

Jessica Schulte

**Einfluss des Pertussis Toxins auf die Migration
zerebraler Endothelzellen**



Einfluss des Pertussis Toxins auf die Migration zerebraler Endothelzellen

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

vorgelegt von

Jessica Schulte

geboren am 29.04.1977 in Lengerich

-2010-

Dekan:	Prof. Dr. Christian Klämbt
Erster Gutachter:	Prof. Dr. M. Alexander Schmidt
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Martin Bähler
Tag der mündlichen Prüfung:	27.01.2011
Tag der Promotion:	04.02.2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Keuchhusten	3
2.1.1 <i>Bordetella pertussis</i> – der Erreger des Keuchhustens	3
2.1.2 Krankheitsbild und Verlauf von Keuchhusten	4
2.1.3 Das Pertussis Toxin	7
2.2 Hirnendothelzellen	10
2.2.1 Blut-Hirn-Schranke	10
2.2.2 <i>Tight junctions</i> und <i>adherens junctions</i>	11
2.2.3 Einfluss des Pertussis Toxins auf die Blut-Hirn-Schranke	13
2.3 Die Migration von Endothelzellen	14
2.3.1 Der Migrationszyklus	15
2.3.2 Der Prozess der Zellmigration	16
2.3.3 Intrazelluläre Signalwege, die an der Zellmigration beteiligt sind	17
2.3.4 Einfluss des Pertussis Toxins auf die Migration	21
2.4 Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit	22
3 Material	24
3.1 Zelllinien	24
3.2 Bakterielle Toxine	25
3.3 Antikörper	25
3.3.1 Primäre Antikörper	25
3.3.2 Sekundäre Antikörper	26
3.4 Protein-Größenstandard	26
3.5 Medien und Zusätze für die Zellkultur	27
3.6 Chemikalien	28
3.7 Puffer und Lösungen	29
3.7.1 Allgemeine Puffer	30
3.7.2 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden	30
3.8 Verbrauchsmaterialien	32
3.9 Geräte	32
3.10 siRNA für die Transfektion	33

3.11 Oligonukleotide für die qRT-PCR	34
3.12 Enzyme für die Molekularbiologie.....	34
3.13 Kits	34
4 Methoden.....	35
4.1 Zellbiologische Methoden.....	35
4.1.1 Zellkultur	35
4.1.1.1 Passagieren adhärenter Zellen	35
4.1.1.2 Auftauen kryokonservierter Zellen	36
4.1.1.3 Kryokonservierung von Zellen.....	36
4.1.1.4 Züchtung in 24-Well-Platten	36
4.1.1.5 Züchtung in 48-Well-Platten	36
4.1.1.6 Züchtung in 96-Well-Platten	37
4.1.1.7 Züchtung in 10 cm-Kulturschalen.....	37
4.1.1.8 Quantifizierung der Zellzahl	38
4.1.2 Migrationsversuch	38
4.1.2.1 Migrationsstudien unter Verwendung von Edelstahlzylindern	39
4.1.2.2 Migrationsstudien mit dem xCELLigence Real-Time Cell Analyzer DP	40
4.1.3 Proliferationsassay	40
4.1.3.1 Proliferationsassay: Cell Proliferation ELISA	41
4.1.3.2 Proliferationsassay: xCELLigence RTCA DP	41
4.1.4 Transfektion	42
4.1.5 Bestimmung des Intrazellulären cAMP-Spiegels	42
4.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen	43
4.2.1 Vorbereitung der Zellen	43
4.2.2 Fixierung und Permeabilisierung	43
4.2.3 Antikörperfärbung für Immunfluoreszenzen	43
4.3 Proteinbiochemische Methoden	44
4.3.1 Herstellung von Zelllysaten	44
4.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	44
4.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
4.3.4 Western Blot.....	46
4.4 Molekularbiologische Methoden.....	47
4.4.1 Isolierung von RNA	47
4.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	47
4.4.3 cDNA-Synthese.....	47
4.4.4 Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	48

