adhärirten als T-Zellen und dass CD8⁺-T-Zellen wiederum effektiver als die auch hier eingesetzten CD4⁺-T-Zellen auf dem mit TNF- α entzündungsaktiviertem Endothelzell-Monolayer adhärirten.

Wekerle (1993) postulierte, dass die T-Helferzellen, unabhängig von ihrer Antigen-Spezifität, ausschließlich im aktivierten Zustand die BHS passieren können (Antigen-unabhängige Transmigration). Im Gegensatz dazu sind nicht aktivierte T-Helferzellen dazu nicht befähigt. Dennoch konnte in der vorliegenden Studie mit Hilfe der ECIS-Messungen erstmals gezeigt werden, dass die Interaktion der nicht vor-aktivierten CD4⁺-T-Helferzellen mit den PBCEC die Zell-Zell- und die Zell-Substrat-Kontakte der Endothelzellen beeinträchtigte. Die parallel durchgeführten REM-Analysen belegten zudem eindeutig, dass es nach Zugabe der T-Zellen zu den PBCEC zu einer Adhäsion und teilweise zur Transmigration der nicht vor-aktivierten T-Helferzellen kam.

In Studien, in denen Hickey et al. (1991) MBP-spezifische, enzephalithogene T-Zellen *in vitro* mit polyklonalen, mitogenem ConcanavalinA (ConA) voraktivierten und

anschließend in gesunde Ratten injiziert, zeigte sich ein biphasischer Einstrom der T-Helferzellen in das ZNS. Der primäre T-Zell-Einstrom ereignete sich innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Immunzell-Injektion. Die sekundäre T-Zell-Invasion folgte nach ca. 96 Stunden, was typisch für den klinischen Verlauf der EAE (*experimental autoimmune encephalitis*) und dem Zusammenbruch der BHS-Barrierenfunktion ist. Nicht aktivierte T-Zellen wurden dagegen bisher noch nicht beim Eindringen in das ZNS beobachtet (Wekerle, 1993).

Auch Pryce et al. (1997), die in Kultur die Migration von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen durch cerebrale Endothelzellen der Ratte untersuchten, konnten nachweisen, dass der Aktivitätsstatus der T-Helferzellen der ausschlaggebende Faktor für deren transendotheliale Migration ist. Die Autoren konnten zudem zeigen, dass die aktivierten CD4⁺-Zellen den cerebralen Endothelzell-Monolayer im Vergleich zu CD8⁺- und B-Zellen vermehrt passierten. Allerdings unterliegt die Transmigrationsbereitschaft der T-Helferzellen komplexen Stimulationsmechanismen. So zeigten Greenwood & Calder (1993) und Devine et al. (1996), dass eine vermehrte T-Zell-Adhäsion nicht zwangsläufig zu einer vermehrten Transmigration durch den Endothelzell-Monolayer führt. Vielmehr ist die T-Zell-Transmigration abhängig von einem migratorischen Phänotyp, der durch verschiedene spezifische Signale induziert wird (Pryce et al., 1997). Die Autoren zeigten, dass eine einfache Mitogen-vermittelte Aktivierung der T-Helferzellen nicht ausreicht, um den migratorischen T-Zell-Phänotyp zu induzieren. Vielmehr ist der Zeitpunkt des Proliferationszyklus der aktivierten T-Zellen ausschlaggebend. Pryce et al. (1997) konnten nachweisen, dass die Transmigration der Lymphozyten 3 Tage nach der Antigen-Stimulierung, der eine 4-tägige IL-2-Stimulierung folgte, maximal war. Diese maximale Transmigration fand zum Zeitpunkt der höchsten Proliferationsrate der Zellen statt. Zur vollständigen Aktivierung der Lymphozyten müssen diese sowohl Signale via des T-Zell-, als auch des IL-2-Rezeptors erhalten. Somit ist eine Mitogen-Stimulierung (ConA) der CD4⁺-Zellen in Abwesenheit von IL-2 nicht effektiv. Ein weiteres entscheidendes Signal zur Transmigration der T-Zellen stammt von den ebenfalls voraktivierten Endothelzellen (Pryce et al., 1997).

Wie aus den Studien der genannten Autoren hervorgeht, ist die Induktion eines migratorischen Phänotyps der Lymphozyten nicht trivial. Zur Aufklärung der hier gewählten Aufgabenstellung, der Charakterisierung des Leukozyten-Transmigrations-Mechanismus, wurden neutrophile Granulozyten gewählt, da diese hierfür besonders geeignet sind. Zur Charakterisierung der Leukozyten-Interaktion vor dem Hintergrund eines speziellen Krankheitsbildes, wie beispielsweise der T-Zell-induzierten EAE, würde sich die Wahl des Immunzell-Typs nach dem für diese Krankheit typischen Leukozyten-Typ richten. So wird zur Analyse der Transmigration von T-Zellen üblicherweise das EAE-Modell verwendet (Wekerle, 1993). Die Untersuchung der CD4⁺-Transmigration durch das vorliegende BHS-Modell war dagegen sowohl aufgrund

der fehlenden Antigen-Spezifität der PBCEC als auch aufgrund der Notwendigkeit eines komplizierten Aktivierungsprozederes der T-Zellen problematisch. Um allerdings die unterschiedlichen Auswirkungen verschiedener Immunzelltypen auf die Barrierefunktion der PBCEC zu unterscheiden, war der zusätzliche Einsatz der CD4⁺-T-Zellen als Vergleich zu den Neutrophilen im vorliegenden Endothelzell-Modell sinnvoll. Zudem dienten die T-Zellen als Kontroll-Immunzell-Typ der Neutrophilen-PBCEC-Interaktions-Experimente, da diese im nicht aktivierten Zustand die cerebrale Endothelzell-Barriere normalerweise nicht passieren (Male et al., 1994; Greenwood et al., 1995). So konnte mit Hilfe der nicht stimulierten CD4⁺-Zellen geprüft werden, inwiefern es durch die Zugabe einer hohen Anzahl nicht transmigrierender Immunzellen zu einer Beeinträchtigung der interendothelialen *tight junction*-Region bzw. der Barrierefunktion der PBCEC kam.

4.5 Die Transmigration

Unter physiologischen wie unter pathologischen Bedingungen sind es die interendothelialen *junctions*, die bei der Transmigration moduliert werden (Rubin & Staddon, 1999), so dass sich die Permeabilitätseigenschaften der BHS hauptsächlich in den *tight junctions* widerspiegeln. Dementsprechend standen zur Charakterisierung der Immunzell-Diapedese die interendothelialen Zell-Kontakte im Fokus der Untersuchungen.

4.5.1 Die Neutrophilen-Transmigration

Aufgrund des kontrovers diskutierten Beziehungsgefüges zwischen Adhäsion und Transmigration der Neutrophilen war es einerseits notwendig, die Neutrophilen-Adhäsion im Zusammenhang mit der Transmigration zu untersuchen, sie jedoch andererseits als separates Ereignis zu analysieren. Da es sich bei der eigentlichen Leukozyten-Diapedese um einen sehr schnellen Vorgang handelt (Edens & Parkos, 2000), war es nur schwer möglich, die impedanzspektroskopisch nachgewiesene Beeinträchtigung der Barrierefunktion und der untersuchten *tight junction*-assoziierten Proteine ausschließlich der Neutrophilen-Transmigration zuzuordnen. Deshalb erfolgte ihre Analyse mit Hilfe von REM-Untersuchungen, die wiederum mit den impedanzspektroskopischen und immunzytochemischen Analysen korreliert wurden.

4.5.1.1 Transzellulär oder parazellulär?

Obwohl der transzelluläre Leukozyten-Transmigrationsweg, der die *tight junction*-Modulation nicht einbezieht, von Feng et al. (1998) überzeugend dargestellt wurde, ist die meist zitierte Migrationsroute die der parazellulären Diapedese, die ein Öffnen oder gar eine Zerstörung der interendothelialen Zell-Kontakte voraussetzt (Johnson-Leger et al., 2000). TEM-Untersuchungen, in denen die Neutrophilen-Diapedese *in vivo* sequentiell analysiert wurde, zeigten eindeutig, dass der Großteil der applizierten Neutrophilen die Endothelzell-Barriere überquerten, indem sie durch Poren migrierten oder aber das Endothelzell-Zytoplasma in Bereichen durchquerten, die nicht mit den festen Zell-Zell-Kontakten in Verbindung standen (Faustmann & Dermietzel, 1985; Hammersen & Hammersen, 1987; Feng et al., 1998). Ultrastrukturelle *in vitro*-Analysen zeigten allerdings, dass sich während der Neutrophilen-Diapedese der *adherence junction*-Komplex der Zell-Zell-Kontakte auflöste. So konnte nicht beurteilt werden, inwieweit der junctionale Komplex mit dem Transmigrations-Prozess der Neutrophilen in Zusammenhang stand (Ionescu et al., 2000). Dass die Endothelzell-Bereiche, in denen die Neutrophilen die Endothelzell-Barriere überwinden, nicht

deckungsgleich mit den Zonen der interendothelialen Zell-Kontakte waren, zeigten REM-Analysen von Faustmann & Dermietzel (1985) und Hoshi & Ushiki, (1999).

Auch die vorliegenden REM-Analysen zeigen, dass sich keine eindeutige räumliche Korrelation der Adhäsion bzw. Transmigration der Neutrophilen mit den PBCEC-Zellgrenzen aufzeigen ließ. Interessanterweise veränderte sich nach Zugabe der Neutrophilen sowohl die strukturelle Ausprägung der *marginal folds* der PBCEC als auch die Beschaffenheit ihrer Zell-Oberfläche. So wiesen die *marginal folds* nicht mehr die charakteristische faltenförmige Struktur auf, sondern bestanden aus einer Perlen-schnur-ähnlichen Aufreihung von Membranvesikeln. Sehr auffällig waren auch die nur dann zu beobachtenden, mehr oder weniger stark entwickelten Membranvesikel, die sich auf der gesamten Oberfläche der PBCEC zeigten. Möglicherweise sind die Zellgrenzen der Entstehungsort dieser Membranvesikel, von wo aus sie sich auf der Endothelzell-Oberfläche verteilen.

Interessant war auch die auf den elektronenmikroskopischen Bildern sichtbare Entwicklung von Mikrovilli auf den Zelloberflächen der PBCEC während der Neutrophilen-Interaktion. Diese waren vornehmlich auf jenen Regionen der Endothelzellen zu beobachten, in denen sich die Zellkerne abzeichneten. Ob diese Mikrovilli Vorstufen der genannten Membranvesikel waren, welche durch Abschnürung gebildet wurden oder ob die Mikrovilli bestehen blieben und die Membranvesikel unabhängig davon gebildet wurden, kann nicht allein durch die REM-Aufnahmen beantwortet werden. Eine Funktion der Mikrovilli bei der Selektin-vermittelten Kontaktaufnahme mit den Leukozyten ist vorstellbar, müsste allerdings noch untersucht werden.

Eine ebenfalls morphologisch veränderte Endothelzelloberfläche beobachteten Faustmann & Dermietzel (1985), Furie et al. (1987) und Hammersen & Hammersen (1987). Die Autoren zeigten, dass Neutrophile, die bereits fest an der Endothelzell-Oberfläche adhärten, dort Finger-ähnliche Filopodien in apikale Vertiefungen platzierten, was zu einer deutlichen Umstrukturierung der Zelloberfläche führte. Interessanterweise konnten auch in den REM-Analysen dieser Studie von den Neutrophilen ausgehende Filopodien beobachtet werden, in deren unmittelbarer Nachbarschaft vermehrt Membranvesikel auf der PBCEC-Zelloberfläche zu sehen waren.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Vesikel und die sogenannten *caveolae* nicht nur im Endothelzell-Zytosol, sondern auch auf der endothelialen Zelloberfläche auftreten (Kvietys & Sandig, 2001). Auch in Bereichen von Endothelzellmembranen, die schon in Kontakt mit Neutrophilen standen, entdeckten die Autoren diese morphologischen Strukturen (Lewis & Granger, 1988). Die *caveolae* sind Strukturen mit einem Durchmesser zwischen 50 und 100 nm, die vermutlich für den extra-junctionalen Proteintransport (extra-junctionale Permeabilitätssteigerung) während eines entzündlichen Prozesses verantwortlich sind (Kvietys & Sandig, 2001). Die Möglichkeit, dass die auf der Endothelzelloberfläche befindlichen *caveolae* bzw. Vesikel bei der transzellular-

lären Neutrophilen-Diapedese eine Rolle spielen, wurde von Lewis & Granger (1988) diskutiert. So haben diese durch ultrastrukturelle Analysen ebenfalls eindeutig gezeigt, dass das Endothel durch die Neutrophilen-Diapedese nicht geschädigt wird. In Organen wie der Haut oder den Muskeln, die ein kontinuierliches Kapillarendothel aufweisen, transmigrieren die Neutrophilen höchstwahrscheinlich, indem ihre Filopodien in die sogenannten *caveolae* oder pinocytischen Vesikel eindringen und so die endotheliale Barriere penetrieren (Kvietys & Sandig, 2001). Die vorschubende Kraft eines adhätierenden Filipodiums eines Neutrophilen, das bereits in ein vacuoläres Vesikel-Organell eingedrungen ist, führt zum Hervortreten des Filipodiums auf der abluminalen endothelialen Zellseite, wo es zu einer Interaktion mit der extrazellulären Matrix kommt (Kvietys & Sandig, 2001). Möglicherweise sind die adhätierenden Neutrophilen in der Lage, auf dem Endothelzell-Monolayer peripherer Gefäße dünnflächige Bereiche oder *fenestrae* ausfindig zu machen, in denen sie bevorzugt die Barriere durchqueren (Kvietys & Sandig, 2001). Die *fenestrae* sind Zytoplasma-frei und mit einer dünnen Haut verschlossen, die in der Dicke zwei aufeinanderliegenden Plasmamembranen entspricht. Die Neutrophilen durchqueren die *fenestrae* proteolytisch, ohne dabei die Integrität des Endothelzell-Monolayers zu beeinträchtigen. Endothelzelltypen wie die der Blut-Hirn-Schranke, die diese Fenestrations nicht aufweisen, bieten den Neutrophilen diese Transmigrations-Möglichkeit nicht.

Die Untersuchungen von Faustmann & Dermietzel (1985), Feng et al. (1998), Furie et al. (1987) und Hoshi & Ushiki (1999) zeigten, dass die Neutrophilen-Transmigration transzellulär erfolgt. Feng et al. (1998) beobachteten, dass die Neutrophilen an der Stelle des Endothelzell-Monolayers, an der sie transmigrieren, eine Hantel-förmige Gestalt annehmen. Je nachdem, wie weit die Extravasation fortgeschritten ist, ist auf der luminalen Endothelzellseite eine blasenförmige Ausstülpung zu beobachten (Wolosewick, 1984; Feng et al., 1998; Hoshi & Ushiki, 1999; Johnson-Leger et al., 2000). Diese Beobachtung erlaubte die Schlussfolgerung, dass sich der neutrophile Granulozyt durch eine schmale zirkuläre Pore des Endothelzell-Monolayers zwängt, anstatt eine Endothelzell-Retraktion zu induzieren, die die einzelnen Zellen an ihren Grenzen auseinanderzieht, so dass eine parazelluläre Extravasation des Neutrophilen erfolgen könnte. Möglicherweise sind die transzellulären Poren, durch die die Neutrophilen transmigrieren, das Ergebnis ihrer proteolytischen Tätigkeit (Kvietys & Sandig, 2001).

Die Anreicherung von F-Aktin und Mikrofilamenten, die zur Kraftentwicklung des vorschreitenden Neutrophilen-Pseudopodiums (*leading edge*) während der Diapedese notwendig ist, wurde sowohl *in vivo* (Wolosewick, 1984) als auch *in vitro* (Cepinskas et al., 1999) nachgewiesen. Die 3-5 µm große, initiale, vacuoläre Pore im Endothelzell-Monolayer wird unter anderem durch die Spannungserzeugung des kortikalen Mikrofilament-Systems des kugeligen, caudalen Neutrophilen-Abschnitts ge-

öffnet, dass noch in das Lumen des Blutgefäßes hineinragt (Wolosewick, 1984). Das Aufweiten der transendothelialen Pore wird zusätzlich durch die Umorganisation des endothelialen Zytoskeletts unterstützt (Michel & Neal, 1999).

Faustmann & Dermietzel (1985), Hammersen & Hammersen (1987) und Feng et al. (1998) postulierten, dass sich die beteiligten Endothelzellen noch während der Diapedese über den Zellkörper des Neutrophilen stülpen. Dadurch, dass der Neutrophile von der Endothelzelle vollständig umschlossen wird, wird die entstehende Öffnung im Monolayer geschlossen bevor der Neutrophile in das Gewebe entlassen wird. Die aktive Teilnahme des Endothels an der Neutrophilen-Diapedese führt zu einer schnellen Rückführung der Endothelzellen in ihren ursprünglichen Zustand, so dass ein Permeabilitätsanstieg des Endothelzell-Monolayers während der Transmigration minimiert wird. Auch Kvietys & Sandig (2001) diskutierten die Möglichkeit, dass während der Neutrophilen-Extravasation Membranmaterial der apikalen Endothelzelloberfläche auf die Neutrophilen-Oberfläche geschoben wird, was zum Umschließen des noch in das Lumen des Blutgefäßes ragenden Neutrophilen führt. In Abbildung 100 ist diese Modellvorstellung bildlich dargestellt.

Feng et al. (1998) bestätigten dieses Modell. Die Autoren werteten dazu dreidimensional und Computer-unterstützt sequentielle TEM-Analysen an Kapillarendothelzellen aus der Haut von Meerschweinchen aus und zeigten eindeutig, dass die interendothelialen *junctions* des Endothelzell-Monolayers an der Neutrophilen-Diapedese nicht beteiligt waren. Das von Feng et al. (1998) aufgestellte Modell ist vergleichend in der Abbildung 101 dargestellt. Dieser Mechanismus der Neutrophilen-Diapedese, an dem das Endothel aktiv beteiligt ist, wurde jedoch bisher ausschließlich am peripheren Endothel *in vivo* beobachtet.

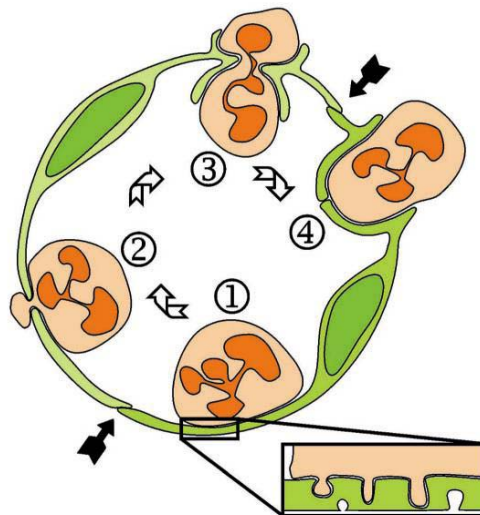


Abb. 4.1:

Graphische Darstellung der transzellulären Diapedese von Neutrophilen in vivo nach Kvietys & Sandig (2001).

Dargestellt ist ein adhärerender Neutrophiler, der Filipodien-ähnliche Auswüchse in sich ausbildende endotheliale caveolae oder vesiculo-vacuoläre Organellen einführt (1). Langsam erreicht der Neutrophile die abluminalen Zellseite (2) und die Endothelzellen beginnen, den noch luminalen Teil des Neutrophilen zu umschließen (3). Noch bevor der Neutrophile in das Gewebe entlassen wird, ist der Endothelzell-Monolayer wieder verschlossen (4).

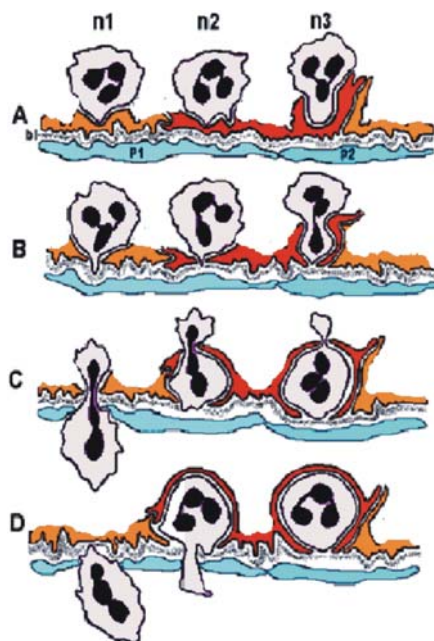


Abb. 4.2:

Darstellung der transzellulären Neutrophilen-Diapedese in situ modifiziert nach Feng et al. (1998).

(Aufgeführt sind die zusammengefassten Ergebnisse der Computer-unterstützten, dreidimensional ausgewerteten TEM-Sektional-Analysen der Neutrophilen-Transmigration).