5 Ergebnisse	50
5.1 Einfluss des Pertussis Toxins auf die Migration von Endothelzellen	50
5.1.1 Inhibierung der Migration von HBMEC durch Pertussis Toxin	50
5.1.2 Konzentrationsabhängiger Einfluss des Pertussis Toxins auf die Migration von HBMEC	54
5.1.3 Einfluss des Pertussis Toxins auf die Migration anderer Zelltypen	55
5.2 Einfluss verschiedener Inhibitoren und Aktivatoren auf die Migration von zerebralen Endothelzellen	58
5.2.1 Einfluss von U-73122 auf die Migration	58
5.2.2 Einfluss von H-7 und Phorbol-12-myristat-13-acetat auf die Migration	59
5.2.3 Einfluss von H-89 auf die Migration	60
5.3 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen migrierender HBMEC	62
5.4 An den inhibitorischen Prozessen der Zellmigration von HBMEC beteiligte Proteine	64
5.4.1 Untersuchungen zur Effizienz der Transfektion von HBMEC mit siRNA und Lipofektamin	66
5.4.2 Einfluss der Transfektion von HBMEC mit siRNA gegen PKC α und PKC ζ auf die PT-vermittelten Effekte	69
5.4.3 Einfluss der Transfektion von HBMEC mit siRNA gegen G α_{i-2} und G α_{i-3} auf die PT-vermittelten Effekte	72
5.4.4 Einfluss der Transfektion von HBMEC mit siRNA gegen Claudin-1 und Occludin auf die PT-vermittelten Effekte	73
5.4.5 Einfluss der Transfektion von HBMEC mit siRNA gegen PAR-3 und PAR-6 auf die PT-vermittelten Effekte	75
5.4.6 Einfluss der Transfektion von HBMEC mit siRNA gegen MMP-2 und MMP-9 auf die PT-vermittelten Effekte	76
5.4.7 Einfluss des Pertussis Toxins auf die Expression von PI3K und Rac1	78
5.5 Einfluss des Pertussis Toxins auf die Zellproliferation	79
5.6 Einfluss des Cholera Toxins auf die Migration und Zellproliferation	80
5.6.1 Einfluss von CT auf die Migration von HBMEC und MDCK/C7	81
5.6.2 Einfluss von CT auf die Proliferation von HBMEC	83
5.6.3 Einfluss von CT auf die Proliferation von MDCK/C7	84
5.7 Einfluss von Brefeldin A auf die Migration und Proliferation	85
5.7.1 Einfluss von BFA auf die Migration	85
5.7.2 Einfluss von BFA auf die Proliferation	86
6 Diskussion	88
6.1 Einfluss des Pertussis Toxins auf die Migration von Zellen	88
6.1.1 Inhibierung der Migration von HBMEC durch Pertussis Toxin	88
6.1.2 Einfluss des Pertussis Toxins auf die Migration anderer Zelltypen	91
6.1.3 Einfluss von PT auf Signaltransduktionswege	92

6.1.4 Zusammenfassende Diskussion zum Zusammenspiel der Signalmoleküle.....	103
6.1.5 Fluoreszenzmikroskopische Analysen migrierender HBMEC	105
6.2 Einfluss des Pertussis Toxins auf die Zellproliferation.....	106
6.3 Einfluss des Cholera Toxins auf die Migration und Proliferation.....	106
6.4 Einfluss von Brefeldin A auf die Migration und Proliferation.....	108
6.5 Ausblick.....	109
7 Literatur	112

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
<i>A. bidest</i>	<i>Aqua bidest</i>
AC	Astrozyten
ACT	Adenylatzyklase-Toxin
ad	auf
ADP	Adenosindiphosphat
AJ	<i>adherens junction</i>
AP	Alkalische Phosphatase
aP	azelluläre Impfstoffe
aPKC	atypische PKC
APS	Ammoniumpersulfat
BCEC	<i>brain capillary endothelial cells</i>
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat-Toluidinsalz
BFA	Brefeldin A
BL	Basallamina
BrdU	5-Bromo-2'-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
cm ²	Quadratzentimeter
CT	Cholera Toxin
Cy2	Cyanin
Cy3	Indocarbocyanin
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's modified Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DNT	Dermonekrotische Toxin
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
D-PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DTT	Dithiothreitol
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EC	Endothelzellen
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	fötales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FHA	filamentöses Hämagglutinin
g	Gramm
GA	Golgi-Apparat
GDP	Guanosindiphosphat
griech	griechisch
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBEC	<i>human bronchial epithelial cells</i>
HBMEC	<i>human brain microvascular endothelium cells</i>
hCMEC/D3	<i>human cerebral microvascular endothelium cells</i>
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HPRT	Hypoxantin-guanine phosphoribosyltransferase
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
JAM	<i>junctional adhesion molecule</i>
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IF	Immunfluoreszenz
K	Kontrolle