Der Neutrophile n1 nimmt mit einem zytoplasmatischen Fortsatz Kontakt mit der Endothelzelle auf (A) und schiebt diesen durch die Endothelzelle, die Basallamina und den Perizyten (B-D). Im Fall der Neutrophilen n2 und n3, der häufiger beobachtet wurde, transmigriert der Neutrophile nicht umgehend durch die Basallamina, sondern wird zuvor von den Endothelzellen umschlossen, bevor er seine Pseudopodien durch die Basalmembran und die Perizyten schiebt (C und D).

4.5.1.2 Das Neutrophilen-Transmigrationsmodell

Im Rahmen dieser Studie wurde die Neutrophilen-Extravasation am Endothelzelltyp der Blut-Hirn-Schranke untersucht. Die Kenntnisse insbesondere über den Transmigrations-Mechanismus der Leukozyten durch dieses hoch-spezialisierte, barrierebildende Endothel der Blut-Hirn-Schranke sind bisher noch gering. Nach wie vor ist unklar, ob die Leukozyten die Blut-Hirn-Schranke inter- oder intrazellulär durchqueren (Bolton et al., 1998). Zunächst sollte in der vorliegenden Studie der Einfluss der Neutrophilen-Interaktion auf die Barrierefunktion und die *tight junction*-assoziierten Proteine der cerebralen Kapillarendothelzellen untersucht werden. Im Vordergrund der Experimente stand allerdings die Aufklärung der Transmigrationsroute der Neutrophilen. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurde erstmalig ein Kulturmodell der BHS eingesetzt, dessen Barrierefunktion und morphologische Ausprägung eine sehr hohe *in vivo*-Kompatibilität aufwies.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals *in vitro* am cerebralen Kapillarendothel gezeigt werden, dass die neutrophilen Granulozyten die endotheliale Barriere auf transzellulärem Wege passieren. Diese transzelluläre Neutrophilen-Transmigration wurde *in vitro* noch nicht beobachtet (Kvietys & Sandig, 2001) und ist speziell für das barrierebildende Endothel ein bisher nicht dokumentierter Mechanismus der Immunzell-Diapedese. Schon Faustmann & Dermietzel (1985), Feng et al. (1998) und Hammersen & Hammersen (1987) beobachteten, dass die neutrophilen Granulozyten während ihrer Transmigration von den Endothelzellen umschlossen werden, indem sich diese auf die Leukozyten-Oberfläche hinaufschoben, bevor jene in das Gewebe auf der abluminalen Gefäßseite entlassen werden. Die Autoren wiesen diesen Mechanismus der Neutrophilen-Extravasation allerdings ausschließlich *in vivo* und am Endothel peripherer Gefäße nach.

Die morphologischen Studien dieser Arbeit zeigen, dass die Neutrophilen-Transmigration, die nachweislich transzellulär erfolgt, dennoch einem Mechanismus unterliegt, der sich von den bisher aufgeführten Transmigrations-Mechanismen, welche in Abbildung 4.1 und 4.2 dargestellt sind, unterscheidet. Mit Hilfe der REM-Analysen wurde eine neue Modellvorstellung der Neutrophilen-Transmigration durch das Endothel der Blut-Hirn-Schranke etabliert. Diese wird im Folgenden erläutert und ist in Abbildung 4.3 dargestellt.

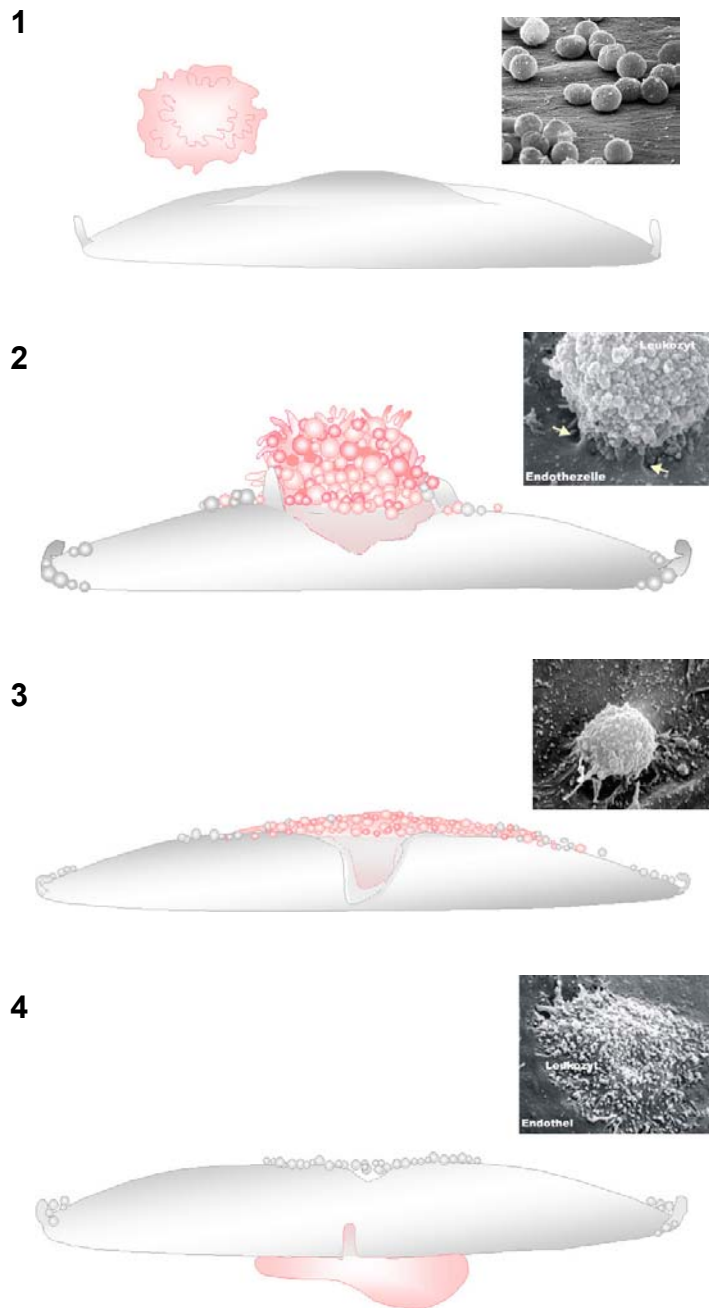


Abb. 4.3:

Modellvorstellung der Neutrophilen-Diapedese durch das Endothel der BHS.

Im Ausgangszustand, d. h. vor der Endothelzell-Leukozyten-Interaktion sind auf der Zell-Oberfläche beider beteiligter Zelltypen keine Membranvesikel-artigen Strukturen zu erkennen (1). Der Kontakt des Neutrophilen mit der Endothelzelle führt zur Umstrukturierung der Endothel- und Neutrophilen-Zelloberfläche, was sich in dem Auftreten von Membranvesikel-artigen Strukturen manifestiert. Eine derartige morphologische Umbildung ereignet sich zudem an den marginal folds der Endothelzellen, so dass diese einer Perschnur-artigen Aufreihung von Membranvesikeln gleichen (2).

Zu Beginn der Transmigration wird der Neutrophile von den Vesikelstrukturen komplett bedeckt. Während des Einsinkens des Leukozyten in den Endothelzell-Monolayer, interagieren die Membranvesikel-artigen Strukturen miteinander und die Endothelzelle schiebt sich zusätzlich an dem Neutrophilen hoch, ohne ihn allerdings zu umkleiden (2 und 3). Die Neutrophilen-Transmigration, die auf transzellulärem Wege erfolgt, involviert dennoch die Endothelzellgrenzen, indem die Membranvesikel der marginal folds mit denen der Neutrophilen interagieren.

Die Membranvesikel fungieren als Reparaturmechanismus, indem sie sich über dem einsinkenden Neutrophilen zusammenschieben und so das Membranmaterial liefern, um die Endothelzell-Oberfläche wieder zu verschließen (4).

Die durchgeführten REM-Analysen zeigen eindeutig, dass sich während der Neutrophilen-Transmigration, die auf transzellulärem Wege erfolgt, nicht die gesamte Endothelzelle um den transmigrierenden Neutrophilen stülpt, wie dies Feng et al. (1998), Faustmann & Dermietzel (1985) und Hammersen & Hammersen (1987) am kontinuierlichen Endothelzelltyp peripherer Gefäße zeigten. Vielmehr sind am Transmigrationsprozess membranvesikelartige Strukturen beteiligt, die sich erst durch die Endothelzell-Neutrophilen-Interaktion auf der Oberfläche der Endothelzellen bilden und auch auf den Neutrophilen zu finden sind. Die REM-Aufnahmen der vorliegenden Arbeit lassen darauf schließen, dass sich während der festen Adhäsion bzw. der Transmigration diese membranvesikelartigen Strukturen der Endothelzellen in Richtung des Leukozyten schieben, wo sie mit jenen der Neutrophilen interagieren. Für die Endothelzellen stehen die Bildung dieser Vesikel und das beschriebene Verhalten fest; ob ein Teil von ihnen tatsächlich von den Neutrophilen stammt, kann nicht abschließend beurteilt werden. Die Abbildung 3.71 und 3.72 in Kapitel 3.2.2.2 demonstriert, dass es zur Interaktion der Vesikel auf der Neutrophilen-Oberfläche mit denen der Endothelzellen kommt, so dass eine Beteiligung der Membranvesikel-Strukturen beider Zelltypen an der Transmigration wahrscheinlich ist.

Dadurch, dass sich während der Transmigration nicht die gesamte Endothelzelle über den Neutrophilen schiebt, wie in der Literatur beschrieben wurde (s. o.), verliert die Endothelzelle zu keinem Zeitpunkt ihren Zell-Substrat-Kontakt. So bestätigten auch die ECIS-Messungen, vor denen Neutrophile bis zu einer E/L-Ratio von 1:10 zu den PBCEC gegeben wurden, dass der Zell-Substrat-Kontakt nicht beeinflusst wurde. Erst durch Zugabe von Neutrophilen E/L-Ratios ab 1:17 bzw. 1:20, die nach Huang et al. (1993) ohnehin unphysiologisch sind, wurde der Zell-Matrix-Kontakt des PBCEC-Monolayers geringfügig, aber reversibel, gesenkt. Da für die Erhaltung der Barrierefunktion der BHS der feste Zell-Matrix-Kontakt der Endothelzellen ebenso essentiell ist wie die Integrität der barrierebildenden *tight junctions*, ist der unveränderte Zell-Substrat-Kontakt während der Transmigration speziell für den Endothelzelltyp der BHS von besonderer Bedeutung. Wie wichtig der feste Zell-Matrix-Kontakt der cerebralen Endothelzellen für den Erhalt des Gesamtwiderstands und damit für die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke ist, zeigten schon die ECIS-Messungen, in denen der Anteil des Zell-Substrat-Kontakts am Gesamtwiderstand in Form des Parameters α dargestellt wurde.

Die REM-Aufnahmen lassen vermuten, dass die neutrophilen Granulozyten großflächig in den Endothelzell-Monolayer einsinken. Inwiefern sie dennoch den Endothelzell-Monolayer durch eine kleine transzelluläre Pore passieren, die von den Endothelzellen schnell wieder verschlossen werden kann, wie dies Feng et al. (1998) zeigten ist nicht auszuschließen, müsste allerdings durch Detail-Untersuchungen noch analysiert werden. Das nachweislich großflächige Einsinken des Leukozyten, das

wahrscheinlich u. a. durch Neutrophilen-Proteasen vermittelt wird, benötigt zur Erhaltung der Barrierefunktion der BHS während der Transmigration einen Mechanismus zur Reparatur der Endothelzell-Membran. Das Membran-Material der Vesikel, das über dem einsinkenden Neutrophilen zusammenfließt bzw. mit der apikalen Endothelzell-Membran verschmilzt, ermöglicht ein schnelles Verschließen der Zell-Oberfläche, so dass die Reparatur der Endothelzell-Membran schon während der Transmigration erfolgt. Auf diese Weise wird eine Permeabilitätssteigerung während der Neutrophilen-Diapedese verhindert.

Die Beteiligung der Endothelzellgrenzen

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass auch die Endothelzellgrenzen am Transmigrationsprozess beteiligt sind, allerdings vollkommen anders, als es bisher in der Literatur beschrieben wurde. Die REM-Aufnahmen zeigen, dass die Transmigration transzellulär erfolgte, indem sich der Neutrophile auf der Endothelzell-Oberfläche abflacht und aufspreitet, so dass die *marginal folds* zwangsläufig in dessen Extravasation involviert wurden. Die Membranvesikel der *marginal folds* interagieren dabei sowohl mit jenen der Neutrophilen als auch mit den anderen auf der Endothelzelloberfläche verteilten Vesikeln. Transmigrierten die Neutrophilen in unmittelbarer Nähe der Endothelzell-Grenzen, so wurden diese durch das Verschmelzen der Membranvesikel in den Transmigrationsprozess miteinbezogen. Die *marginal folds* waren dabei in unmittelbarer Nähe zum Neutrophilen zum Teil nicht mehr zu erkennen. Eine distinkte Grenze zwischen Endothelzelle und Leukozyt war insofern auch elektronenmikroskopisch nicht mehr aufzulösen. Anders als die meisten *in vitro*-Studien konnten die vorgenommenen morphologischen Untersuchungen eine Kontraktion der Endothelzellen mit der einhergehenden Bildung von Lücken, durch die die Neutrophilen dann transmigrieren, ausschließen.

Der Vergleich der morphologischen Studien mit den impedanzspektroskopischen Messungen zeigt, dass die Neutrophilen-bedingte Permeabilitätssteigerung des PBCEC-Monolayers hauptsächlich durch die Neutrophilen-Adhäsion verursacht wurde. Dennoch kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass auch die Neutrophilen-Diapedese zu dieser Widerstandserniedrigung beitrug. So zeigten die ECIS-Messungen, dass zwar der Zell-Substrat-Kontakt der PBCEC durch Neutrophile bis zu einer E/L-Ratio von 1:20 nicht geschwächt wurde, der Zell-Zell-Kontakt durch Zugabe von Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:5 aber reversibel gesenkt wurde. Die Permeabilitätssteigerung des Monolayers beruht nicht zwangsläufig auf der Neutrophilen-Diapedese sondern kann bereits durch die Adhäsion der Neutrophilen verursacht werden (Del Maschio et al., 1996; Perry et al., 1997) (s. auch Kapitel 4.3.3) und ist im Rahmen einer entzündlichen Reaktion eine physiologische Begleiterscheinung der

Immunabwehr. Daher ist die gemessene Permeabilitätssteigerung der Zell-Zell-Kontakte der PBCEC während der Neutrophilen-Interaktion für die Charakterisierung der Diapedese nicht relevant. Auch die immunzytochemischen Studien zeigen, dass sich die Expression der *tight junction*-assoziierten Proteine ZO-1, Occludin und Claudin-5 der PBCEC durch die Inkubation mit Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:5 nicht veränderte. Erst ab einer E/L-Ratio von 1:20, die nach (Huang et al., 1993) ohnehin unphysiologisch ist, führte zu einer deutlich reduzierten Expression dieser Proteine und zu einer Formveränderung der Endothelzellen. Die Interaktion der cerebralen Endothelzellen mit einer physiologischen Menge an Neutrophilen verursachte ebenfalls keinen Abbau oder eine Verlagerung der *tight junction*-assoziierten Proteine ZO-1, Occludin und Claudin-5.

Wie schon in Kapitel 4.3.3 beschrieben wurde, spielen bei der durch die Neutrophilen-Endothelzell-Interaktion verursachten Permeabilitätserhöhung der interendothelialen Zell-Kontaktzone auch Aktin-Zytoskelett-vermittelte Signaltransduktions-Mechanismen eine Rolle. Die resultierende Endothelzell-Retraktion wurde im ECIS-Experiment durch die Senkung des Parameters R_b erkannt. Dennoch widerlegen die vorliegenden REM-Analysen eine Neutrophilen-Transmigration durch die interendothelialen Zell-Kontakte. Wie die REM-Aufnahmen deutlich zeigen, kam es durch den Kontakt der cerebralen Endothelzellen mit den Neutrophilen zu einer Umstrukturierung der *marginal folds*. Die beobachteten Vesikel an den Zellrändern könnten entweder aus den *marginal folds* entstanden sein oder an den Zellkontaktzonen sezerniert und an die Zelloberflächen befördert worden sein. Beide vorstellbaren Möglichkeiten könnten als Folge eine geringfügige Permeabilitätserhöhung der *tight junction*-Region haben. Dennoch bleibt unklar, ob bereits der bloße Kontakt des aufgespreiteten Leukozyten mit den Zellrändern der PBCEC zu eben jener Permeabilitätserhöhung führen kann.

Wenngleich also das beschriebene Modell verschiedene Ursachen für die vorübergehende Erhöhung des interendothelialen Widerstands zulässt, beschreibt es anschaulich und eindeutig die transzelluläre Migration neutrophiler Granulozyten durch cerebrale Endothelzell-Monolayer.

4.5.2 Die CD4⁺-T-Zell-Transmigration

Die CD4⁺-Interaktion wies erhebliche Unterschiede zur PBCEC-Neutrophilen-Interaktion auf. Während durch die Neutrophilen-Interaktion die Bildung von membranvesikelartigen Strukturen auf der Endothelzell-Oberfläche induziert wurde, kam es durch die T-Zellen zu keinerlei derartigen Umstrukturierungen. Auch waren auf der T-Zelloberfläche keine Membranvesikel zu beobachten, wie dies die Neutrophilen zeigten. Dennoch war deutlich zu sehen, dass der Lymphozyt ähnlich breitflächig durch die

Endothelzell-Oberfläche transmigrierte wie die Neutrophilen und nicht durch die interendotheliale Zell-Zell-Kontaktzone.

Den REM-Studien zufolge kam es zu keiner morphologisch sichtbaren Schädigung des Endothels inklusive der *tight junction*-Region. Wong et al. (1999), die die Interaktion cerebraler humaner Endothelzellen mit Lymphozyten *in vitro* ultrastrukturell analysierten, zeigten erstaunliche Übereinstimmungen ihrer Beobachtungen mit denen der vorliegenden Studie. Die ultrastrukturellen Untersuchungen der Autoren demonstrierten, dass die von den Lymphozyten gebildeten Pseudopodien mit den von den Endothelzellen stammenden Finger-ähnlichen Ausstülpungen interagierten. Möglicherweise dringen die Lymphozyten-Pseudopodien in das Zytoplasma der apikalen Endothelzell-Oberfläche ein (Wong et al., 1999). Die Autoren konnten zudem keine morphologische Schädigung des Endothelzell-Monolayers beobachten und auch die interzellularen *junctions* schienen nach der Lymphozyten-Transmigration morphologisch intakt zu bleiben.

Die REM-Analysen der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass die Diapedese der CD4⁺-T-Zellen ebenso transzellulär erfolgt wie die der Neutrophilen. Im Unterschied zur Neutrophilen-Transmigration sind allerdings keine Membranvesikel in den Transmigrationsprozess involviert.

4.5.3 Neutrophilen-Transmigration durchs Plexusepithel

Die morphologische Analyse der Leukozyten-Transmigration durch das cerebrale Endothel erfolgte nicht nur hinsichtlich verschiedener Immunzelltypen, sondern zusätzlich zum cerebralen Endothel vergleichend am cerebralen Plexusepithel (CPE).

Differenzen zeigten sich bereits bei der Gegenüberstellung der morphologischen Befunde der Interaktion Neutrophiler und jener von CD4⁺-T-Zellen mit den cerebralen Endothelzellen. Interessanterweise unterschied sich auch die Neutrophilen-Interaktion mit den cerebralen Kapillarendothelzellen von derjenigen mit dem Plexusepithel. So kam es nach Zugabe der Neutrophilen zu den entzündungsaktivierten CPE im Vergleich zu den PBCEC zu auffällig wenigen Transmigrations-Ereignissen. Die bei der Endothelzell-Neutrophilen-Interaktion charakteristische Bildung der membranvesikelartigen Strukturen war weder auf der Neutrophilen- noch auf der Plexusepithel-Oberfläche zu beobachten. Wie die REM-Aufnahmen zeigen, 'sank' der Neutrophile in die Plexusepithel-charakteristischen Mikrovilli ein. Dabei bildete sich um den Neutrophilen eine Mikrovilli-freie Zone. Vereinzelt waren Mikrovilli beider Zelltypen in Interaktion zu beobachten. Generell ist der direkte Vergleich der transendothelialen und der transepithelialen Neutrophilen-Migration allerdings problematisch, da sich der Immunzell-Adhäsionsprozess in beiden Zellsystemen deutlich unterscheidet (Edens & Parkos, 2000). So tritt beispielsweise bei der Neutrophilen-Epithel-Adhäsion

sion der Scherstress, dem die apikale Endothelzell-Oberfläche durch den Blutstrom ausgesetzt ist, nicht auf. Auch die Polarität der transendothelialen Migration ist beim Epithel (von der basolateralen zur apikalen Seite) genau umgekehrt als beim Endothel (Edens & Parkos, 2000).

Chow et al. (1992), Parkos et al. (1996) und Lhotta et al. (1991) zeigten, dass die Neutrophilen-Diapedese durch den Epithelzell-Monolayer durch die interendothelialen *junctions* hindurch erfolgt. Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Die REM-Analysen zeigen vielmehr, dass die Neutrophilen-Transmigration am Plexusepithel nicht in unmittelbarer Nähe der interepithelialen Zell-Kontakte erfolgte, sondern unabhängig davon, so dass auch hier eine transzelluläre Migration wahrscheinlich ist. Auch die von Ginzberg et al. (2001) Neutrophilenverursachte nachgewiesene Zerstörung der interepithelialen Zell-Kontaktzone, in Verbindung mit dem Ablösen der Epithelzellen von ihrem Substrat, konnte in den REM-Analysen der vorliegenden Studie durch die Neutrophilen-Interaktion nicht beobachtet werden.

4.6 Zusammenfassende Wertung und Ausblick

Zentrales Ziel der Arbeit war die zell- und molekularbiologische Charakterisierung des Transmigrationsprozesses immunkompetenter Zellen über die Blut-Hirn-Schranke. Im Fokus der Untersuchungen stand die Frage, ob die eingesetzten Leukozyten (neutrophile Granulozyten) die Endothelzell-Barriere trans- oder parazellulär passieren und welche spezifischen Interaktionen zwischen Leukozyten und endothelialen Zellen zur Veränderung ihrer barrierebildenden Eigenschaften führen. Die weiterführenden Fragen leiten sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie ab.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit führten zur Entdeckung völlig neuartiger Aspekte der Neutrophilen-Transmigration, so dass eine Modellvorstellung zum Mechanismus der Neutrophilen-Diapedese formuliert werden konnte. Dennoch bedarf es weiterführender Analysen, um einige der noch hypothetischen Aspekte des Transmigrationsmodells, das in Abbildung 4.3 dargestellt ist, zu verifizieren.

Die REM-Analysen, durch die sich zwar die Modellvorstellung der Neutrophilen-Transmigration entwickelte, ließen einige wichtige Aspekte ungeklärt. So bildeten sich durch die Neutrophilen-Interaktion membranvesikelartige Strukturen auf der Zelloberfläche der Endothelzellen. Auch die zuvor schlauchartigen *marginal folds* der Endothelzellen wurden durch die Neutrophilen-Interaktion in membranvesikelartige Strukturen umgebildet. Diese Vesikel, die offensichtlich maßgeblich am Transmigrationsprozess beteiligt sind, werfen Fragen auf, die zur Etablierung des neuartigen Modells der Neutrophilen-Diapedese in ergänzenden Untersuchungen zu klären sind und im Folgenden formuliert werden. In der Abbildung 4.4 sind die noch aufzuklärenden Teilaspekte des Modells durch rote Pfeile gekennzeichnet.

So ließen die REM-Analysen beispielsweise ungeklärt, ob die membranvesikelartigen Strukturen tatsächlich von der Zell-Oberfläche abgeschnürte Membranvesikel darstellen, die nicht mehr mit der Ursprungszelle verbunden sind, oder ob es sich lediglich um kugelförmige Ausstülpungen der Zell-Oberfläche handelt. Weitere Fragen, die sich aus den REM-Analysen ergeben, sind im Folgenden aufgeführt:

- Entstehen die membranvesikelartigen Strukturen auf der Endothelzell-Oberfläche durch Abschnürungen der mikrovilliartigen Ausstülpungen (a) der Zelloberfläche und/oder liegt der Entstehungsort in den *marginal folds* (b)?
- Stammen die membranvesikelartigen Strukturen ursprünglich von den Endothelzellen (c) oder von den Neutrophilen (d)?
- Kommt es zu einer gerichteten Bewegung der membranvesikelartigen Strukturen von den Endothelzellgrenzen in Richtung des transmigrierenden Neutrophilen, dessen Zelloberfläche sie bedecken, so dass der Ursprungsort der Vesikel letztlich bei den Endothelzellen zu suchen ist?

- Handelt es sich bei den membranvesikelartigen Strukturen tatsächlich um echte Membranvesikel, die zum Zweck der Transmigration von den Endothelzellen und/oder den Neutrophilen gebildet wurden, oder handelt es sich um apoptotische Vesikel?
- Welche Funktion erfüllen die membranvesikelartigen Strukturen beim Transmigrationsprozess? Dienen sie als Membranmaterial-Lieferanten, um die Endothelzell-Oberfläche nach abgeschlossener Neutrophilen-Diapedese wieder zu verschließen bzw. zu reparieren?
- Führt die Umstrukturierung der *marginal folds* zu einer Verlagerung einzelner *tight junction*-assoziierten Proteine bzw. zu einer Zerstörung der Zell-Zell-Kontakte?
- Inwiefern handelt es sich bei der elektronenmikroskopisch beobachteten Interaktion der membranvesikelartigen Strukturen um eine echte `Membranfusion` (e)?
- Sinkt der Neutrophile großflächig in den Endothelzell-Monolayer ein (f) oder transmigriert er durch eine kleine Pore bzw. mittels sog. `caveolae`?

Eine weitere wichtige Frage ergibt sich aus der Beobachtung, dass sich die Endothelzellen während der Transmigration am Neutrophilen hochschieben (ihn allerdings nicht umschließen), wobei die REM-Aufnahmen den Eindruck vermitteln, dass dabei die Zellmembranen beider beteiligter Zelltypen `fusionieren` (g). Ob es tatsächlich zu einer Verschmelzung der Plasmamembranen der beiden Zelltypen kommt oder ob diese getrennt voneinander bleiben stellt einen sehr wichtigen Aspekt zur Etablierung des Transmigrationsmodells dar und ist durch weitere Experimente zu klären.

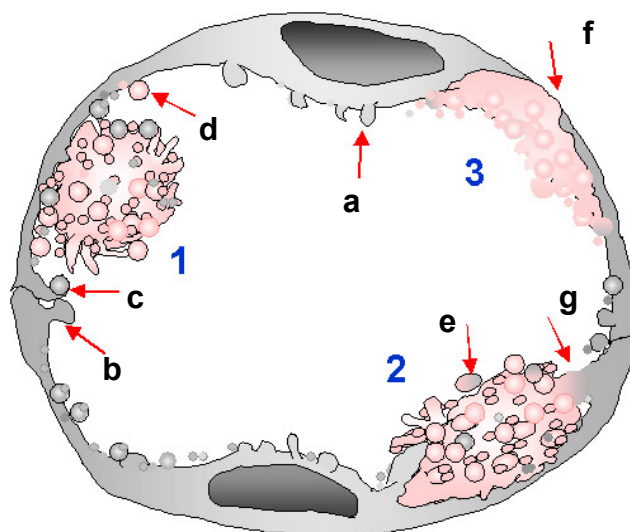


Abb. 4.4:

Darstellung der noch zu klärenden Fragen zum Neutrophilen-Transmigrationsmodell.

Die zu der Darstellung formulierten Fragen (rote Pfeile) sind im Text (s. o.) aufgeführt. Endothelzellen (grau), Neutrophile (pink).

Das hier vorgestellte Modell der Neutrophilen-Transmigration wurde mit Hilfe von REM-Analysen entworfen, die lediglich Aussagen zur Morphologie der Zelloberflächen erlauben. Immunzytochemische Analysen am Laser-Scanning-Mikroskop und lichtmikroskopische sowie transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen der Neutrophilen-Endothelzell-Interaktion an Zell-Querschnitten mit Hilfe von Immuno-*labelling*-Techniken könnten das hier vorgestellte Modell detaillieren.

Die Verwendung zellspezifischer membranständiger Marker für beide Zelltypen (Endothelzellmarker: u.a. Glucose-Transporter-1; Leukozyten: u.a. CD 45, CD 31 bzw. CD 11b/18 für die neutrophilen Granulozyten) und ihre immunzytochemische Analyse durch die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie erlaubt es, die Mechanismen der mittels REM beobachteten Membraninteraktion beider Zelltypen zu identifizieren.

Die Doppel-Immunmarkierung der Zellmembranen beider Zelltypen und die anschließende Analyse mittels der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie, die eine dreidimensionale Betrachtung erlaubt, ermöglicht z. B. die Aufklärung der Herkunft der membranvesikelartigen Strukturen. Somit kann ermittelt werden, ob jene den *marginal folds* entspringen. Sollte dies der Fall sein, so würde eine zeitaufgelöste immunzytochemische Analyse Aufschluss darüber geben, ob es tatsächlich zu einer gerichteten Bewegung der Vesikel von den Endothelzellgrenzen zum transmigrierenden Neutrophilen hin kommt, die diesen dann umkleiden und/oder mit den Neutrophilen-`Vesikeln` interagieren.

Besonders wichtig sind die Doppelimmun-Markierungs-Experimente jedoch zur Analyse der `Membranfusions`-Theorie. Inwiefern es sich bei der in den REM-Aufnahmen erkennbaren Interaktion zweier membranvesikelartiger Strukturen tatsächlich um eine `Membranfusion` handelt, müsste in weiterführenden Studien gezeigt werden. Ergänzende Untersuchungen könnten zudem Aufschluss darüber geben, ob sich die Endothelzelle tatsächlich am Leukozyten hochschiebt und dabei mit dessen Zellmembran `fusioniert`, oder ob sie durch die Neutrophilen-Interaktion von diesem hochgezogen wird, wie es einige REM-Bilder nahelegen.

Zur umfassenden Untersuchung der membranvesikelartigen Strukturen wäre es zudem wichtig zu klären, ob es sich hierbei um apoptotische Vesikel handelt. Die Bedeutung des Neutrophilen-induzierten programmierten endothelialen Zelltods ist für die Leukozyten-Transmigration noch weitgehend ungeklärt. Sollte sich bestätigen, dass durch die Interaktion der Neutrophilen apoptotische Prozesse in den Endothelzellen eingeleitet werden, so wäre im darauffolgenden Schritt zu klären, ob dies nur bei beteiligten Zellen oder flächig geschieht und es sich somit eventuell um einen Kulturartefakt handelt. Dies kann durch den Einsatz eines spezifischen Apoptose-kennzeichnenden Antikörpers geprüft werden. Caspase-3-Aktivitätstests könnten zudem zeigen, inwiefern durch die Neutrophilen-Interaktion die Apoptoserate im Entzündungsmodell gesteigert wird.

Weitere Anhaltspunkte darüber, ob die Neutrophilen großflächig in der Endothelzellschicht einsinken oder ob sie den Monolayer durch eine kleine Pore bzw. durch 'caveolae' passieren, könnten lichtmikroskopische Studien an gefärbten Semidünnschnitten des Endothelzell-Monolayers (Zellmembran-Färbung) während deren Interaktion mit Neutrophilen ergeben.

Mit Hilfe lichtmikroskopischer Untersuchungen an Zell-Querschnitten ist es zudem möglich nachzuweisen, ob die membranvesikelartigen Strukturen die Endothelzelloberfläche nach der Diapedese an jener Stelle bedecken, an der sie sich ereignete und somit einen 'Reparatur-Mechanismus' darstellen.

Erst nach der Durchführung der vorgeschlagenen immunzytochemischen und lichtmikroskopischen Untersuchungen wäre es sinnvoll TEM-Studien anzuschließen, um weitere Details der Neutrophilen-Transmigration zu beleuchten. Durch den Einsatz eines *tracers* (z. B. Lanthan) in den TEM-Studien wird es möglich, die Dichtigkeit der *tight junctions* während der Neutrophilen-Adhäsion und der Diapedese darzustellen. Die TEM-Untersuchung erlaubt zudem, die Umstrukturierung der *marginal folds* ultrastrukturell zu analysieren und dabei mit der eventuellen Umbildung der *tight junction*-assoziierten Proteine zu korrelieren, die zu diesem Zweck immunmarkiert werden müssten. Ein Immuno-*labelling* ausgewählter *tight junction*-assoziiierter Proteine zur Markierung der Endothelzellgrenzen soll zudem helfen, die Neutrophilen-Diapedese zu lokalisieren.

Ein weiterführender Schritt, der die Veränderung der *marginal folds* noch detaillierter zu beschreiben vermag, ist die hochauflösende Charakterisierung der endothelialen Zellgrenzen und ihrer Modulierung während der Neutrophilen-Endothelzell-Interaktion mit Hilfe der Raster-Kraft-Mikroskopie. Ferner ist es mit Hilfe dieser Methode möglich, die nanostrukturelle Organisation der Leukozyten-Endothelzell-'Fusion' detailliert zu charakterisieren. Außerdem erlaubt sie, die Oberflächenbeschaffenheit der Endothelzellen, die sich durch die Neutrophilen-Interaktion offensichtlich verändert (s. REM-Analysen), auch hinsichtlich ihrer möglicherweise veränderten Materialeigenschaft (z. B. Elastizität) zu untersuchen.

Sollten die weiterführenden Untersuchungen bestätigen, dass die Neutrophilen-Diapedese transzellulär erfolgt und dabei Membranen fusionieren, wäre dennoch nicht klar, ob und in welcher Weise die *tight junctions* daran beteiligt sind. So ergaben die impedanzspektroskopischen Studien, dass die Inkubation der cerebralen Endothelzellen mit den Neutrophilen zu einer Beeinträchtigung der Zell-Zell-Kontakte führte, deren Re- bzw. Irreversibilität allerdings von der applizierten Zellzahl abhing. Zudem zeigten die immunzytochemischen Untersuchungen der *tight junction*-assoziierten Proteine ZO-1 und Claudin-5, dass durch die Inkubation der Endothelzellen mit den Neutrophilen ab einer bestimmten Neutrophilen-Anzahl die Expression der unter-

suchten Proteine stark beeinträchtigt wurde, was sich allerdings quantitativ im Western-Blot nicht bestätigen ließ. Dieser Effekt sollte in zukünftigen Studien detailliert beleuchtet werden. Durch die immunzytochemische Anfärbung der tight junction-assoziierten Proteine (u. a. ZO-1, Occludin und Claudin-5) und spezifischer Leukozytenmarker (s. o.) kann zunächst in Doppelmarkierungsexperimenten überprüft werden, welche Veränderungen im tight junction-Protein-Komplex vor, während und nach dem Durchtritt von Leukozyten durch die Blut-Hirn-Schranke charakteristisch sind. Überdies können diese Experimente dazu genutzt werden, die statistische Aufenthaltswahrscheinlichkeit von den Leukozyten auf dem Endothelzell-Monolayer vor, während und nach dem Transmigrationsvorgang zu bestimmen, so dass geklärt werden kann, ob sich die Leukozyten signifikant häufiger an den Zellgrenzen des Endothelzellverbands oder eher zielungerichtet anlagern.

Die Immunoblot-Analysen für die genannten *tight-junction*-Proteine ergaben keinen quantitativen Expressionsunterschied durch Co-Kultivierung mit neutrophilen Granulozyten in einer E/L-Ratio von bis zu 1:5. Auch in den Immunfluoreszenzen war bei dieser E/L-Ratio keine Umverteilung der untersuchten *tight junction*-Proteine zu erkennen. Dennoch zeigte die biophysikalische Analyse (ECIS-Methode), dass die Neutrophilen einen deutlichen Einfluss auf die interendothelialen Zellkontakte der cerebralen Endothelzellen ausübten. Da die Leukozyten-induzierten Änderungen der BHS-Eigenschaften (Permeabilitätsänderung) wahrscheinlich nicht auf eine reduzierte oder erhöhte Expression bestimmter *tight junction*-Proteine zurückgehen, ist zu vermuten, dass der beobachtete Effekt auf eine veränderte Interaktion (*assembly*) oder einen veränderten Phosphorylierungsstatus dieser Proteine zurückzuführen ist. Diese Möglichkeit ließe sich mittels Immunopräzipitations- und *cross-linking*-Experimenten der genannten *tight-junction*-Proteine überprüfen, die Aufschluss über das *tight junction*-Protein-*assembly* während der Neutrophilen-Interaktion gäben. Darüber hinaus könnte mit Hilfe von Studien zur Phosphorylierung bestimmter *tight junction*-assoziiertes Proteine untersucht werden, welchen Einfluss diese auf das *assembly* der *tight junctions* hat und wie sie die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke während der Neutrophilen-Interaktion beeinflusst. Zur Klärung dieser Frage bieten sich Experimente mit unbehandelten und aktivierten cerebralen Endothelzellkulturen (mit TNF- α) und/oder Co-Kultivierungen mit unterschiedlichen Leukozytensubtypen an. In Immunoblot-Analysen zeigte sich bereits, dass es durch die Inkubation der Endothelzellen mit Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:20 zu einer Dephosphorylierung des Occludins kommt. Die durchgeführten Immunfluoreszenzen ergaben, dass die Inkubation mit Neutrophilen in einer E/L-Ratio von 1:20 die Claudin-5-Expression stark beeinträchtigte, was sich jedoch in den Immunoblots quantitativ nicht bestätigen ließ. Somit sind insbesondere für dieses Protein die Immunopräzipitations- und *cross-linking*-Experimente besonders wichtig. Selbiges gilt für ZO-1.

Veränderungen der Membraneigenschaften, die einer Leukozytentransmigration möglicherweise vorangehen, setzen eine strukturelle Umgestaltung des Zytoskeletts in beiden Zelltypen voraus. Folglich könnten mit Hilfe immunzytochemischer Techniken und Immunoblot-Analysen Veränderungen in der Struktur und Zusammensetzung des Zytoskeletts beider Zelltypen zeitabhängig während der Transmigration erfasst und mit den bereits erfolgten ECIS-Messungen korreliert werden. Auf diese Weise ist es möglich zu klären, ob die beobachtete Permeabilitätsänderung, speziell die Senkung von R_b , während der Interaktion der Neutrophilen mit den Endothelzellen durch die Kontraktion des Aktomyosin-Rings in den Endothelzellen reguliert wird, an der wiederum die *tight junction*-Proteine ZO-1 und Cingulin beteiligt sind (Nusrat et al., 2000), und welche Bedeutung der Phosphorylierung der Myosin-leichten Kette bei der Regulierung des *tight junction*-Protein-Komplexes und seinem 'assembly' zukommt. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Phosphorylierung der Myosin-leichten Kette zu einer physikalischen Umstrukturierung der *tight junction*-Mikrodomänen führt (Turner, 2000).

Die ECIS-Messungen zur Endothelzell-Neutrophilen-Interaktion gaben zum einen Aufschluss über das Maß der Beeinträchtigung des Zell-Zell-Kontakts, zum anderen zeigten sie, inwiefern durch die Neutrophilen-Interaktion auch der Zell-Substrat-Kontakt (α) der cerebralen Kapillarendothelzellen beeinflusst wurde. Um die Beeinträchtigung des Zell-Substrat-Kontakts durch die Neutrophilen beurteilen zu können, ist die Leukozyten-Migration durch die subendotheliale Basallamina als von der Diapedese getrenntes Ereignis zu betrachten. Dieser Vorgang wird von molekularen Regulationsmechanismen gesteuert. So kann es trotz einer erfolgreichen Diapedese durch den Endothelzell-Monolayer zu einer Verhinderung der Migration des Leukozyten durch die Basallamina kommen (Duncan et al., 1999). Da die Mechanismen des Migrationsprozesses der Leukozyten durch die subendotheliale Basallamina weniger geklärt sind als diejenigen der Transmigration durch die Endothelzellschicht, ist eine ergänzende Untersuchung am barrierebildenden Endothel der BHS von großem Interesse. Dabei stellt die Bestimmung des Zell-Matrix-Widerstands mittels der ECIS-Analyse ein hervorragendes Instrument zur Detektion einer Veränderung des Zell-Substrat-Kontakts unter verschiedenen Versuchsbedingungen dar. So könnte z. B. eine Inhibition gegen das Leukozyten-PECAM-1, dem eine Funktion während des Migrationsprozesses durch die endotheliale Basallamina zugesprochen wird, durchgeführt werden. Da die mit dem Leukozyten-PECAM-1 interagierenden Interaktionspartner der Basallamina noch nicht bekannt sind, wäre eine entsprechende Analyse mittels Blockierungsstudien verschiedenster Komponenten der Basallamina sehr interessant. Durch eine parallel durchgeführte Analyse des Zell-Substrat-Widerstands

mit Hilfe der ECIS-Messungen könnte kontrolliert werden, ob die Leukozyten in die Basallamina eingedrungen sind.

Zur immunzytochemischen und molekularbiologischen Analyse des Migrationsprozesses durch die subendotheliale Basallamina ist es allerdings notwendig ein Endothelzell-Kultursubstrat zu wählen, das der Leukozyt durchdringen kann, so dass es nicht zu Kulturartefakten kommt. Zu diesem Zweck könnten Kultursysteme wie z. B. Filtersysteme mit ausreichend großen Filterporen oder eine fibrilläre Matrix wie z. B. Collagen-Gel mit Fibronectin-Beschichtung gewählt werden, die einen Eintritt von Leukozyten in das Substrat erlauben.