kb	kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
μ	mikro (10^{-6})
m	milli (10^{-3}) oder Meter
M	molar (mol/l)
M	monoklonar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasekaskaden
Mb	Megabasenpaare
MDCK/C7	<i>madin darby canine kidney</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
MEM	<i>Modification of Eagle's Medium</i>
MEM AS	MEM Non essential amino acids
min	Minute
MMP	Matrix Metalloproteinase
mol	$6,023 \cdot 10^{23}$ Teilchen
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Multiple Sklerose
mt-MMP	membranständiger MMP
MVBs	<i>microvesicular bodies</i>
n	nano (10^{-9})
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
Na-Pyruvat	Natrium-Pyruvat
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NBT	Nitrotetrazoliumblauschlorid
Ω	Ohm
p	polyklonal
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR	<i>partitioning defective</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd

pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PC	Perizyten
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PT	Pertussis Toxin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfate- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
T	Transfektionsansatz
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS-T	TBS-Tween 20
TCT	Tracheale Zytotoxin
TEMED	N,N,N',N-Tetramethyldiamin
TER	<i>transendothelial electrical resistance</i>
TJ	<i>tight junction</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Triton X-100	TX 100 Alkylphenylpolyethylenglykol
u.	und
U	Unit, Einheit der spezifischen Enzymaktivität
ÜN	über Nacht
USA	United States of America
V	Volt
VE	vaskulär-endothelial

VF	Verdünnungsfaktor
vgl.	vergleiche
v/v	<i>volume per volume</i>
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wP	<i>whole cell vaccine</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
x g	vielfaches der Erbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO	<i>Zonula occludens</i>

1 Zusammenfassung

Das Pertussis Toxin (PT) als bakterielles Exotoxin ist der Hauptvirulenzfaktor des Keuchhusten auslösenden Bakteriums *Bordetella pertussis* und verfügt über ein typisches AB₅-Motiv mit einer enzymatisch aktiven A-Untereinheit und einem Rezeptorstrukturen bindendem B-Oligomer. Es verändert die Barrierefunktion und daraus resultierend die Permeabilität humaner Hirnendothelzellen und wird mit dem Auftreten von Komplikationen wie neurologischen Schäden und Enzephalopathien während einer Pertussis Erkrankung assoziiert.

Ein wenig untersuchter Aspekt des Einflusses von Pertussis Toxin auf humane Hirnendothelzellen stellt die hier gezeigte Inhibierung der Wundheilung dar. Manuelle Migrationsversuche und automatisierte Echtzeitmessungen zeigten eine konzentrationsabhängige Hemmung der Migration von humanen zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen (HBMEC) durch das Toxin mit dem größten inhibitorischen Effekt bei der höchsten eingesetzten PT-Konzentration von 1 µg/ml. Dieser hemmende Effekt beruht auf der ADP-Ribosyltransferaseaktivität der A-Untereinheit des Toxins, da das B-Oligomer die Zellmigration nicht beeinflusst (Schulte, 2007). Die PT-vermittelte Reduktion im Migrationsverhalten konnte ebenfalls bei der Hirnendothelzelllinie hCMEC/D3, der Glioblastomzelllinie U373MG, bei A549-Zellen aus humanem Bronchialkarzinomgewebe mit typisch epithelialen Eigenschaften und der epithelialen Zelllinie MDCK/C7 festgestellt werden, so dass ein zelltypspezifischer Effekt ausgeschlossen werden kann.

Eine Hemmung der Proteinkinase C (PKC) durch den Inhibitor H-7 führt zu einem inhibitorischen und eine Aktivierung der PKC durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) zu einem stimulierenden Effekt auf die Migration von HBMEC. Dieses Ergebnis deutet auf eine Beteiligung der PKC an der Induktion der Migration hin.