Im Kontext der Untersuchung zur Leukozyten-Migration durch die subendotheliale Basallamina im BHS-Entzündungsmodell könnten ergänzende Untersuchungen zur Funktion der Matrixmetalloproteasen (MMPs) miteinbezogen werden. MMPs werden von verschiedenen Zellen, u.a. Leukozyten, für den Durchtritt durch die Basalmembran verwendet, was als wichtiger Schritt bei der Leukozyten-Rekrutierung betrachtet wird.

Welchen Einfluss die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion auf die Sekretion spezifischer MMPs hat und welchen Effekt diese MMPs auf die Barriereeigenschaft der Blut-Hirn-Schranke haben, ist ein wichtiger Aspekt. Diesen Nachweis würden die Inaktivierung der für die Adhäsion im Entzündungsfall wichtigen Proteine L-Selektin und der $\beta 2$ -Integrine auf der Leukozytenoberfläche in Antikörper-Blockierungsexperimenten und die quantitative Bestimmung der Sekretionsrate der MMPs ermöglichen. In Kontrollexperimenten könnten die Leukozytenoberflächen-Antigene CD 45 und CD 31, die für die Interaktion mit dem Endothel unter entzündlichen Bedingungen keine Rolle spielen, Antikörper-vermittelt inaktiviert werden, um den MMP-Sekretions-Effekt als spezifisch für die Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel abzugrenzen.

Zur Transmigration ist nur eine geringe MMP-Sekretion nötig. Eine erhöhte Ausschüttung würde zur massiven Schädigung der Gewebeintegrität führen (Pugin et al., 1999). Durch eine Blockierungsstudie für L-Selektin und $\beta 2$ -Integrin könnte die Menge der ausgeschütteten MMPs bestimmt werden, um zu klären, welche MMPs in welchen Konzentrationen an der Transmigration beteiligt sind. Dabei ist besonders die Funktion von MMP-9 und MMP-2, die im Fall einer Sepsis durch neutrophile Granulozyten nach LPS- und TNF- α -Aktivierung ausgeschüttet werden, interessant (Delclaux et al., 1996). Insbesondere die MMP-9 scheint eine wichtige Rolle bei der Migration neutrophiler Granulozyten durch die Basalmembran zu spielen (Overall, 1994). Diese MMPs werden als inaktive Proenzyme sezerniert, die entweder durch Autoaktivierung oder weitere Enzyme aktiviert werden (Delclaux et al., 1996). Bisher ist noch nicht geklärt, in welchem Interaktionsstadium zwischen Leukozyten und Endothelzellen die Aktivierung der MMPs erfolgt und wie diese Aktivierung erfolgt. Eine zeitab-

hängige Entnahme des Mediumüberstands während der Endothelzell-Leukozyten-Interaktion und eine Bestimmung des MMP-Aktivitätsstatus könnte darüber Aufschluss geben.

Um vertiefende Kenntnisse darüber zu erlangen, wie bestimmte MMPs die barrierebildenden Eigenschaften der BHS während der Leukozyten-Transmigration beeinflussen, könnten selektive MMP-Inhibitoren, sog. *'tissue inhibitors of matrix metallo proteases'* (TIMPs) verwendet werden. Diesbezüglich wäre vor allem der Einsatz von TIMP-2, das eine entzündungshemmende Wirkung besitzt und MMP-2 und -9 inaktiviert interessant. Darüber hinaus könnten weitere MMP-Inhibitoren (u. a. *Tetrapeptidyl Hydroxamic Acid*), die spezifisch die Migration von neutrophilen Granulozyten inhibieren, im BHS- Endzündungszellmodell eingesetzt werden. Mit Hilfe von ECIS-Messungen könnte dabei gezeigt werden, ob es durch die Applikation der spezifischen MMP-Inhibitoren zu einer Senkung des Zell-Substrat-Widerstands während der Neutrophilen-Endothelzell-Interaktion kommt.

Relativ wenig ist über die Funktion der einzelnen Adhäsionsmoleküle und der damit assoziierten Leukozytenrekrutierung in Gehirnkapillaren bekannt. Da unterschiedliche Entzündungsstimuli in gleichen Geweben und gleiche Stimuli in verschiedenen Geweben unterschiedliche Adhäsionsmolekülprofile hervorrufen (Kubes & Ward, 2000), wäre es zur Charakterisierung des BHS-Entzündungsmodells wichtig zu überprüfen, welche der Adhäsionsproteine und ihrer entsprechenden Liganden bei der Leukozyten-Transmigration eine Rolle spielen. Zu diesem Zweck könnten Inhibitionsstudien mit blockierenden Antikörpern gegen die jeweiligen Adhäsionsmoleküle durchgeführt werden, die dem Nachweis des im BHS-Entzündungsmodell relevanten Adhäsionsmolekülprofils dienen. Diese Untersuchung könnte dann auf die verschiedenen Leukozytensubtypen (T-Helferzellen, Monozyten und B-Lymphozyten) ausgedehnt und vergleichend charakterisiert werden. Ferner wären diesbezüglich vergleichende Untersuchungen im primärkultivierten Aortenzellkultursystem der gleichen Tierart (Schwein) sinnvoll, die zur Klärung hirnspezifischer Transmigrations-Mechanismen herangezogen werden könnten.

Unklar ist beispielsweise, ob E-Selektion in der entzündungsabhängigen Leukozyten-adhäsion sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine entscheidende Rolle spielt. Während E-Selektin in der Cytokin-induzierten Meningitis am Leukozytendurchtritt wahrscheinlich beteiligt ist (Tang et al., 1996), scheint eine E-Selektin-Beteiligung bei einer bakteriellen Infektion (Munoz et al., 1997) oder der Experimentellen-Autoimmun-Enzephalitis (EAE) nicht gegeben zu sein (Engelhardt et al., 1997). Bisher gibt es nur eine begrenzte Anzahl von Studien, die sich mit der Funktion von E-Selektin in der cerebrovaskulären Entzündung beschäftigt haben. Deshalb wären Studien interessant,

die die Bedeutung von E-Selektin bei der Leukozyten-Transmigration im BHS-Entzündungskultursystem beleuchten würden.

Ebenso wie im Fall von E-Selektin ist die Bedeutung von P-Selektin für die Leukozytenadhäsion umstritten und es ist noch nicht geklärt, welche Rolle dieses Protein bei entzündlichen Prozessen im Gehirn spielt (Kanwar et al., 1995; Barkalow et al., 1996; Carvalho-Tavares et al., 1999). So könnte durch immunzytochemische Untersuchungen geprüft werden, ob die cerebralen Kapillarendothelzellen durch die Applikation eines entsprechenden Stimulus (z. B. Histamin) überhaupt P-Selektin exprimieren. Wäre dies der Fall, so würden Blockierungsstudien Aufschluss darüber geben, zu welchem Zeitpunkt der Entzündung eine P-Selektin-abhängige Leukozytenadhäsion stattfindet. Bisherige Studien gingen davon aus, dass P-Selektin nach Induktion (z. B. durch Histamin) nur für einen kurzen Zeitabschnitt von 30–60 Minuten auf der Endothelzell-Oberfläche exprimiert wird (Geng et al., 1990; Kubes & Kanwar, 1994). Neuere Untersuchungen belegen jedoch eine P-Selektin-Expression von mindestens 24 Stunden nach Stimulation mit LPS im Gehirn der Maus (Eppihimer et al., 1996), so dass neben der Rekrutierung von Leukozyten auch eine möglicherweise P-Selektin-abhängige Leukozytenadhäsion eine weitaus größere Rolle spielen könnte als zuvor angenommen. Ziel der geplanten differenziellen Blockierungsstudien für E- und P-Selektin ist die funktionelle Analyse beider Proteine für die Leukozyten-Adhäsion und Transmigration.

VCAM-1 (*v*ascular *c*ell *a*dhesion *m*olecule-1) und ICAM-1 (*i*nter*c*ellular *a*dhesion *m*olecule-1) spielen eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und möglicherweise bei der Transmigration von Leukozyten in das Gehirn (Kubes & Ward, 2000) und sind durch TNF- α induzierbar (Osborn et al., 1989). Dennoch ist bisher noch nicht geklärt, welcher der beiden Integrin-Liganden bei der Leukozyten-Transmigration eine übergeordnete Rolle übernimmt, so dass ihre Bedeutung je nach Entzündungsmodell unterschiedlich beschrieben wird (Reiss et al., 1998; Laschinger & Engelhardt, 2000). Sowohl bei Multipler Sklerose (MS) als auch bei EAE wird eine erhöhte VCAM-1-Expression beobachtet (Steffen et al., 1994; Cannella & Raine, 1995). Darüber hinaus korrelieren erhöhte Konzentrationen von löslichem VCAM-1 in Serum und Liquor mit aktiven Krankheitsschüben der MS und werden als Indikator für den Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke betrachtet (Hartung et al., 1995). Durch die Bestimmung der im BHS-Modell durch TNF- α induzierten VCAM-1-Expression auf der Endothelzell-Oberfläche und die Analyse der ins Medium abgegebenen Interferon- β -induzierten VCAM-1-Konzentration wäre es möglich, sowohl die Bedeutung von zellulärem als auch von löslichem VCAM-1 für die transendotheliale Migration unterschiedlicher Leukozytentypen zu überprüfen und mögliche Regulationsmechanismen der Transmigration zu analysieren. Dosisabhängige Effekte von membrangebundenem gegenüber löslichem VCAM-1 für die Adhäsion und Transmigrationsaktivität könnten

einerseits durch Zugabe von rekombinantem VCAM-1 oder mittels wechselseitiger Induktion durch TNF- α und IFN- β sowie durch Inhibitionsexperimente mit Hilfe spezifischer Anti-VCAM-1-Antikörper erzielt werden. Besonders wichtig sind insbesondere Blockierungsstudien gegen PECAM-1, dessen homophile Interaktion zwischen den Leukozyten und den Endothelzellen eine entscheidende Rolle bei der Diapedese zugesprochen wird (Muller, 2002).

Da diese Blockierungsstudien quantitativ zu bewerten sind, die hier verwendeten Transwell[®]-Filtersysteme jedoch einen Porendurchmesser von nur 0,4 μm aufwiesen, welcher einen Leukozyten-Durchtritt ausschließt (Leukozyten-Durchmesser: ca. 5 μm), wäre es notwendig, für die Inhibitionsstudien ein neues Kultursystem zu erarbeiten, das sowohl die Entwicklung eines hohen TERs als auch die Diapedese der Leukozyten erlaubt.

Zur funktionellen Analyse des Adhäsionsmolekül-Ligandenbindungs-abhängigen Effekts im BHS-Modell könnten sowohl TER-Filtermessungen als auch ECIS-Messungen durchgeführt werden. Um mehr über die Veränderungen des *tight junction*-Komplexes und des perijunctionalen Aktomyosin-Rings, der mit dem Komplex der festen Zell-Zell-Kontakte in Verbindung steht, zu erfahren, könnten immunzytochemische Untersuchungen durchgeführt werden. Diese Untersuchungen sind insofern wichtig, als die Adhäsionsmoleküle wie z. B. E-Selektin und ICAM-1 an das Zytoskelett gekoppelt sind, so dass sich ein *cross linking* dieser Adhäsionsmoleküle direkt in einer Senkung des TERs widerspiegelt. Die durch die Neutrophilen-Endothelzell-Interaktion hervorgerufene Permeabilitätserhöhung der Zell-Zell-Kontakte könnte durch den Nachweis einer Veränderung des Aktin-Zytoskeletts erklärt werden, welche durch die Antikörper-Bindung an das zu untersuchende Adhäsionsmolekül verursacht sein könnte.

5. Zusammenfassung

Die *tight junctions* als anatomische Grundlage der Blut-Hirn-Schranke (BHS) verwehren Entzündungszellen den ungehinderten Durchtritt in das Zentrale Nervensystem (ZNS). Ein typisches Charakteristikum vieler neurodegenerativer Erkrankungen ist eine Funktionsstörung der BHS, die zu einem massiven Eindringen von Leukozyten ins ZNS führt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die zell- und molekularbiologische Charakterisierung des Mechanismus der Leukozyten-Transmigration über die Blut-Hirn-Schranke und ihrer bis heute ungeklärten Lokalisation.

Das hier etablierte BHS-Entzündungsmodell zur Analyse der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion weist serumfreie, chemisch definierte Bedingungen auf und zeichnet sich sowohl morphologisch als auch hinsichtlich seiner Barriereigenschaften durch eine sehr hohe *in vivo*-Kompatibilität aus. Mit ihm wurde die Leukozyten-Transmigration unter entzündlichen sowie nicht-entzündlichen Bedingungen mit Hilfe morphologischer, immunzytochemischer, biochemischer und biophysikalischer Methoden charakterisiert. Die Kultur cerebraler Endothelzellen in serumhaltigem Standardmedium führt zu einer unspezifischen Entzündungsaktivierung, die mit einer Schwächung der BHS-Barrierefunktion verbunden ist. Dagegen lässt sich mit TNF- α unter chemisch definierten Bedingungen eine gezielte Entzündungsstimulierung ohne Beeinträchtigung der Barrierefunktion oder der Expression der *tight junction*-assoziierten Proteine induzieren. Dadurch gelang erstmals die Darstellung folgender Charakteristika der Neutrophilen-Diapedese unter *in vivo*-ähnlichen und gleichzeitig definierten Bedingungen: Die Endothelzell-Neutrophilen-Interaktion verursacht eine strukturelle Veränderung der Zelloberfläche beider Zelltypen und der Endothelzellgrenzen unter Ausprägung membranvesikelartiger Strukturen. Diese sind maßgeblich am Transmigrationsprozess beteiligt, indem sie während der festen Adhäsion bzw. der Transmigration des Neutrophilen mit jenen der Endothelzellen interagieren. Die Neutrophilen-Diapedese erfolgt breitflächig transzellulär und bezieht dabei die Endothelzellgrenzen mit ein. Die Endothelzelle schiebt sich während der Transmigration nicht ganz über den Neutrophilen und verliert dadurch, wie ECIS-Messungen zeigten, zu keinem Zeitpunkt ihren Zell-Substrat-Kontakt. Die interendothelialen Zell-Kontakte werden bis zu einer E/L-Ratio von 1:17 reversibel, darüber hinaus jedoch irreversibel geschwächt. Damit korrelierend wird die Expression der *tight junction*-assoziierten Proteine Claudin-5, ZO-1 und Occludin ab einer E/L-Ratio von 1:20 signifikant beeinträchtigt. Darüber hinaus verlagert sich ZO-1 von den Zellgrenzen ins Zellinnere und Occludin wird dephosphoryliert.

Die mit gleichen Methoden untersuchte transendotheliale Migration von T-Helferzellen zeigt hierfür einen vollkommen abweichenden Mechanismus.

6. Literaturverzeichnis

- Abbassi O, Kishimoto TK, McIntire LV, Anderson DC, Smith CW (1993) E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow. *J Clin Invest* 92:2719-2730.
- Abbott NJ (2000) Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell Mol Neurobiol* 20:131-147.
- Adamson P, Wilbourn B, Etienne-Manneville S, Calder V, Beraud E, Milligan G, Couraud PO, Greenwood J (2002) Lymphocyte trafficking through the blood-brain barrier is dependent on endothelial cell heterotrimeric G-protein signaling. *Faseb J* 16:1185-1194.
- Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newman PJ (1991) Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 114:1059-1068.
- Allport JR, Muller WA, Luscinskas FW (2000) Monocytes induce reversible focal changes in vascular endothelial cadherin complex during transendothelial migration under flow. *J Cell Biol* 148:203-216.
- Allport JR, Ding H, Collins T, Gerritsen ME, Luscinskas FW (1997a) Endothelial-dependent mechanisms regulate leukocyte transmigration: a process involving the proteasome and disruption of the vascular endothelial-cadherin complex at endothelial cell-to-cell junctions. *J Exp Med* 186:517-527.
- Allport JR, Ding HT, Ager A, Steeber DA, Tedder TF, Luscinskas FW (1997b) L-selectin shedding does not regulate human neutrophil attachment, rolling, or transmigration across human vascular endothelium in vitro. *J Immunol* 158:4365-4372.
- Allport JR, Lim YC, Shipley JM, Senior RM, Shapiro SD, Matsuyoshi N, Vestweber D, Luscinskas FW (2002) Neutrophils from MMP-9- or neutrophil elastase-deficient mice show no defect in transendothelial migration under flow in vitro. *J Leukoc Biol* 71:821-828.
- Allt G, Lawrenson JG (1997) Is the pial microvessel a good model for blood-brain barrier studies? *Brain Res Brain Res Rev* 24:67-76.
- Aloisi F, Ria F, Adorini L (2000) Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today* 21:141-147.
- Anderson JM (1996) Cell signalling: MAGUK magic. *Curr Biol* 6:382-384.
- Andersson PB, Perry VH, Gordon S (1991) The kinetics and morphological characteristics of the macrophage- microglial response to kainic acid-induced neuronal degeneration. *Neuroscience* 42:201-214.

- Andjelkovic AV, Pachter JS (1998) Central nervous system endothelium in neuroinflammatory, neuroinfectious, and neurodegenerative disease. *J Neurosci Res* 51:423-430.
- Ando-Akatsuka Y, Saitou M, Hirase T, Kishi M, Sakakibara A, Itoh M, Yonemura S, Furuse M, Tsukita S (1996) Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *J Cell Biol* 133:43-47.
- Anthony DC, Bolton SJ, Fearn S, Perry VH (1997) Age-related effects of interleukin-1 beta on polymorphonuclear neutrophil-dependent increases in blood-brain barrier permeability in rats. *Brain* 120:435-444.
- Aurrand-Lions M, Johnson-Leger C, Imhof BA (2002) The last molecular fortress in leukocyte trans-endothelial migration. *Nat Immunol* 3:116-118.
- Aurrand-Lions MA, Duncan L, Du Pasquier L, Imhof BA (2000) Cloning of JAM-2 and JAM-3: an emerging junctional adhesion molecular family? *Curr Top Microbiol Immunol* 251:91-98.
- Ayalon O, Sabanai H, Lampugnani MG, Dejana E, Geiger B (1994) Spatial and temporal relationships between cadherins and PECAM-1 in cell-cell junctions of human endothelial cells. *J Cell Biol* 126:247-258.
- Balda MS, Gonzalez-Mariscal L, Matter K, Cereijido M, Anderson JM (1993) Assembly of the tight junction: the role of diacylglycerol. *J Cell Biol* 123:293-302.
- Balda MS, Whitney JA, Flores C, Gonzalez S, Cereijido M, Matter K (1996) Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical- basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol* 134:1031-1049.
- Barkalow FJ, Goodman MJ, Gerritsen ME, Mayadas TN (1996) Brain endothelium lack one of two pathways of P-selectin-mediated neutrophil adhesion. *Blood* 88:4585-4593.
- Barry PA, Petroll WM, Andrews PM, Cavanagh HD, Jester JV (1995) The spatial organization of corneal endothelial cytoskeletal proteins and their relationship to the apical junctional complex. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:1115-1124.
- Bart J, Groen HJ, Hendrikse NH, van der Graaf WT, Vaalburg W, de Vries EG (2000) The blood-brain barrier and oncology: new insights into function and modulation. *Cancer Treat Rev* 26:449-462.
- Barten DM, Ruddle NH (1994) Vascular cell adhesion molecule-1 modulation by tumor necrosis factor in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 51:123-133.
- Bauer J, Bradl M, Hickley WF, Forss-Petter S, Breitschopf H, Lington C, Wekerle H, Lassmann H (1998) T-cell apoptosis in inflammatory brain lesions: destruction of T cells does not depend on antigen recognition. *Am J Pathol* 153:715-724.

- Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Mueller F, Nelboeck P, Schmid G, Bartfai T, Dejana E, Brockhaus M (2000) Homophilic interaction of junctional adhesion molecule. *J Biol Chem* 275:30970-30976.
- Bell MD, Taub DD, Perry VH (1996) Overriding the brain's intrinsic resistance to leukocyte recruitment with intraparenchymal injections of recombinant chemokines. *Neuroscience* 74:283-292.
- Berman ME, Muller WA (1995) Ligation of platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1/CD31) on monocytes and neutrophils increases binding capacity of leukocyte CR3 (CD11b/CD18). *J Immunol* 154:299-307.
- Berman ME, Xie Y, Muller WA (1996) Roles of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in natural killer cell transendothelial migration and beta 2 integrin activation. *J Immunol* 156:1515-1524.
- Betmouni S, Perry VH, Gordon JL (1996) Evidence for an early inflammatory response in the central nervous system of mice with scrapie. *Neuroscience* 74:1-5.
- Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. (1987) Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:9238-9242.
- Blum MS, Toninelli E, Anderson JM, Balda MS, Zhou J, O'Donnell L, Pardi R, Bender JR (1997) Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines. *Am J Physiol* 273:H286-294.
- Bogen S, Pak J, Garifallou M, Deng X, Muller WA (1994) Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. *J Exp Med* 179:1059-1064.
- Bolton SJ, Anthony DC, Perry VH (1998) Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood- brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience* 86:1245-1257.
- Borden P, Heller RA (1997) Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 7:159-178.
- Borregaard N, Kjeldsen L, Lollike K, Sengelov H (1995) Granules and secretory vesicles of the human neutrophil. *Clin Exp Immunol* 101 Suppl 1:6-9.
- Burns AR, Bowden RA, Abe Y, Walker DC, Simon SI, Entman ML, Smith CW (1999) P-selectin mediates neutrophil adhesion to endothelial cell borders. *J Leukoc Biol* 65:299-306.
- Burns AR, Walker DC, Brown ES, Thurmon LT, Bowden RA, Keese CR, Simon SI, Entman ML, Smith CW (1997) Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners. *J Immunol* 159:2893-2903.
- Burns AR, Bowden RA, MacDonell SD, Walker DC, Odeunmi TO, Donnachie EM, Simon SI, Entman ML, Smith CW (2000) Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration. *J Cell Sci* 113:45-57.
- Butcher EC, Picker LJ (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272:60-66.

- Butt AM, Jones HC, Abbott NJ (1990) Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol* 429:47-62.
- Cannella B, Raine CS (1995) The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 37:424-435.
- Carden D, Xiao F, Moak C, Willis BH, Robinson-Jackson S, Alexander S (1998) Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am J Physiol* 275:H385-392.
- Carpen O, Pallai P, Staunton DE, Springer TA (1992) Association of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) with actin-containing cytoskeleton and alpha-actinin. *J Cell Biol* 118:1223-1234.
- Carrithers MD, Visintin I, Kang SJ, Janeway CA, Jr. (2000) Differential adhesion molecule requirements for immune surveillance and inflammatory recruitment. *Brain* 123:1092-1101.
- Carvalho-Tavares J, Fox-Robichaud A, Kubes P (1999) Assessment of the mechanism of juxtacrine activation and adhesion of leukocytes in liver microcirculation. *Am J Physiol* 276:G828-834.
- Cassatella MA (1995) The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 16:21-26.
- Cepinskas G, Noseworthy R, Kvietys PR (1997) Transendothelial neutrophil migration. Role of neutrophil-derived proteases and relationship to transendothelial protein movement. *Circ Res* 81:618-626.
- Cepinskas G, Sandig M, Kvietys PR (1999) PAF-induced elastase-dependent neutrophil transendothelial migration is associated with the mobilization of elastase to the neutrophil surface and localization to the migrating front. *J Cell Sci* 112:1937-1945.
- Chow J, Hartley RB, Jagger C, Dilly SA (1992) ICAM-1 expression in renal disease. *J Clin Pathol* 45:880-884.
- Claude P (1978) Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol* 39:219-232.
- Claude P, Goodenough DA (1973) Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J Cell Biol* 58:390-400.
- Coates TD, Watts RG, Hartman R, Howard TH (1992) Relationship of F-actin distribution to development of polar shape in human polymorphonuclear neutrophils. *J Cell Biol* 117:765-774.
- Collares-Buzato CB, Jepson MA, Simmons NL, Hirst BH (1998) Increased tyrosine phosphorylation causes redistribution of adherens junction and tight junction proteins and perturbs paracellular barrier function in MDCK epithelia. *Eur J Cell Biol* 76:85-92.
- Cox G (1995) Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol* 154:4719-4725.

- Coxon A, Tang T, Mayadas TN (1999) Cytokine-activated endothelial cells delay neutrophil apoptosis in vitro and in vivo. A role for granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 190:923-934.
- Cserr H, Knopf P (1997) Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and immunoreactivity of the brain. In: *Immunology of the nervous system* (Keane R, Hickey W, eds), pp 134-154. New York: Oxford University Press.
- Cserr HF, Harling-Berg CJ, Knopf PM (1992) Drainage of brain extracellular fluid into blood and deep cervical lymph and its immunological significance. *Brain Pathol* 2:269-276.
- Daniel PM, Lam DK, Pratt OE (1983) Relation between the increase in the diffusional permeability of the blood-central nervous system barrier and other changes during the development of experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Neurol Sci* 60:367-376.
- Davies PF, Robotewskyj A, Griem ML (1993) Endothelial cell adhesion in real time. Measurements in vitro by tandem scanning confocal image analysis. *J Clin Invest* 91:2640-2652.
- Dehouck MP, Meresse S, Delorme P, Fruchart JC, Cecchelli R (1990) An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood- brain barrier in vitro. *J Neurochem* 54:1798-1801.
- Del Maschio A, Zanetti A, Corada M, Rival Y, Ruco L, Lampugnani MG, Dejana E (1996) Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *J Cell Biol* 135:497-510.
- Del Maschio A, De Luigi A, Martin-Padura I, Brockhaus M, Bartfai T, Fruscella P, Adorini L, Martino G, Furlan R, De Simoni MG, Dejana E (1999) Leukocyte recruitment in the cerebrospinal fluid of mice with experimental meningitis is inhibited by an antibody to junctional adhesion molecule (JAM). *J Exp Med* 190:1351-1356.
- Delclaux C, Delacourt C, D'Ortho MP, Boyer V, Lafuma C, Harf A (1996) Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14:288-295.
- Devine L, Lightman SL, Greenwood J (1996) Role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1 in lymphocyte migration across retinal pigment epithelial monolayers in vitro. *Immunology* 88:456-462.
- Dickstein JB, Moldofsky H, Hay JB (2000) Brain-blood permeability: TNF-alpha promotes escape of protein tracer from CSF to blood. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R148-151.
- Dietrich WD, Prado R, Halley M, Watson BD (1993) Microvascular and neuronal consequences of common carotid artery thrombosis and platelet embolization in rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 52:351-360.
- Duchini A, Govindarajan S, Santucci M, Zampi G, Hofman FM (1996) Effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 on fluid-phase permeability and ammonia diffusion in CNS-derived endothelial cells. *J Investig Med* 44:474-482.

- Duncan GS, Andrew DP, Takimoto H, Kaufman SA, Yoshida H, Spellberg J, Luis de la Pompa J, Elia A, Wakeham A, Karan-Tamir B, Muller WA, Senaldi G, Zukowski MM, Mak TW (1999) Genetic evidence for functional redundancy of Platelet/Endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1- dependent and PECAM-1-independent functions. *J Immunol* 162:3022-3030.
- Durieu-Trautmann O, Chaverot N, Cazaubon S, Strosberg AD, Couraud PO (1994) Intercellular adhesion molecule 1 activation induces tyrosine phosphorylation of the cytoskeleton-associated protein cortactin in brain microvessel endothelial cells. *J Biol Chem* 269:12536-12540.
- Ebnet K (1999) Immunüberwachung und Entzündung- ein komplexes Wechselspiel zwischen Leukozyten und Endothelzellen. *Biologie in unserer Zeit* 29:26-35.
- Ebnet K, Kaldjian EP, Anderson AO, Shaw S (1996) Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions. *Annu Rev Immunol* 14:155-177.
- Edens HA, Parkos CA (2000) Modulation of epithelial and endothelial paracellular permeability by leukocytes. *Adv Drug Deliv Rev* 41:315-328.
- Elmqvist JK, Breder CD, Sherin JE, Scammell TE, Hickey WF, Dewitt D, Saper CB (1997) Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. *J Comp Neurol* 381:119-129.
- Engelhardt B, Vestweber D, Hallmann R, Schulz M (1997) E- and P-selectin are not involved in the recruitment of inflammatory cells across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood* 90:4459-4472.
- Eppihimer MJ, Wolitzky B, Anderson DC, Labow MA, Granger DN (1996) Heterogeneity of expression of E- and P-selectins in vivo. *Circ Res* 79:560-569.
- Etienne-Manneville S, Manneville JB, Adamson P, Wilbourn B, Greenwood J, Couraud PO (2000) ICAM-1-coupled cytoskeletal rearrangements and transendothelial lymphocyte migration involve intracellular calcium signaling in brain endothelial cell lines. *J Immunol* 165:3375-3383.
- Fabry Z, Raine CS, Hart MN (1994) Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. *Immunol Today* 15:218-224.
- Fabry Z, Topham DJ, Fee D, Herlein J, Carlino JA, Hart MN, Sriram S (1995) TGF-beta 2 decreases migration of lymphocytes in vitro and homing of cells into the central nervous system in vivo. *J Immunol* 155:325-332.
- Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM (1998) The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 273:29745-29753.
- Faustmann PM, Dermietzel R (1985) Extravasation of polymorphonuclear leukocytes from the cerebral microvasculature. Inflammatory response induced by alpha-bungarotoxin. *Cell Tissue Res* 242:399-407.

- Feng D, Nagy JA, Pyne K, Dvorak HF, Dvorak AM (1998) Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J Exp Med* 187:903-915.
- Flugel A, Schwaiger FW, Neumann H, Medana I, Willem M, Wekerle H, Kreutzberg GW, Graeber MB (2000) Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T lymphocytes. *Brain Pathol* 10:353-364.
- Frieser M, Nockel H, Pausch F, Roder C, Hahn A, Deutzmann R, Sorokin LM (1997) Cloning of the mouse laminin alpha 4 cDNA. Expression in a subset of endothelium. *Eur J Biochem* 246:727-735.
- Fritz RB, Wang X, Zhao ML (2000) The fate of adoptively transferred quiescent encephalitogenic T cells in normal and antigen-tolerized mice. *J Neuroimmunol* 107:66-72.
- Fromter E, Diamond J (1972) Route of passive ion permeation in epithelia. *Nat New Biol* 235:9-13.
- Furie MB, Naprstek BL, Silverstein SC (1987) Migration of neutrophils across monolayers of cultured microvascular endothelial cells. An in vitro model of leucocyte extravasation. *J Cell Sci* 88:161-175.
- Furuse M, Sasaki H, Tsukita S (1999) Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol* 147:891-903.
- Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141:1539-1550.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123:1777-1788.
- Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S (1994) Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol* 127:1617-1626.
- Galdal KS, Evensen SA, Nilsen E (1983) Thrombin-induced shape changes of cultured endothelial cells: metabolic and functional observations. *Thromb Res* 32:57-66.
- Gallatin WM, Weissman IL, Butcher EC (1983) A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 304:30-34.
- Garcia JG, Verin AD, Herenyiova M, English D (1998) Adherent neutrophils activate endothelial myosin light chain kinase: role in transendothelial migration. *J Appl Physiol* 84:1817-1821.
- Gautam N, Olofsson AM, Herwald H, Iversen LF, Lundgren-Akerlund E, Hedqvist P, Arfors KE, Flodgaard H, Lindbom L (2001) Heparin-binding protein (HBP/CAP37): a missing link in neutrophil- evoked alteration of vascular permeability. *Nat Med* 7:1123-1127.

- Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, Bliss GA, Zimmerman GA, McEver RP (1990) Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 343:757-760.
- Giaever I, Keese CR (1991) Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7896-7900.
- Ginzberg H, Downey G (1999) Artifactual degradation of epithelial junctional proteins using standard fixation protocols. *Faseb J* 13.
- Ginzberg HH, Cherapanov V, Dong Q, Cantin A, McCulloch CA, Shannon PT, Downey GP (2001) Neutrophil-mediated epithelial injury during transmigration: role of elastase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281:G705-717.
- Gloor SM, Weber A, Adachi N, Frei K (1997) Interleukin-1 modulates protein tyrosine phosphatase activity and permeability of brain endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 239:804-809.
- Goetzl EJ, Banda MJ, Leppert D (1996) Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol* 156:1-4.
- Gonzalez-Mariscal L, Chavez de Ramirez B, Cerejido M (1985) Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *J Membr Biol* 86:113-125.
- Gotsch U, Borges E, Bosse R, Boggemeyer E, Simon M, Mossmann H, Vestweber D (1997) VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci* 110:583-588.
- Granger HJ, Yuan Y, Zawieja DC (1995) Ultrastructural basis of leukocyte migration through the microvascular membrane. In: *Physiology and Pathophysiology of Leukocyte Adhesion* (Granger DN, Schmid-Schönbein GW, eds), pp 185-195. New York: Oxford.
- Greenwood J, Calder VL (1993) Lymphocyte migration through cultured endothelial cell monolayers derived from the blood-retinal barrier. *Immunology* 80:401-406.
- Greenwood J, Howes R, Lightman S (1994) The blood-retinal barrier in experimental autoimmune uveoretinitis. Leukocyte interactions and functional damage. *Lab Invest* 70:39-52.
- Greenwood J, Wang Y, Calder VL (1995) Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. *Immunology* 86:408-415.
- Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D (1991) Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3460-3464.
- Hahn JH, Kim MK, Choi EY, Kim SH, Sohn HW, Ham DI, Chung DH, Kim TJ, Lee WJ, Park CK, Ree HJ, Park SH (1997) CD99 (MIC2) regulates the LFA-1/ICAM-1-mediated adhesion of lymphocytes, and its gene encodes both positive and negative regulators of cellular adhesion. *J Immunol* 159:2250-2258.
- Hammersen F, Hammersen E (1987) The ultrastructure of endothelial gap-formation and leukocyte emigration. *Prog Appl Microcirc* 12:1-34.

- Harling-Berg CJ, Park TJ, Knopf PM (1999) Role of the cervical lymphatics in the Th2-type hierarchy of CNS immune regulation. *J Neuroimmunol* 101:111-127.
- Hart DN, Fabre JW (1981) Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J Exp Med* 154:347-361.
- Hartung HP, Reiners K, Archelos JJ, Michels M, Seeldrayers P, Heidenreich F, Pflughaupt KW, Toyka KV (1995) Circulating adhesion molecules and tumor necrosis factor receptor in multiple sclerosis: correlation with magnetic resonance imaging. *Ann Neurol* 38:186-193.
- Hayashi Y, Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Yamashita J, Yamamoto H (1997) Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia* 19:13-26.
- Hecht G, Pestic L, Nikcevic G, Koutsouris A, Tripuraneni J, Lorimer DD, Nowak G, Guerriero V, Jr., Elson EL, Lanerolle PD (1996) Expression of the catalytic domain of myosin light chain kinase increases paracellular permeability. *Am J Physiol* 271:C1678-1684.
- Herren B, Levkau B, Raines EW, Ross R (1998) Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases. *Mol Biol Cell* 9:1589-1601.
- Herrmann M, Lorenz HM, Voll R, Grunke M, Woith W, Kalden JR (1994) A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acids Res* 22:5506-5507.
- Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM, Kang AH, Mainardi CL (1985) Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 260:2493-2500.
- Hickey W, Kimura H (1987) Elicitation of MHC gene products and T-Lymphocytes in the CNS of rats by graft-versus-host disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2028.
- Hickey WF (1999) Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Semin Immunol* 11:125-137.
- Hickey WF (2001) Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* 36:118-124.
- Hickey WF, Hsu BL, Kimura H (1991) T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 28:254-260.
- Hickey WF, Vass K, Lassmann H (1992) Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. *J Neuropathol Exp Neurol* 51:246-256.
- Hirase T, Staddon JM, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S, Rubin LL (1997) Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci* 110:1603-1613.

- Hixenbaugh EA, Goeckeler ZM, Papaiya NN, Wysolmerski RB, Silverstein SC, Huang AJ (1997) Stimulated neutrophils induce myosin light chain phosphorylation and isometric tension in endothelial cells. *Am J Physiol* 273:H981-988.
- Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H (2000) The neuroprotective effect of inflammation: implications for the therapy of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 107:161-166.
- Hoshi O, Ushiki T (1999) Scanning electron microscopic studies on the route of neutrophil extravasation in the mouse after exposure to the chemotactic peptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP). *Arch Histol Cytol* 62:253-260.
- Huang AJ, Furie MB, Nicholson SC, Fischbarg J, Liebovitch LS, Silverstein SC (1988) Effects of human neutrophil chemotaxis across human endothelial cell monolayers on the permeability of these monolayers to ions and macromolecules. *J Cell Physiol* 135:355-366.
- Huang AJ, Manning JE, Bandak TM, Rataou MC, Hanser KR, Silverstein SC (1993) Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells. *J Cell Biol* 120:1371-1380.
- Huber AR, Weiss SJ (1989) Disruption of the subendothelial basement membrane during neutrophil diapedesis in an in vitro construct of a blood vessel wall. *J Clin Invest* 83:1122-1136.
- Huber JD, Witt KA, Hom S, Egleton RD, Mark KS, Davis TP (2001) Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H1241-1248.
- Hughes CC, Male DK, Lantos PL (1988) Adhesion of lymphocytes to cerebral microvascular cells: effects of interferon-gamma, tumour necrosis factor and interleukin-1. *Immunology* 64:677-681.
- Hurst RD, Fritz IB (1996) Properties of an immortalised vascular endothelial/glioma cell co-culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Physiol* 167:81-88.
- Imhof BA, Dunon D (1995) Leukocyte migration and adhesion. *Adv Immunol* 58:345-416.
- Ionescu C, Cespinskas G, Savickiene J, Sandig M, Kvietys PR (2000) Disorganization of endothelial adherens junctions during PMN transendothelial migration. *Faseb J* 14.
- Isobe I, Watanabe T, Yotsuyanagi T, Hazemoto N, Yamagata K, Ueki T, Nakanishi K, Asai K, Kato T (1996) Astrocytic contributions to blood-brain barrier (BBB) formation by endothelial cells: a possible use of aortic endothelial cell for in vitro BBB model. *Neurochem Int* 28:523-533.
- Itoh M, Morita K, Tsukita S (1999a) Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J Biol Chem* 274:5981-5986.
- Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, Tsukita S (1997) Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol* 138:181-192.

- Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S (1999b) Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 147:1351-1363.
- Johnson MD, Gold LI, Moses HL (1992) Evidence for transforming growth factor-beta expression in human leptomeningeal cells and transforming growth factor-beta-like activity in human cerebrospinal fluid. *Lab Invest* 67:360-368.
- Johnson-Leger C, Aurrand-Lions M, Imhof BA (2000) The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair? *J Cell Sci* 113:921-933.
- Jou TS, Schneeberger EE, Nelson WJ (1998) Structural and functional regulation of tight junctions by RhoA and Rac1 small GTPases. *J Cell Biol* 142:101-115.
- Kachar B, Reese TS (1982) Evidence for the lipidic nature of tight junction strands. *Nature* 296:464-466.
- Kalaria RN, Hedera P (1995) Differential degeneration of the cerebral microvasculature in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 6:477-480.
- Kallmann BA, Hummel V, Lindenlaub T, Ruprecht K, Toyka KV, Rieckmann P (2000) Cytokine-induced modulation of cellular adhesion to human cerebral endothelial cells is mediated by soluble vascular cell adhesion molecule-1. *Brain* 123:687-697.
- Kanwar S, Woodman RC, Poon MC, Murohara T, Lefer AM, Davenpeck KL, Kubes P (1995) Desmopressin induces endothelial P-selectin expression and leukocyte rolling in postcapillary venules. *Blood* 86:2760-2766.
- Kida S, Weller RO, Zhang ET, Phillips MJ, Iannotti F (1995) Anatomical pathways for lymphatic drainage of the brain and their pathological significance. *Neuropathol Appl Neurobiol* 21:181-184.
- Killackey JJ, Johnston MG, Movat HZ (1986) Increased permeability of microcarrier-cultured endothelial monolayers in response to histamine and thrombin. A model for the in vitro study of increased vasopermeability. *Am J Pathol* 122:50-61.
- Kishimoto TK, Anderson DC (1992) The role of integrins in inflammation. In: *Inflammation. Basic Principles and Clinical Correlates* (Gallin J, Goldstein I, Snyderman R, eds). New York: Raven Press.
- Knopf PM, Harling-Berg CJ, Cserr HF, Basu D, Sirulnick EJ, Nolan SC, Park JT, Keir G, Thompson EJ, Hickey WF (1998) Antigen-dependent intrathecal antibody synthesis in the normal rat brain: tissue entry and local retention of antigen-specific B cells. *J Immunol* 161:692-701.
- Kostrewa D, Brockhaus M, D'Arcy A, Dale GE, Nelboeck P, Schmid G, Mueller F, Bazzoni G, Dejana E, Bartfai T, Winkler FK, Hennig M (2001) X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif. *Embo J* 20:4391-4398.
- Krane SM (1994) Clinical importance of metalloproteinases and their inhibitors. *Ann N Y Acad Sci* 732:1-10.