Immunfluoreszenzanalysen zum Nachweis von PKC α , PKC ζ und Occludin zeigen Unterschiede in der Lokalisation der Proteine in migrierenden HBMEC, im Vergleich zu Zellen aus einem konfluenten Zellschicht, auf. In den migrierenden Zellen weisen die Proteine deutliche Akkumulationen direkt am Leitsaum in Richtung der Wanderung auf. Dies deutet eine mögliche Beteiligung der Proteine an den Mechanismen der Migration an. In Immunfluoreszenzanalysen zum Nachweis von Claudin-1, Claudin-5, PKC δ , PKC ϵ , G α_{i-2} , G α_{i-3} , der Polaritätsproteine PAR-3 und PAR-6, der Matrix Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 sowie der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) konnten keine Unterschiede in der Lokalisation detektiert werden. Bei der Herunterregulierung der

Expression von Claudin-1, Occludin, PKC α , PKC ζ , G α_{i-2} , G α_{i-3} , PAR-3, PAR-6, MMP-2 und MMP-9 können für alle Proteine inhibierende Effekte auf die Migration festgestellt werden. Dies zeigt eine mögliche Beteiligung an den Regulationsmechanismen des Migrationsprozesses an.

Für die PI3K und Rac1 konnte eine verringerte Expression bei Inkubation mit PT durch die Methode der qRT-PCR gezeigt werden. Dies lässt eine mögliche Beteiligung der Proteine am Signaltransduktionsweg der PT-vermittelten Inhibierung vermuten.

Migrationsassays mit HBMEC zur Untersuchung des Einflusses von CT auf das Wanderungsverhalten zeigen denselben inhibierenden Effekt wie bei Inkubation mit PT. Da die Zugabe von CT keine Veränderungen der Permeabilisierung von Hirnendothelzellbarrieren hervorruft, ist anzunehmen, dass die Prozesse der Migration und der Permeabilisierung zwei unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegen. Die MDCK/C7-Zellen zeigten bei Inkubation mit CT im Vergleich zu den Kontrollzellen keine Unterschiede im Migrationsverhalten. Bei Inkubation mit PT wurde die Migration der Epithelzellen hingegen inhibiert. Diese Ergebnisse der PT- und CT-vermittelten Hemmung der Migration lassen vermuten, dass dieser inhibierende Effekt unabhängig vom cAMP-Spiegel ist, da ein Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels für HBMEC nur bei Inkubation mit CT und für MDCK/C7-Zellen nur bei Inkubation mit PT festgestellt werden konnte.

Untersuchungen zum Einfluss von Brefeldin A (BFA) auf die Migration von HBMEC und MDCK/C7-Zellen zeigten nur für die Endothelzellen, nicht aber für die Epithelzellen, eine Inhibierung der Migration. BFA induziert nur bei endothelialen Zellen einen Zusammenbruch des Golgi-Apparates während MDCK/C7-Zellen geschützt sind. Beide Zelltypen zeigen aber eine PT-induzierte Hemmung der Migration.

Ein Effekt des Pertussis Toxins auf die Proliferation von HBMEC kann in automatisierten Echtzeitmessungen ausgeschlossen werden, so dass PT bei Wundheilungsprozessen die Migration nicht aber die Proliferation der Zellen beeinflusst.

2 Einleitung

Bei der Migration von Zellen handelt es sich um einen vielseitigen und komplexen Prozess, der für die Entwicklung von multizellulären Organismen eine bedeutende Rolle spielt und dabei unter anderem auch an Wundheilungsprozessen beteiligt ist (Pollard *et al.*, 2000). Die Zellmigration und somit auch die Prozesse der Wundheilung können durch Infektionen verlangsamt werden. Die Ursachen für diese Verzögerungen liegen in den hohen Bakterienzahlen in den Geweben oder in einer Inhibierung durch Toxine, die vor dem Eintritt in das Gewebe von den Bakterien sezerniert wurden (Ovington, 2003). Frühere Untersuchungen zeigten einen Einfluss des vom Keuchhustenerreger *Bordetella pertussis* sezernierten Pertussis Toxins auf die Zellmigration von Endothelzellen (Schulte, 2007). In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Regulationsmechanismen, Signalproteine und Signaltransduktionswege an der Migration und an der Inhibierung des Prozesses durch das Pertussis Toxin beteiligt sein könnten.

2.1 Keuchhusten

Keuchhusten ist eine akute hoch infektiöse auf den Menschen beschränkte Erkrankung der oberen Atemwege, die häufig bei kleinen Kindern auftritt und durch das Bakterium *Bordetella pertussis* ausgelöst wird.