- Krischke M (2000) Glucocorticoid-induzierte Proteinphosphorylierung an der Blut-Hirn Schranke: Regulation der endothelialen Permeabilität. In, p 133. Münster: Institut für Biochemie, WWU Münster.
- Kubes P, Kanwar S (1994) Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. A P- selectin-mediated event. *J Immunol* 152:3570-3577.
- Kubes P, Ward PA (2000) Leukocyte recruitment and the acute inflammatory response. *Brain Pathol* 10:127-135.
- Kvietys PR, Granger DN (1997) Endothelial cell monolayers as a tool for studying microvascular pathophysiology. *Am J Physiol* 273:G1189-1199.
- Kvietys PR, Sandig M (2001) Neutrophil diapedesis: paracellular or transcellular? *News Physiol Sci* 16:15-19.
- Kwon EE, Prineas JW (1994) Blood-brain barrier abnormalities in longstanding multiple sclerosis lesions. An immunohistochemical study. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:625-636.
- Lampson L (1987) Molecular basis of the immune response to neural antigens. *Trends Neurosci* 10:211-216.
- Laposata M, Dohnansky DK, Shin HS (1983) Thrombin-induced gap formation in confluent endothelial cell monolayers in vitro. *Blood* 62:549-556.
- Larsen GL, McCarthy K, Webster RO, Henson J, Henson PM (1980) A differential effect of C5a and C5a des Arg in the induction of pulmonary inflammation. *Am J Pathol* 100:179-192.
- Laschinger M, Engelhardt B (2000) Interaction of alpha4-integrin with VCAM-1 is involved in adhesion of encephalitogenic T cell blasts to brain endothelium but not in their transendothelial migration in vitro. *J Neuroimmunol* 102:32-43.
- Lauffenburger DA, Horwitz AF (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84:359-369.
- Leach L, Eaton BM, Westcott ED, Firth JA (1995) Effect of histamine on endothelial permeability and structure and adhesion molecules of the paracellular junctions of perfused human placental microvessels. *Microvasc Res* 50:323-337.
- Lewis RE, Granger HJ (1988) Diapedesis and the permeability of venous microvessels to protein macromolecules: the impact of leukotriene B4 (LTB4). *Microvasc Res* 35:27-47.
- Lhotta K, Neumayer HP, Joannidis M, Geissler D, König P (1991) Renal expression of intercellular adhesion molecule-1 in different forms of glomerulonephritis. *Clin Sci (Lond)* 81:477-481.
- Liao F, Huynh HK, Eiroa A, Greene T, Polizzi E, Muller WA (1995) Migration of monocytes across endothelium and passage through extracellular matrix involve separate molecular domains of PECAM-1. *J Exp Med* 182:1337-1343.
- Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M, Parkos CA (2000) Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci* 113:2363-2374.

- Lo CM, Keese CR, Giaever I (1995) Impedance analysis of MDCK cells measured by electric cell-substrate impedance sensing. *Biophys J* 69:2800-2807.
- Lorenzon P, Vecile E, Nardon E, Ferrero E, Harlan JM, Tedesco F, Dobrina A (1998) Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule- 1 function as signaling receptors. *J Cell Biol* 142:1381-1391.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:266-275.
- Mackay CR, Marston WL, Dudler L (1990) Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J Exp Med* 171:801-817.
- Mackay CR, Marston W, Dudler L (1992) Altered patterns of T cell migration through lymph nodes and skin following antigen challenge. *Eur J Immunol* 22:2205-2210.
- Male D, Pryce G, Hughes C, Lantos P (1990) Lymphocyte migration into brain modelled in vitro: control by lymphocyte activation, cytokines, and antigen. *Cell Immunol* 127:1-11.
- Male D, Rahman J, Pryce G, Tamatani T, Miyasaka M (1994) Lymphocyte migration into the CNS modelled in vitro: roles of LFA-1, ICAM-1 and VLA-4. *Immunology* 81:366-372.
- Maniotis AJ, Chen CS, Ingber DE (1997) Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:849-854.
- Marano CW, Laughlin KV, Russo LM, Peralta Soler A, Mullin JM (1993) Long-term effects of tumor necrosis factor on LLC-PK1 transepithelial resistance. *J Cell Physiol* 157:519-527.
- Marchesi V, Florey H (1960) Electron micrographic observations on the emigration of leukocytes. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 45:343-347.
- Mark KS, Miller DW (1999) Increased permeability of primary cultured brain microvessel endothelial cell monolayers following TNF-alpha exposure. *Life Sci* 64:1941-1953.
- Marlin SD, Springer TA (1987) Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* 51:813-819.
- Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142:117-127.
- Masuyama K, Ochiai H, Niwayama S, Tazawa K, Fujimaki M (1987) Inhibition of experimental and spontaneous pulmonary metastasis of murine RCT (+) sarcoma by beta-cyclodextrin-benzaldehyde. *Jpn J Cancer Res* 78:705-711.
- McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, Furuse M, Tsukita S, Rogers RA, Lynch RD, Schneeberger EE (1996) Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci* 109:2287-2298.

- McGeer PL, McGeer EG (1996) Anti-inflammatory drugs in the fight against Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 777:213-220.
- Meng H, Tonnesen MG, Marchese MJ, Clark RA, Bahou WF, Gruber BL (1995) Mast cells are potent regulators of endothelial cell adhesion molecule ICAM-1 and VCAM-1 expression. *J Cell Physiol* 165:40-53.
- Messmer UK, Winkel G, Briner VA, Pfeilschifter J (2000) Suppression of apoptosis by glucocorticoids in glomerular endothelial cells: effects on proapoptotic pathways. *Br J Pharmacol* 129:1673-1683.
- Michel CC, Neal CR (1999) Openings through endothelial cells associated with increased microvascular permeability. *Microcirculation* 6:45-54.
- Migliorisi G, Folkes E, Pawlowski N, Cramer EB (1987) In vitro studies of human monocyte migration across endothelium in response to leukotriene B4 and f-Met-Leu-Phe. *Am J Pathol* 127:157-167.
- Miller DW (1999) Immunobiology of the blood-brain barrier. *J Neurovirol* 5:570-578.
- Miller MD, Krangel MS (1992) Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev Immunol* 12:17-46.
- Moll T, Dejana E, Vestweber D (1998) In vitro degradation of endothelial catenins by a neutrophil protease. *J Cell Biol* 140:403-407.
- Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S (1999a) Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* 147:185-194.
- Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S (1999b) Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:511-516.
- Morita K, Sasaki H, Fujimoto K, Furuse M, Tsukita S (1999c) Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. *J Cell Biol* 145:579-588.
- Moy AB, Shasby SS, Scott BD, Shasby DM (1993) The effect of histamine and cyclic adenosine monophosphate on myosin light chain phosphorylation in human umbilical vein endothelial cells. *J Clin Invest* 92:1198-1206.
- Moy AB, Winter M, Kamath A, Blackwell K, Reyes G, Giaever I, Keese C, Shasby DM (2000) Histamine alters endothelial barrier function at cell-cell and cell-matrix sites. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278:L888-898.
- Muller W (1999) Leukocyte-endothelial cell adhesion molecules in transendothelial migration. In: *Inflammation: Basic principles and clinical correlates* (Gallin J, Snyderman R, eds), pp 585-592. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Muller WA (2001) Migration of leukocytes across endothelial junctions: some concepts and controversies. *Microcirculation* 8:181-193.
- Muller WA (2002) Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab Invest* 82:521-533.

- Muller WA, Ratti CM, McDonnell SL, Cohn ZA (1989) A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. *J Exp Med* 170:399-414.
- Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM (1993) PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 178:449-460.
- Mullin JM, Kampherstein JA, Laughlin KV, Clarkin CE, Miller RD, Szallasi Z, Kachar B, Soler AP, Rosson D (1998) Overexpression of protein kinase C-delta increases tight junction permeability in LLC-PK1 epithelia. *Am J Physiol* 275:C544-554.
- Munoz FM, Hawkins EP, Bullard DC, Beaudet AL, Kaplan SL (1997) Host defense against systemic infection with *Streptococcus pneumoniae* is impaired in E-, P-, and E-/P-selectin-deficient mice. *J Clin Invest* 100:2099-2106.
- Murphy G, Reynolds JJ, Bretz U, Baggiolini M (1982) Partial purification of collagenase and gelatinase from human polymorphonuclear leucocytes. Analysis of their actions on soluble and insoluble collagens. *Biochem J* 203:209-221.
- Nagy Z, Peters H, Huttner I (1984) Fracture faces of cell junctions in cerebral endothelium during normal and hyperosmotic conditions. *Lab Invest* 50:313-322.
- Newman PJ (1997) The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 100:S25-29.
- Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC, 2nd, Lyman S, Paddock C, Muller WA (1990) PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247:1219-1222.
- Nicholas MK, Sagher O, Hartley JP, Stefansson K, Arnason BG (1988) A phenotypic analysis of T lymphocytes isolated from the brains of mice with allogeneic neural transplants. *Prog Brain Res* 78:249-259.
- Nielsen BS, Timshel S, Kjeldsen L, Sehested M, Pyke C, Borregaard N, Dano K (1996) 92 kDa type IV collagenase (MMP-9) is expressed in neutrophils and macrophages but not in malignant epithelial cells in human colon cancer. *Int J Cancer* 65:57-62.
- Nigam SK, Denisenko N, Rodriguez-Boulan E, Citi S (1991) The role of phosphorylation in development of tight junctions in cultured renal epithelial (MDCK) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 181:548-553.
- Nitz T (2001) Modulation der interendothelialen Permeabilität an der BHS. In: Institut für Biochemie, p 228. Münster: Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
- Nusrat A, Turner JR, Madara JL (2000) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G851-857.
- Ojakian GK (1981) Tumor promoter-induced changes in the permeability of epithelial cell tight junctions. *Cell* 23:95-103.
- Oldendorf WH, Hyman S, Braun L, Oldendorf SZ (1972) Blood-brain barrier: penetration of morphine, codeine, heroin, and methadone after carotid injection. *Science* 178:984-986.

- Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyj S, Chi-Rosso G, Lobb R (1989) Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 59:1203-1211.
- Ostermann G, Weber KS, Zerneck A, Schroder A, Weber C (2002) JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immunol* 3:151-158.
- Overall CM (1994) Regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression. *Ann N Y Acad Sci* 732:51-64.
- Ozaki ME, Coren BA, Huynh TN, Redondo DJ, Kikutani H, Webb SR (1999) CD4+ T cell responses to CD40-deficient APCs: defects in proliferation and negative selection apply only with B cells as APCs. *J Immunol* 163:5250-5256.
- Palmeri D, van Zante A, Huang CC, Hemmerich S, Rosen SD (2000) Vascular endothelial junction-associated molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is localized to intercellular boundaries of endothelial cells. *J Biol Chem* 275:19139-19145.
- Pan J, Xia L, Yao L, McEver RP (1998) Tumor necrosis factor-alpha- or lipopolysaccharide-induced expression of the murine P-selectin gene in endothelial cells involves novel kappaB sites and a variant activating transcription factor/cAMP response element. *J Biol Chem* 273:10068-10077.
- Panes J, Granger DN (1998) Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* 114:1066-1090.
- Pardridge WM (1997) Drug delivery to the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:713-731.
- Parkos CA, Colgan SP, Diamond MS, Nusrat A, Liang TW, Springer TA, Madara JL (1996) Expression and polarization of intercellular adhesion molecule-1 on human intestinal epithelia: consequences for CD11b/CD18-mediated interactions with neutrophils. *Mol Med* 2:489-505.
- Perry VH, Bell MD, Brown HC, Matyszak MK (1995) Inflammation in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 5:636-641.
- Perry VH, Anthony DC, Bolton SJ, Brown HC (1997) The blood-brain barrier and the inflammatory response. *Mol Med Today* 3:335-341.
- Pfau S, Leitenberg D, Rinder H, Smith BR, Pardi R, Bender JR (1995) Lymphocyte adhesion-dependent calcium signaling in human endothelial cells. *J Cell Biol* 128:969-978.
- Piali L, Albelda SM, Baldwin HS, Hammel P, Gisler RH, Imhof BA (1993) Murine platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)/CD31 modulates beta 2 integrins on lymphokine-activated killer cells. *Eur J Immunol* 23:2464-2471.
- Pober JS, Gimbrone MA, Jr., Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R, Springer TA (1986) Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol* 137:1893-1896.

- Poggi A, Panzeri MC, Moretta L, Zocchi MR (1996) CD31-triggered rearrangement of the actin cytoskeleton in human natural killer cells. *Eur J Immunol* 26:817-824.
- Polunovsky VA, Wendt CH, Ingbar DH, Peterson MS, Bitterman PB (1994) Induction of endothelial cell apoptosis by TNF alpha: modulation by inhibitors of protein synthesis. *Exp Cell Res* 214:584-594.
- Pouyani T, Seed B (1995) PSGL-1 recognition of P-selectin is controlled by a tyrosine sulfation consensus at the PSGL-1 amino terminus. *Cell* 83:333-343.
- Powell DW (1981) Barrier function of epithelia. *Am J Physiol* 241:G275-288.
- Pratt J, Rataud J, Bardot F, Roux M, Blanchard JC, Laduron PM, Stutzmann JM (1992) Neuroprotective actions of riluzole in rodent models of global and focal cerebral ischaemia. *Neurosci Lett* 140:225-230.
- Pryce G, Male D, Campbell I, Greenwood J (1997) Factors controlling T-cell migration across rat cerebral endothelium in vitro. *J Neuroimmunol* 75:84-94.
- Pugin J, Widmer MC, Kossodo S, Liang CM, Preas HLn, Suffredini AF (1999) Human neutrophils secrete gelatinase B in vitro and in vivo in response to endotoxin and proinflammatory mediators. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:458-464.
- Qing Z, Sewell D, Sandor M, Fabry Z (2000) Antigen-specific T cell trafficking into the central nervous system. *J Neuroimmunol* 105:169-178.
- Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA (1998) Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282:480-483.
- Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA (1999) Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 11:753-761.
- Rapport MD, DuPaul GJ, Smith NF (1985) Rate-dependency and hyperactivity: methylphenidate effects on operant responding. *Pharmacol Biochem Behav* 23:77-83.
- Raub TJ, Kuentzel SL, Sawada GA (1992) Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells in vitro: barrier tightening by a factor released from astrogloma cells. *Exp Cell Res* 199:330-340.
- Reiss Y, Hoch G, Deutsch U, Engelhardt B (1998) T cell interaction with ICAM-1-deficient endothelium in vitro: essential role for ICAM-1 and ICAM-2 in transendothelial migration of T cells. *Eur J Immunol* 28:3086-3099.
- Rist RJ, Romero IA, Chan MW, Couraud PO, Roux F, Abbott NJ (1997) F-actin cytoskeleton and sucrose permeability of immortalised rat brain microvascular endothelial cell monolayers: effects of cyclic AMP and astrocytic factors. *Brain Res* 768:10-18.
- Rubin LL, Staddon JM (1999) The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 22:11-28.

- Rubin LL, Barbu K, Bard F, Cannon C, Hall DE, Horner H, Janatpour M, Liaw C, Manning K, Morales J, et al. (1991a) Differentiation of brain endothelial cells in cell culture. *Ann N Y Acad Sci* 633:420-425.
- Rubin LL, Hall DE, Porter S, Barbu K, Cannon C, Horner HC, Janatpour M, Liaw CW, Manning K, Morales J, et al. (1991b) A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol* 115:1725-1735.
- Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Inazawa J, Fujimoto K, Tsukita S (1997) Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution. *Eur J Cell Biol* 73:222-231.
- Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Tsukita S (1997) Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol* 137:1393-1401.
- Sako D, Comess KM, Barone KM, Camphausen RT, Cumming DA, Shaw GD (1995) A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding. *Cell* 83:323-331.
- Sanchez-Madrid F, del Pozo MA (1999) Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *Embo J* 18:501-511.
- Sandig M, Negrou E, Rogers KA (1997) Changes in the distribution of LFA-1, catenins, and F-actin during transendothelial migration of monocytes in culture. *J Cell Sci* 110:2807-2818.
- Saunders NR, Dziegielewska KM, Møllgaard K (1991) The importance of the blood-brain barrier in fetuses and embryos. *Trends Neurosci* 14:14-15.
- Schenkel AR, Mamdouh Z, Chen X, Liebman RM, Muller WA (2002) CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat Immunol* 3:143-150.
- Schmid-Schonbein GW, Kosawada T, Skalak R, Chien S (1995) Membrane model of endothelial cells and leukocytes. A proposal for the origin of a cortical stress. *J Biomech Eng* 117:171-178.
- Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, Bode H, Epple HJ, Riecken EO, Schulzke JD (1999) Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci* 112:137-146.
- Schneeberger EE, Lynch RD (1992) Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol* 262:L647-661.
- Schwartz M, Cohen I (2000) Autoimmunity can benefit self maintenance. *Immunol Today* 21:265-268.
- Sengelov H, Follin P, Kjeldsen L, Løllike K, Dahlgren C, Borregaard N (1995) Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *J Immunol* 154:4157-4165.

- Shaw SK, Bamba PS, Perkins BN, Lusinskas FW (2001) Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J Immunol* 167:2323-2330.
- Simionescu M, Simionescu N, Palade GE (1976) Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. Arteries and veins. *J Cell Biol* 68:705-723.
- Singer KL, Stevenson BR, Woo PL, Firestone GL (1994) Relationship of serine/threonine phosphorylation/dephosphorylation signaling to glucocorticoid regulation of tight junction permeability and ZO-1 distribution in nontransformed mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 269:16108-16115.
- Sixt M, Engelhardt B, Pausch F, Hallmann R, Wendler O, Sorokin LM (2001) Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Cell Biol* 153:933-946.
- Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC (1989) Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest* 83:2008-2017.
- Sorensen TL, Ransohoff RM (1998) Etiology and pathogenesis of multiple sclerosis. *Semin Neurol* 18:287-294.
- Sorokin EL, Smoliakova GP (1997) [Structural and functional disorders of transcapillary metabolism of retina in patients with diabetic retinopathy]. *Vestn Oftalmol* 113:16-19.
- Sorokin SP, McNelly NA, Hoyt RF, Jr. (1994) Exogenous cytokines enhance survival of macrophages from organ cultured embryonic rat tissues. *Anat Rec* 240:398-406.
- Springer TA (1995) Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 57:827-872.
- Staddon JM, Rubin LL (1996) Cell adhesion, cell junctions and the blood-brain barrier. *Curr Opin Neurobiol* 6:622-627.
- Staddon JM, Herrenknecht K, Smales C, Rubin LL (1995) Evidence that tyrosine phosphorylation may increase tight junction permeability. *J Cell Sci* 108:609-619.
- Staehein LA (1973) Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J Cell Sci* 13:763-786.
- Stanness KA, Westrum LE, Fornaciari E, Mascagni P, Nelson JA, Stenglein SG, Myers T, Janigro D (1997) Morphological and functional characterization of an in vitro blood-brain barrier model. *Brain Res* 771:329-342.
- Steffen BJ, Butcher EC, Engelhardt B (1994) Evidence for involvement of ICAM-1 and VCAM-1 in lymphocyte interaction with endothelium in experimental autoimmune encephalomyelitis in the central nervous system in the SJL/J mouse. *Am J Pathol* 145:189-201.

- Stevenson BR, Goodenough DA (1984) Zonulae occludentes in junctional complex-enriched fractions from mouse liver: preliminary morphological and biochemical characterization. *J Cell Biol* 98:1209-1221.
- Stevenson BR, Anderson JM, Bullivant S (1988a) The epithelial tight junction: structure, function and preliminary biochemical characterization. *Mol Cell Biochem* 83:129-145.
- Stevenson BR, Anderson JM, Goodenough DA, Mooseker MS (1988b) Tight junction structure and ZO-1 content are identical in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance. *J Cell Biol* 107:2401-2408.
- Stevenson BR, Anderson JM, Braun ID, Mooseker MS (1989) Phosphorylation of the tight-junction protein ZO-1 in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance. *Biochem J* 263:597-599.
- Su WH, Chen HI, Huang JP, Jen CJ (2000) Endothelial $[Ca^{2+}]_i$ signaling during transmigration of polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 96:3816-3822.
- Sun J, Williams J, Yan HC, Amin KM, Albelda SM, DeLisser HM (1996a) Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) homophilic adhesion is mediated by immunoglobulin-like domains 1 and 2 and depends on the cytoplasmic domain and the level of surface expression. *J Biol Chem* 271:18561-18570.
- Sun QH, DeLisser HM, Zukowski MM, Paddock C, Albelda SM, Newman PJ (1996b) Individually distinct Ig homology domains in PECAM-1 regulate homophilic binding and modulate receptor affinity. *J Biol Chem* 271:11090-11098.
- Sun QH, Paddock C, Visentin GP, Zukowski MM, Muller WA, Newman PJ (1998) Cell surface glycosaminoglycans do not serve as ligands for PECAM-1. PECAM-1 is not a heparin-binding protein. *J Biol Chem* 273:11483-11490.
- Suvannavejh GC, Dal Canto MC, Matis LA, Miller SD (2000) Fas-mediated apoptosis in clinical remissions of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 105:223-231.
- Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S (1993) T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature* 361:79-82.
- Tang T, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD, Mayadas TN (1996) Cytokine-induced meningitis is dramatically attenuated in mice deficient in endothelial selectins. *J Clin Invest* 97:2485-2490.
- Taylor AW, Streilein JW (1996) Inhibition of antigen-stimulated effector T cells by human cerebrospinal fluid. *Neuroimmunomodulation* 3:112-118.
- Tewes B, Franke H., Hellwig S., Hoheisel D., Decker S., Griesche D., Tilling T., Wegener J., H.-J. G (1997) Preparation of endothelial cells in primary cultures obtained from the brains of 6 month old pigs. In: *Drug transport across the blood brain Barrier* (G. dBA, ed), pp 91-98. Amsterdam: Sutano W.

- Tinsley JH, Wu MH, Ma W, Taulman AC, Yuan SY (1999) Activated neutrophils induce hyperpermeability and phosphorylation of adherens junction proteins in coronary venular endothelial cells. *J Biol Chem* 274:24930-24934.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7919-7923.
- Tsukita S, Furuse M (1999) Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol* 9:268-273.
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:285-293.
- Tuomanen E (1994) Susceptibility to infection and age-related changes in the blood-brain barrier. *Neurobiol Aging* 15:757-758; discussion 769.
- Turner JR (2000) 'Putting the squeeze' on the tight junction: understanding cytoskeletal regulation. *Semin Cell Dev Biol* 11:301-308.
- Vestweber D, Blanks JE (1999) Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 79:181-213.
- Wachtel M, Frei K, Ehler E, Fontana A, Winterhalter K, Gloor SM (1999) Occludin proteolysis and increased permeability in endothelial cells through tyrosine phosphatase inhibition. *J Cell Sci* 112:4347-4356.
- Wakelin MW, Sanz MJ, Dewar A, Albelda SM, Larkin SW, Boughton-Smith N, Williams TJ, Nourshargh S (1996) An anti-platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 antibody inhibits leukocyte extravasation from mesenteric microvessels in vivo by blocking the passage through the basement membrane. *J Exp Med* 184:229-239.
- Walker DC, MacKenzie A, Hosford S (1994) The structure of the tricellular region of endothelial tight junctions of pulmonary capillaries analyzed by freeze-fracture. *Microvasc Res* 48:259-281.
- Wang N, Butler JP, Ingber DE (1993a) Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 260:1124-1127.
- Wang YF, Calder VL, Greenwood J, Lightman SL (1993b) Lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells of the blood-retinal barrier. *J Neuroimmunol* 48:161-168.
- Watson SR, Fennie C, Lasky LA (1991) Neutrophil influx into an inflammatory site inhibited by a soluble homing receptor-IgG chimaera. *Nature* 349:164-167.
- Wedmore CV, Williams TJ (1981) Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. *Nature* 289:646-650.
- Wegener J, Galla H-J (1996) The role of non-lamellar lipid structures in the formation of tight junctions. *Chem Phys Lip* 81:229-255.
- Wegener J, Sieber M, Galla HJ (1996) Impedance analysis of epithelial and endothelial cell monolayers cultured on gold surfaces. *J Biochem Biophys Methods* 32:151-170.

- Wegener J, Seebach J, Janshoff A, Galla HJ (2000) Analysis of the composite response of shear wave resonators to the attachment of mammalian cells. *Biophys J* 78:2821-2833.
- Weiss JM, Berman JW (1998) Astrocyte expression of monocyte chemoattractant protein-1 is differentially regulated by transforming growth factor beta. *J Neuroimmunol* 91:190-197.
- Wekerle H (1993) Lymphocyte Traffic to the Brain. In: *The Blood-Brain-Barrier*, Partridge, Raven Press, New York, pp 67-85.
- Wekerle H, Schwab M, Linington C, Meyermann R (1986) Antigen presentation in the peripheral nervous system: Schwann cells present endogenous myelin autoantigens to lymphocytes. *Eur J Immunol* 16:1551-1557.
- Werth DK, Niedel JE, Pastan I (1983) Vinculin, a cytoskeletal substrate of protein kinase C. *J Biol Chem* 258:11423-11426.
- Williams AE, Ryder S, Blakemore WF (1995) Monocyte recruitment into the scrapie-affected brain. *Acta Neuropathol* 90:164-169.
- Williamson J, Grisham J (1961) Electron microscopy of leukocytes margination and emigration in acute inflammation in dog pancreas. *Am J Pathol* 39:239-256.
- Willott E, Balda MS, Heintzelman M, Jameson B, Anderson JM (1992) Localization and differential expression of two isoforms of the tight junction protein ZO-1. *Am J Physiol* 262:C1119-1124.
- Wojciak-Stothard B, Entwistle A, Garg R, Ridley AJ (1998) Regulation of TNF-alpha-induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 176:150-165.
- Wolburg H, Neuhaus J, Kniessel U, Krauss B, Schmid EM, Ocalan M, Farrell C, Risau W (1994) Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci* 107:1347-1357.
- Wolosewick JJ (1984) Distribution of actin in migrating leukocytes in vivo. *Cell Tissue Res* 236:517-525.
- Wong D, Prameya R, Dorovini-Zis K (1999) In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM-1. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:138-152.
- Wong V, Gumbiner BM (1997) A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *J Cell Biol* 136:399-409.
- Wu NZ, Baldwin AL (1992) Transient venular permeability increase and endothelial gap formation induced by histamine. *Am J Physiol* 262:H1238-1247.
- Yamasaki H, Enomoto T, Martel N, Shiba Y, Kanno Y (1983) Tumour promoter-mediated reversible inhibition of cell-cell communication (electrical coupling). Relationship

with phorbol ester binding and de novo macromolecule synthesis. *Exp Cell Res* 146:297-308.

Yao L, Pan J, Setiadi H, Patel KD, McEver RP (1996) Interleukin 4 or oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells. *J Exp Med* 184:81-92.

Yeager MP, DeLeo JA, Hoopes PJ, Hartov A, Hildebrandt L, Hickey WF (2000) Trauma and inflammation modulate lymphocyte localization in vivo: quantitation of tissue entry and retention using indium-111-labeled lymphocytes. *Crit Care Med* 28:1477-1482.

Yee AG, Revel JP (1975) Endothelial cell junctions. *J Cell Biol* 66:200-204.

Yi ES, Ulich TR (1992) Endotoxin, interleukin-1, and tumor necrosis factor cause neutrophil-dependent microvascular leakage in postcapillary venules. *Am J Pathol* 140:659-663.

Yoshida M, Westlin WF, Wang N, Ingber DE, Rosenzweig A, Resnick N, Gimbrone MA, Jr. (1996) Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E-selectin linkage to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 133:445-455.

Yoshida N, Cepinskas G, Granger DN, Anderson DC, Wolf RE, Kvietys PR (1995) Aspirin-induced, neutrophil-mediated injury to vascular endothelium. *Inflammation* 19:297-312.

7. Anhang

7.1 Materialien

7.1.1 Chemikalien, Substanzen und Antikörper

7.1.1.1 Allgemeine Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Serva, Heidelberg
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Aqua-Poly/Mount [®]	Polysciences, Warrington (USA)
<i>Biotinylated SDS molecular weight standards</i>	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
BSA	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Bichinolinsäure (Di Natriumsalz)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Bis-N- Methylenebisacrylamid	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
CaCl ₂ x 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Cacodylat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
CO ₂	Westfalen-AG, Münster
Complete [™] , Mini, EDTA-free	Roche, Mannheim
Coomassie <i>Brillant Blue</i> R 250	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Cycloheximid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
DDSA (Dodecylanhydratsuccinat)	Boehringer Ingelheim, Heidelberg
DMP-30	Boehringer Ingelheim, Heidelberg
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DTT	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
ECL [®]	Amersham Pharmacia, Freiburg
EDTA	Fluka, Neu-Ulm
Essigsäure p. a.	Riedel de Haen, Seelze
Ethanol (techn., absolut., reinst)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Folin-Ciocalteus Reagenz	Merck, Darmstadt
Formaldehyd 36,5 %	Riedel de Haen, Seelze
Gelatine Typ A	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Glutardialdehyd 50 %	Merck, Darmstadt

Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycidether 100 (Epon 812)	Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Glycin	Boehringer Ingelheim, Heidelberg
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
HCL p. a. mind. 37 %	Janssen Chinica, Geel (Belgien)
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
<i>High molecular weight marker (HMW)</i>	<i>Pharmacia, Freiburg</i>
Il-1 β , human aus <i>E. coli</i>	Cell Concepts, Umkirch
Isopropanol	Merck, Darmstadt
<i>Low molecular weight marker (LMW)</i>	<i>Pharmacia, Freiburg</i>
LPS aus <i>E. coli</i> (serotype)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Methylenadicanhydrid (MNA)	Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Mannit	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
K-Na-Tartrat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	Fluka, Buchs (CH)
Na ₂ CO ₃	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
NaOH	Merck, Darmstadt
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Nonidet P-40	Fluka, Neu-Ulm
OsO ₄	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Ponceau S	Fluka, Neu-Ulm
<i>Prestained SDS molecular weight markes</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim</i>
Propylenoxid	Merck, Darmstadt
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
RNase A	Boehringer, Mannheim
Saccharose (Sucrose)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
SDS	Serva, Heidelberg

TCA	Merck, Darmstadt
TNF- α , human aus <i>E. coli</i>	Cell Concepts, Umkirch
Tris	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Biochrom KG, Berlin
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

7.1.1.2 Kits

<i>Cell Proliferation ELISA</i> [®] , BrdU	<i>Roche, Mannheim</i>
CELLection [™] Pan Mouse IgG Kit	Dynal, Hamburg
CaspACE [™] Assay System	Promega, Heidelberg
Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}	Roche, Mannheim

7.1.1.3 Antikörper

Erst-Antikörper

Antikörper	Immunogen	Konzentration	Konzentration (Western-Blot)	Konzentration (Immunfluoreszenz)	Hergestellt in	Firma
ZO-1	69 kD Fusionsprotein, das den Aminosäuren 463-1109 der humanen cDNA entspricht	100 µg/ 400µl	1 µg/ml	-	Polyclonal/ Kaninchen	Zymed
ZO-1	<i>Tight junction</i> - Fraktion aus Mäuseleber isoliert	200 µg/ 100µl	-	2 µg/ml	Monoclonal / Ratte	Chemicon
Occludin	GST-Fusionsprotein: Fusion des GST mit dem C-Terminus von humanem Occludin	100 µg/ 400µl	2 µg/ml	5 µg/ml	Polyclonal / Kaninchen	Zymed
Claudin-5	Synthetisches Peptid der C-terminalen Sequenz des Claudin-5 der Maus	100 µg/ 400µl	2 µg/ml	5 µg/ml	Polyclonal / Kaninchen	Zymed
Vimentin	Klon V-9 durch Immunisierung von BALB/c Mäusen mit Schweine-Vimentin u. Fusion v. Milzzellen mit PAI-Maus Myelomazellen	100 µg/ 1000µl	1 µg/ml	-	Monoclonal / Maus	Oncogene
E/P-Selektin	Aktivierte HUVECs	100 µg/ 1000µl	-	1 µg/ml	Monoclonal / Maus	R & D Systems
CD4a	Reagiert mit dem CD4, ein Antigen das auf T-lymphozyten exprimiert wird	100 µg/ 1000µl Einsatz: 2 µg/ml	-	-	Monoclonal/ Maus	BD Pharmingen

Zweit-Antikörper

Antikörper	Markierung	Konzentration	Konzentration (Western-Blot)	Konzentration (Immunfluoreszenz)	Firma
Anti-Kaninchen	POD	500µl /ml	800 ng/ml	-	Boehringer Mannheim
Anti-Ratte	POD	400µl /ml	400 ng/ml	-	Santa Cruz
Anti-Maus	POD	400µl /ml	400 ng/ml	-	DAKOd
Ziege-Anti-Ratte-IgG	Alexa-Fluor® 488 (rot) Alexa-Fluor® 568 (grün)	2 mg/ml	-	2 µg/ml	Mobitec
Ziege-Anti-Maus-IgG	Alexa-Fluor® 488 (rot) Alexa-Fluor® 568 (grün)	2 mg/ml	-	2 µg/ml	Mobitec
Ziege-Anti-Kaninchen-IgG	Alexa-Fluor® 568 (grün)	2 mg/ml	-	2 µg/ml	Mobitec

POD: Peroxidase

7.1.1.4 Zellkultur

BSA (<i>essentially fatty acid free</i>)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Collagenase/Dispase aus <i>Vibrio alginolyticus/Bacillus polymyxa</i>	Boehringer, Mannheim
Collagen G (3mg/ml)	Biochrom KG, Berlin
Dextran aus <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , 148.000g/mol	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Dispase II aus <i>Bacillus polymyxa</i>	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
DMEM-F12 (mit L-Glutamin und 15mM HEPES)	Cell Concepts GmbH, Umkirch
Earle's Medium 199 (10 X) mit 8mg/l Phenolrot	Biochrom KG, Berlin
Earle's Medium 199 (1 X) mit 8mg/l Phenolrot	Biochrom KG, Berlin
Earle's Salt Solution (10X) Phenolrot	Biochrom KG, Berlin
<i>Endothelial cell growth factors</i> (100 x)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Fötales Kälberserum	Gibco, Eggenstein
HANK's	Biochrom KG, Berlin
Gelatine	Fluka, Neu-Ulm
Gentamycin (10mg/ml)	Biochrom KG, Berlin
<i>Human Endothelial SFM</i>	Gibco, Eggenstein
<i>Human Plasma Fibronectin</i>	Gibco, Eggenstein
Hydrocortison	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
L-Glutamin (200mM)	Biochrom KG, Berlin
M 199 Earle (1X) mit Phenolrot und 2,2g/l NaHCO ₃	Biochrom KG, Berlin
MAM-PF2, <i>protein free medium</i>	Biozol, München
Nutridoma HU	Roche, Mannheim
Ochseneserum	PAA, Linz (A)
Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml; 10mg/ml)	Biochrom KG, Berlin
Percoll	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
<i>Serum Replacement 2</i> (50X) (SR 2)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Trypsin, 0,25% (w/v) in PBS	Biochrom KG, Berlin

7.1.2 Verbrauchsmaterialien

12-well-Gewebekulturplatte	Costar, Bodenheim
24-well-Gewebekulturplatte	Costar, Bodenheim
Einwegspritzen (5 und 20 ml)	Henke-Sass, Tuttlingen
Einbettform (TEM)	Plano, Marburg
Aluminiumfolie Qualität S	Roth GmbH, Karlsruhe
Deckgläser (18 x 18 mm)	Roth GmbH, Karlsruhe
Fimlplatten	Kodak, Köln
Filme, APX 100, Rollfilme (s/w)	Agfa, Leberkusen
Glasobjektträger	Nunc, Wiesbaden
Greiner Röhrchen (10 und 50ml)	Greiner, Frickenhausen
Kulturflaschen (175, 75 und 25cm ²)	Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich
Kanülen (20, 21, 23, 24 G	Fischer, Frankfurt
Kryoröhrchen 1,8 ml	Nunc, Wiesbaden
Kulturflaschen (24 cm ² , 75 cm ² , 190 cm ²)	Nunc, Wiesbaden
Kupfernetze (<i>grids</i>) für TEM	Plano, Marburg
Latexhandschuhe (puderfrei)	Roth GmbH, Karsruhe
Leit-Tabs [®]	Plano, Marburg
Nitrocellulose-Membran (Hybond ECL)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Nylongaze	ZBF, Zürich (CH)
Objektträger (76 x 26 mm)	Servopax, Hamburg
Petrischalen (94/16 mm u. 35/ 10 mm)	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Ratiolab GmbH, Dreieich
Reaktionsgefäße (1,5 und 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Skalpelle	Bayha, Tuttlingen
Spritzen (5 und 10ml)	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Sterilfilter (Ø 12mm, Porengröße 0,2 µm)	Satorius, Göttingen
Transwell [®] -Filterplatte (0,4 µm Poren, Ø 12mm; 8 µm Poren, Ø 8mm)	Costar, Bodenheim
<i>Whatman</i> -Papier No. 3	Whatman, Maidstore UK
Zellschaber	Costar GmbH, Bodenheim
Zentrifugenbecher (250 ml)	Beckmann, München
Zentrifugen-Röhrchen (12 ml / 50 ml)	Greiner, Solingen

7.1.3 Geräte

Autoklav, 3870, Tuttnauer	Eppendorf, Hamburg
Autoradiographie-Kassetten	Oncor, Appligene, Gaithersburg
Brutschränke:	
BB 6220 CU	Heraeus, Hanau
IG 150	Jouan, Unterhaching
IR 1500	Flow, Meckenheim
Bunsenbrenner: Fireboy	Tecnomare, Fernwald
Bunsenbrenner: Fireboy plus	Integra Biosciences, Fernwald
Dounce-Homogenisator	Poly Lab, Strasbourg
Filmentwickler, AGFA Curix 60	AGFA AG, Leverkusen
Flachbettscanner, Desk Scan II	Hewlett Packard, Palo Alto (USA)
Fluoreszenz-Küvette, Quarzglas	Hellma, Mühlheim
Fotokamera Nikon F-301	Nikon, Tokio (Japan)
Impedanzanalysator SI-1260	Solartron Instruments
Kühlzentrifuge	
J2-21 mit Rotor JA-14	Beckmann, München
Typ 3k-1	Sigma, Deisenhofen
Kontrastiergerät Leica EM Stain	Leica, Heidelberg
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	Leica, Heidelberg
TCS SC und TCS SP2 mit Leica	
Software LCS	
Kritisch-Punkt-Trocknungs-Apparatur	Blalzers-Union, Wesbaden
CPD 020	
Lumineszenz Spektrometer Typ LS 50 B	Perkin-Elmer, Überlingen
Messkammern für IS	Dr. J. Wegener, WWU Münster
Rasterelektronenmikroskop Hitachi 530	Hitachi, Japan
Spektrophotometer Uvikon 922	Kontron, Neufahrn
Transmissionselektronenmikroskop	Zeiss, Oberkochen
EM 109	
Trimmvorrichtung 475057	Zeiss, Oberkochen
Ultramikrotom, Ultracut E	Reichert Jung, Nussloch
Zählkammer nach Bürker	Fischer, Frankfurt

8. Abbildungsverzeichnis

1.1 Darstellung der Adhäsionskaskade und ihrer beteiligten molekularen Interaktionspartner.	13
1.2 Darstellung der Interaktionspartner des Leukozyten mit dem Endothel während des sog. 'Rollens'.	14
1.3 Darstellung des strukturellen Aufbaus der drei Selektine (L-, E- und P-Selektin), sowie ihrer Rezeptor-Bindung	15
1.4 Die Interaktion der Leukozyten-Integrine mit ihren entsprechenden Rezeptoren auf der Endothelzell-Oberfläche während der festen Adhäsion.	19
1.5 Darstellung der aktuellen Erkenntnisse der molekularen Mechanismen der transendothelialen Leukozyten-Migration (Stand Februar 2002).	27
2.1 RFI als Funktion der AMC-Konzentration. Kalibration zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität (Mittelwerte, n=3)	63
2.2 Ersatzschaltbild einer Endothelzellschicht nach Powell (1981).	70
2.3 Darstellung der Impedanz Z in einer Gaussschen Zahlenebene.	72
2.4 Schematische Darstellung der Meßkammer zur Bestimmung des TERs.	73
2.5 Ersatzschaltbild zur Datenanalyse der Impedanzmessungen.	74
2.6 Impedanzspektrum einer Monoschicht cerebraler Kapillarendothelzelle, kultiviert auf einem Transwell [®] -Filter.	75
2.7 Grundlegendes Prinzip des ECIS-Verfahrens.	76
2.8 Schematische Darstellung des Stromflusses durch eine auf einer Goldelektrode adhärenzte Zellschicht.	77
2.9 Schematische Darstellung des Modells von (Giaever and Keese, 1991) zur Auswertung der Impedanzspektren von zellbewachsenen Goldelektroden.	78
2.10 Typisches Impedanzspektrum einer mit PBCEC bewachsenen ECIS-Goldelektrode.	79
2.11 A: Schematische Darstellung der Ersatzschaltung einer Zellschicht auf Goldelektroden basierend auf dem Modell von Giaever und Keese (1991).	80
2.11 B: Elektrochemisches System: Zellen auf einer planaren Goldoberfläche umgeben von Elektrolytlösung.	80
2.12 Schematische und reelle Darstellung einer Goldelektrode in der Aufsicht und in der Seitenansicht.	81
2.13 Schematischer Messaufbau des ECIS-Experiments.	82
3.1 Der Einfluss unterschiedlicher Kulturmedien auf den TER der PBCEC.	85
3.2 Der Einfluss der Hydrocortison-Konzentration auf den TER der BHS in vitro.	86

3.3 Der Einfluss der Hydrocortisonkonzentration auf den TER der BHS in vitro im zeitlichen Verlauf.	87
3.4 Der Einfluss des Transwell®-Filtertyps auf den TER der PBCEC.	88
3.5 Der Einfluss des Hydrocortisons auf die ECIS-Parameter R_b , α und C_m der PBCEC.	90
3.6 Der polare Einfluss von Serum auf den TER der PBCEC.	92
3.7 Der polare Einfluss von hitzeinaktiviertem Serum auf den TER der PBCEC.	94
3.8 Der Einfluss des Serums auf die ECIS-Parameter R_b , α und C_m der PBCEC.	95
3.9 Vergleichende ultrastrukturelle Untersuchung der PBCEC	96
3.10 Vergleichende REM-Untersuchung der PBCEC mit Endothelzellen peripherer Gefäße in situ.	97
3.11 Vergleichende REM-Untersuchung der PBCEC unter verschiedenen Kulturbedingungen.	98
3.12 Der polare Einfluss von Serum und Hydrocortison auf die Morphologie der PBCEC.	100
3.13 Immunzytochemische Analyse der tight junction-assoziierten Proteine ZO-1 (in rot) und Claudin-5 (in grün) der PBCEC unter verschiedenen Kulturbedingungen.	102
3.14 Immunzytochemische Analyse des tight junction-assoziierten Proteins Occludin der PBCEC unter verschiedenen Kulturbedingungen.	103
3.15 Der polare Einfluss des Serums auf die ZO-1-Expression der PBCEC.	104
3.16 Der polare Einfluss des Serums auf die Claudin-5-Expression der PBCEC.	105
3.17 Der polare Einfluss des Serums auf die Occludin-Expression der PBCEC.	106
3.18 Relative DNA-Fragmentierung der PBCEC unter verschiedenen Kulturbedingungen.	108
3.19 Relative Caspase-3-Aktivität der PBCEC unter verschiedenen Kulturbedingungen.	109
3.20 Bestimmung der relativen Caspase-3-Aktivität der PBCEC unter verschiedenen Hydrocortison-Konzentrationen bzw. Serumzusatz im CDM.	110
3.21 Bestimmung der relativen Caspase-3-Aktivität der PBCEC nach 0-, 3-, 10-, 13- und 16-stündiger Inkubation mit CHX.	111
3.22 Bestimmung der relativen Caspase-3-Aktivität (A) und der relativen DNA-Fragmentierung (B) der PBCEC nach 16-stündiger Inkubation mit CHX unter verschiedenen Kulturbedingungen.	112
3.23 Typischer Verlauf der Parameter R_b und α der in CDM ohne HC-Zusatz kultivierten PBCEC nach CHX-Zugabe.	114
3.24 Typischer Verlauf der Parameter R_b und α der in CDM mit OS kultivierten PBCEC nach der CHX-Zugabe.	115
3.25 Typischer Verlauf der Parameter R_b und α der in CDM mit OS mit HC kultivierten PBCEC nach CHX-Zugabe.	116

3.26 Typischer Verlauf der Parameter R_b und α der in CDM mit HC kultivierten PBCEC nach der CHX-Zugabe.	117
3.27 Vergleichender Verlauf des Parameters R_b nach der Zugabe von CHX zu den unterschiedlich kultivierten PBCEC.	118
3.28 Vergleichender Verlauf des Parameters α nach der Zugabe von CHX zu den unterschiedlich kultivierten PBCEC.	119
3.29 Immunzytochemischer Nachweis des E-Selektins der PBCEC nach der Zugabe von Serum in das apikale bzw. basolaterale Filterkompartiment.	122
3.30 Immunzytochemischer Nachweis des E-Selektins der PBCEC nach der Zugabe von Serum in das apikale bzw. basolaterale Filterkompartiment.	123
3.31 Immunzytochemischer Nachweis des E-Selektins nach der Inkubation der PBCEC mit TNF- α .	126
3.32 Immunzytochemischer Nachweis des E-Selektins nach der Inkubation der PBCEC mit TNF- α .	127
3.33 Immunzytochemischer Nachweis des VCAM-1 und ICAM-1 nach der Inkubation der PBCEC mit TNF- α .	128
3.34 Der Einfluss von TNF- α auf den TER der PBCEC.	130
3.35 Der polare Einfluss von TNF- α auf den TER der PBCEC.	131
3.36 Immunzytochemischer Nachweis des tight junction-assoziierten Proteins ZO-1 nach der Inkubation der PBCEC mit TNF- α .	133
3.37 Einfluss des TNF- α auf die Expression des tight junction-assoziierten Proteins Claudin-5 der PBCEC.	134
3.38 Einfluss des TNF- α auf die Expression des tight junction-assoziierten Proteins Occludin der PBCEC.	135
3.39 Western-Blot-Analyse der tight junction-assoziierten Proteine ZO-1, Occludin und Claudin-5 der PBCEC nach der Inkubation der Endothelzellen mit TNF- α .	138
3.40 Der Einfluss von TNF- α auf die Morphologie der PBCEC.	139
3.41 Der Einfluss des TNF- α auf die ECIS-Parameter R_b , α und C_m der PBCEC unterschiedlicher Präparationen (7. DIV).	141
3.42 Einfluss des TNF- α auf die ECIS-Parameter R_b , α und C_m der PBCEC unter Berücksichtigung des DIV der PBCEC (9. DIV).	143
3.43 Der Einfluss des LPS auf die ECIS-Parameter R_b , α und C_m der PBCEC.	145
3.44 Immunzytochemischer Nachweis des tight junction-assoziierten Proteins ZO-1 nach der Inkubation der PBCEC mit LPS.	146
3.45 Die MMP-Sekretion entzündungsaktivierter bzw. nicht aktivierter PBCEC.	148
3.46 Der Einfluss neutrophiler Granulozyten auf die ECIS-Parameter R_b , α und C_m der PBCEC.	152
3.47 Der Einfluss der PBCEC-Neutrophilen-Interaktion auf die ZO-1-Expression der PBCEC.	154

3.48 REM-Analyse der nicht entzündungsaktivierten PBCEC während der Interaktion mit den Neutrophilen.	156
3.49 REM-Analyse der entzündungsaktivierten PBCEC während der Interaktion mit den Neutrophilen.	157
3.50 Western-Blot-Analyse der tight junction-assoziierten Proteine ZO-1, Occludin und Claudin-5 nach Inkubation der aktivierten bzw. nicht aktivierten PBCEC mit neutrophilen Granulozyten.	159
3.51 Immunzytochemischer Nachweis des E-Selektins der PBCEC nach der Interaktion mit neutrophilen Granulozyten.	160
3.52 Der Einfluss der Neutrophilen auf den TER der entzündungsaktivierten PBCEC in Abhängigkeit von der E/L-Ratio.	162
3.53 Einfluss der Neutrophilen auf den TER der aktivierten PBCEC in Abhängigkeit von der E/L-Ratio.	164
3.54 Der Einfluss der E/L-Ratio auf das ZO-1-Protein der nicht entzündungsaktivierten PBCEC.	165
3.55 Der Einfluss der E/L-Ratio auf die ZO-1-Expression der entzündungsaktivierten PBCEC.	167
3.56 Der Einfluss der E/L-Ratio auf die Claudin-5-Expression der nicht entzündungsaktivierten PBCEC.	168
3.57 Der Einfluss der E/L-Ratio auf die Claudin-5-Expression der entzündungsaktivierten PBCEC.	169
3.58 Der Einfluss der E/L-Ratio auf die Occludin-Expression der nicht entzündungsaktivierten PBCEC.	170
3.59 Der Einfluss der E/L-Ratio auf die Occludin-Expression der entzündungsaktivierten PBCEC.	171
3.60 Western-Blot-Analyse der tight junction-assoziierten Proteine Occludin und Claudin-5 nach der Inkubation der PBCEC mit Neutrophilen in unterschiedlichen E/L-Ratios.	174
3.61 Interaktion der Neutrophilen mit den entzündungsaktivierten PBCEC (E/L Ratio: 1:2).	175
3.62 Interaktion der Neutrophilen mit den entzündungsaktivierten PBCEC (E/L Ratio: 1:5).	176
3.63 Interaktion der Neutrophilen mit den entzündungsaktivierten PBCEC (E/L Ratio: 1:17).	178
3.64 Interaktion der Neutrophilen mit den entzündungsaktivierten PBCEC (E/L Ratio: 1:20).	179
3.65 Interaktion der Neutrophilen mit den entzündungsaktivierten PBCEC (E/L Ratio: 1:30).	179
3.66 Interaktion der Neutrophilen mit den entzündungsaktivierten PBCEC (E/L Ratio: 1:50).	180
3.67 Zusammenfassende Darstellung des Einflusses der Neutrophilen-Interaktion auf den Zell-Zell-Kontakt (R_b) der PBCEC in Abhängigkeit von der E/L-Ratio.	181

3.68	Zusammenfassende Darstellung des Einflusses der Neutrophilen-Interaktion auf den Zell-Substrat-Kontakt (α) der PBCEC in Abhängigkeit von der E/L-Ratio.	182
3.69	REM-Analyse der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion in unterschiedlichen E/L-Ratios.	183
3.70	REM-Analyse der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion	185
3.71	Transmigration neutrophiler Granulozyten durch den entzündungsaktivierten PBCEC-Monolayer.	187
3.72	Transmigration neutrophiler Granulozyten durch den aktivierten PBCEC-Monolayer.	188
3.73	REM-Analyse der Mikrovilli-Strukturen auf der Neutrophilen-Oberfläche während der unterschiedlichen Stadien der Adhäsionskaskade.	190
3.74	REM-Analyse der Neutrophilen-Filipodien während der PBCEC-Neutrophilen-Interaktion.	191
3.75	Elektronenmikroskopische Darstellung der Zellgrenzen des aktivierten PBCEC-Monolayers während der Neutrophilen-Interaktion.	192
3.76	REM-Analyse der PBCEC-Zellgrenzen und der Endothelzell-Oberflächenstruktur.	193
3.77	Zymographische Analyse der MMP-Sekretion der Neutrophilen.	195
3.78	Die MMP-Sekretion während der PBCEC-NkCDM-Interaktion.	196
3.79	MMP--Nachweis des-konditionierten Mediums während der PBCEC-Neutrophilen-Interaktion.	197
3.80	Vergleichende REM-Untersuchungen der PBCEC-NkCDM und PBCEC-Neutrophilen-Interaktion.	199
3.81	Der Einfluss des NkCDMs auf die Barrierefunktion der PBCEC unterschiedlicher Präparationen.	201
3.82	Einfluss des NkCDMs unterschiedlicher Neutrophilen-Präparationen auf den TER der PBCEC.	202
3.83	Einfluss des NkCDMs unterschiedlicher Konditionierungsdauer auf den TER der PBCEC.	204
3.84	Der polare Einfluss des NkCDMs auf den TER der nicht aktivierten PBCEC.	205
3.85	Der Einfluss der Neutrophilen resuspendiert in frischem CDM (E/L-Ratio: 1:30) im Vergleich zu ihrem NkCDM auf die Barrierefunktion der PBCEC.	206
3.86	Der Einfluss der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion auf die PBCEC-Barrierefunktion unter Berücksichtigung des NkCDMs (E/L Ratio: 1:5).	208
3.87	Der Einfluss der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion auf die PBCEC-Barrierefunktion unter Berücksichtigung des NkCDMs (E/L Ratio: 1:30).	209
3.88	Der Einfluss der Neutrophilen-PBCEC-Interaktion auf die PBCEC-Barrierefunktion unter Berücksichtigung des NkCDMs (E/L Ratio: 1:50).	210
3.89	Vergleichende Darstellung des Einflusses der Neutrophilen und ihres NkCDMs auf den TER der PBCEC.	211

3.90 Immunzytochemischer Nachweis des E-Selektins der PBCEC nach der Interaktion mit dem NkCDM.	212
3.91 Der Einfluss der Neutrophilen und ihres NkCDMs auf die ZO-1-Expression der entzündungsaktivierten PBCEC.	213
3.92 Der Einfluss der Neutrophilen und ihres NkCDMs auf die Occludin-Expression der entzündungsaktivierten PBCEC.	214
3.93 Der Einfluss der Neutrophilen bzw. deren NkCDMs auf die tight junction-assoziierten Proteine Occludin und Claudin-5 der PBCEC.	216
3.94 Der Einfluss der T-Helferzellen auf den TER der PBCEC in Abhängigkeit von der E/L-Ratio.	218
3.95 Interaktion CD4 ⁺ T-Helferzellen mit den PBCEC (E/L Ratio: 1:5).	219
3.96 Interaktion CD4 ⁺ T-Helferzellen mit den PBCEC (E/L Ratio: 1:20).	220
3.97 Interaktion CD4-positiver T-Helferzellen mit den PBCEC (E/L Ratio: 1:20).	220
3.98 Einfluss des THkCDMs auf den TER der entzündungsaktivierten PBCEC.	221
3.99 Der Einfluss des THkCDMs auf den TER der PBCEC im zeitlichen Verlauf.	222
3.100 Vergleichende REM-Untersuchungen der Interaktion der PBCEC mit Neutrophilen bzw. T-Helferzellen (E/L-Ratio:1:20).	223
3.101 Immunzytochemischer Nachweis des ZO-1-Proteins nach Inkubation der entzündungsaktivierten PBCEC mit CD4 ⁺ -T-Helferzellen bzw. deren konditioniertem Medium.	224
3.102 REM-Analyse der Neutrophilen-Interaktion mit den entzündungsaktivierten Plexusepithelzellen (E/L-Ratio von 1:20).	225
3.103 REM-Analyse der Neutrophilen-Interaktion mit nicht entzündungsaktivierten Plexusepithelzellen.	226
3.104 REM-Analyse der Neutrophilen-Interaktion mit den entzündungsaktivierten Plexusepithelzellen.	227
3.105 Der Einfluss des NkCDMs auf die Morphologie der Mikrovilli der Plexusepithelzellen.	228
3.106 Morphologische Untersuchung der Interaktion von Neutrophilen mit dem entzündungsaktivierten Aortaendothel des Schweins in situ.	229
4.1 Grafische Darstellung der transzellulären Diapedese von Neutrophilen in vivo nach Kvietyts & Sandig (2001).	297
4.2 Darstellung der transzellulären Neutrophilen-Diapedese in situ nach Feng et al. (1998).	297
4.3 Modellvorstellung der Neutrophilen-Diapedese durch das Endothel der BHS.	299
4.4 Darstellung der noch zu klärenden Fragen zum Neutrophilen-Transmigrationsmodell.	306

Danksagung

Ich danke ...

Herrn Prof. Dr. H.-J. Galla für die interessante Themenstellung und den zugestandenen Freiraum bei der wissenschaftlichen Arbeit, vor allem aber dafür, dass ich die Möglichkeit erhalten habe in einem für mich neuen Fach promovieren zu dürfen und auf diese Weise Einblicke in ein hochinteressantes Themengebiet zu erlangen.

allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und des Instituts für Biochemie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. Thomas Rauen für die wissenschaftliche Betreuung der Experimente und für seine stetige Unterstützung. Seine zahlreichen praktischen Ratschläge haben mir bei der Durchführung der Versuche erheblich weitergeholfen.

Herrn Dr. J. Wegener dafür, dass er mir die ECIS-Analysen ermöglicht und mich hinsichtlich der biophysikalischen Fragestellungen wissenschaftlich betreut hat. Für seine großen Bemühungen bei der Betreuung möchte ich ihm besonders danken.

Frau Silke Arndt, die im Rahmen ihrer Diplomarbeit die Ergebnisse der hier dargestellten Apoptose-Studien beigesteuert hat. Insbesondere danke ich ihr für ihre engagierte, eigenständige und unkomplizierte Arbeitsweise, die ich als sehr angenehm empfunden habe.

Herrn Wolfgang Willenbrink und Herrn Frederick Höhn für die stete Unterstützung bei PC-Problemen jeglicher Art.

Herrn Walter Storkebaum für die Bereitstellung der hervorragenden Institutsstruktur.

Frau Hedda Elvrich, Frau Lydia Klapper und Frau Antje Wiese für ihre Hilfsbereitschaft bei organisatorischen Fragen.

Herrn Karsten Hindersmann, der unermüdlich meine Arbeit korrigiert und keine Mühe gescheut hat, sich stundenlangen Diskussionen über Form und Ausdruck mit mir auseinander zu setzen um so die Arbeit diesbezüglich zu verbessern.

Frau Christina Lohmann für das Korrekturlesen dieser Arbeit, ihre große Hilfsbereitschaft und die tolle Zusammenarbeit. Bei Tina möchte ich mich ganz besonders bedanken, da sie mich stets unterstützt hat und mir bei chemischen Fragen im Laboralltag immer geholfen hat. Zudem hat sie mich in die Mysterien der Biochemie eingeweiht, was mir immer sehr viel Freude bereitet hat.

Frau Miriam Krischke für die stete Unterstützung und die wirklich schöne Zusammenarbeit. Was wären die langen Dienstags-Leukozyten-Endothelzell-Nächte ohne Miriam gewesen? Auf jeden Fall wesentlich weniger unterhaltsam und ergiebig.

Herrn Lertyot Treeratanapiboon, der mir während der `Endphase` durch seine engagierte und gewissenhafte Arbeitsweise bei der Durchführung der Experimente erheblich geholfen hat. Die Zusammenarbeit mit ihm war super.

Herrn Thorsten Nitz für die tolle Zusammenarbeit und seine stete Hilfsbereitschaft bei allen Fragen im Laboralltag. Ihm möchte ich besonders danken, da er mir in den ersten zwei Jahren sowohl praktisch als auch fachlich im Labor und im Praktikum sehr geholfen hat.

Silke für ihre unkomplizierte Art und stete Hilfsbereitschaft. Die Zusammenarbeit mit ihr war mir stets ein Vergnügen.

Björn, der immer `ein offenes Ohr` für die Computer-Probleme der `speziellen Sorte` hatte und mir stets geduldig dabei geholfen hat sie zu lösen.

Frau Sabine Hüwel für die nette Zusammenarbeit und ihre Hilfsbereitschaft, insbesondere bei der Durchführung der Experimente `kurz vorm Ende` und ihre stete Unterstützung hinsichtlich der Organisation der Zellen.

Herrn Joseph Lange für die exzellente Einweisung und Betreuung am Rasterelektronenmikroskop. Für seine große Bemühung mir zu zeigen um gute Aufnahmen am Mikroskop möchte ich ihm besonders danken. Durch die nette Zusammenarbeit hat mir die Arbeit am Mikroskop immer sehr viel Freude bereitet.

Herrn Dr. Klaus Kerkhoff dafür, dass er mir bei jeglichen Fragen bezüglich des Umgangs mit den Immunzellen stets weitergeholfen hat und ich die Vitalitätstests unter seiner Anleitung durchführen durfte.

Frau Dorothea Korte und Frau Christiane Engelbertz für ihre nette Einführung und die nette Betreuung zu Beginn meiner Arbeit. Durch sie hatte ich einen wirklich angenehmen Start im Institut.

Thomas in besonderem Maße für alles und noch viel mehr. Ohne ihn hätte ich den Schritt in die Zellbiologie wohl nicht gewagt.

ganz besonders meinen Eltern, die mich stets bei allem sehr unterstützt haben und mir bei meinen `Weiterbildungsmaßnahmen` immer geduldig geholfen haben.

Lebenslauf

Name: Olympia-Ekaterini Psathaki
Geburtsdatum: 17 März 1969
Geburtsort: Iraklion/ Kreta (Griechenland)
Familienstand: ledig
Eltern: Nikolaos Psathakis und Ilse Psathaki, geb. Kolle

Schulbildung

Grundschule Sanderbusch	1975-1977
Grundschule Ierapetra (Kreta/Griechenland)	1977-1978
Grundschule Bad Gandersheim	1978-1979
Grundschule Cloppenburg	1979-1980
Orientierungsstufe Don Bosco in Cloppenburg	1980-1982
Clemens-August-Gymnasium in Cloppenburg	1982-1988
Hochschulreife: Clemens-August-Gymnasium (Cloppenburg) am	18 Mai 1988

Studium

Studiengang der Biologie (Diplom) an der Universität Osnabrück	1989-1996
Studiensemester an der Georg-August Universität in Göttingen	1989-1990
Auslandsstudiensemester an der <i>Université de Lausanne</i> (Schweiz) in der Biologie und Französisch	1993/1994
Auslandsaufenthalt am <i>Institute of Marine Biology of Crete/</i> (Griechenland) zur Anfertigung der Diplomarbeit	05/1995-04/1996
Promotionsstudiengang der Biologie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster	1998-2003

Prüfungen

Diplom-Prüfung an der Universität Osnabrück	20.07.1996
---	------------

Tätigkeiten

Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität Osnabrück im Rahmen des UV-B-Verbundprojekts (Durchführung am <i>Institute of Marine Biology of Crete</i>).	01/1997-12/1997
Stipendiatin des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) zur Förderung der Forschungsarbeit in Griechenland (s. o)	1998

Dissertation

Beginn der Dissertation am Institut für Biochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster unter der Leitung von Prof. Dr. H.-J. Galla	01/1999
--	---------