2.1.1 *Bordetella pertussis* – der Erreger des Keuchhustens

Das Bakterium *Bordetella pertussis* wurde im Jahr 1906 erstmals von Bordet und Gengou isoliert sowie charakterisiert und weist als Erreger der Erkrankung Pertussis, die auch als Keuchhusten bezeichnet wird, eine hohe Pathogenität auf (Bordet und Gengou, 1906).

Es handelt sich bei der Gattung der Bordetellen um kokkoide, aerobe, Gram-negative, einzeln oder paarweise liegende Stäbchenbakterien. Derzeit umfasst die Gattung *Bordetella* acht Arten mit sechs human-pathogenen Vertretern. Neben den Erregern des Keuchhustens *B. pertussis* und *B. parapertussis*, der beim Menschen eine mildere Form der Krankheit auslöst, gehört zu dieser Spezies auch das primär tierpathogene Bakterium *B. bronchiseptica*, das vor allem den Respirationstrakt von Säugetieren und in nur sehr seltenen Fällen den des Menschen befällt (Goodnow, 1980). Diese drei *Bordetella*-Spezies verfügen über sehr ähnliche DNA-Sequenzen, wobei das Genom von *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* ungefähr 1 Mb größer ist als das von *B. pertussis* (Stibitz und Yang,

1997). Es wurde daher postuliert sie als Subspezies einer gemeinsamen Art anzuerkennen (Hahn *et al.*, 2005). In den letzten Jahrzehnten sind einige weitere Vertreter entdeckt worden, die dieser Gattung zugeordnet wurden. Dazu zählen *B. avium*, der ausschließlich den Respirationstrakt von Vögeln und Reptilien infiziert (Jackwood *et al.*, 1995) aber auch humanpathogene Erreger wie *B. trematum* und *B. holmesii*, die lokal aus Wunden und Infektionen des Ohres isoliert wurden. *B. hinzii* trat im Respirationstrakt von Vögeln, in dem er aber keine Erkrankung auslöste, auf und wurde außerdem im Blut und Respirations- und Gastrointestinaltrakt immunsupprimierter Menschen entdeckt (Gerlach *et al.*, 2001; Hahn *et al.*, 2005). Im Jahr 2005 wurde ein klinisches Isolat des bis dahin als Umweltkeim geltenden Stammes *B. petrii* aus einem Patienten mit mandibularer Osteomyelitis isoliert (Fry *et al.*, 2005).

B. pertussis befällt das Flimmerepithel des menschlichen Respirationstraktes, das als alleiniges Habitat gilt. Das Bakterium verfügt über Fimbrien (Pili), mit denen es an den Zilien des Flimmerepithels haftet, und eine Kapsel, die es vor Phagozytose und der Inaktivierung durch das Komplementsystem des Wirtes schützt (Hahn *et al.*, 2005). In der äußeren Membran von *B. pertussis* sind Lipooligosaccharide und Oberflächenstrukturen mit antigener Wirksamkeit lokalisiert, zu denen das fimbrilläre, serospezifische Agglutinogen, das nicht fimbrilläre Agglutinogen Pertactin, ein äußeres Membranprotein und das filamentöse Hämagglutinin (FHA) zählen. Diese sind an der Anheftung des Bakteriums an das zilientragende Flimmerepithel des Wirtes beteiligt (Mills, 2001).

B. pertussis produziert eine Vielzahl von biologisch aktiven und antigenen Virulenzfaktoren wie das Pertussis Toxin (PT), das Adenylatzyklase-Toxin (ACT), das Dermonekrotische Toxin (DNT) und das Tracheale Zytotoxin (TCT). Diese sind an den verschiedenen Prozessen der Pathogenese und an der Etablierung des Erregers im Gewebe beteiligt (Weiss und Hewlett, 1986).

2.1.2 Krankheitsbild und Verlauf von Keuchhusten

Pertussis ist eine akute Erkrankung der oberen Atemwege, die 1578 erstmals als Epidemie mit den typischen Keuchhustensymptomen in Paris beobachtet wurde (Cone, 1970). Aufgrund des auftretenden Keuchens beim Luftholen nach krampfartigen Hustenattacken wird die Krankheit in Deutschland als Keuchhusten bezeichnet. Diese beschriebene Symptomatik und die teilweise sehr langwierige Rekonvaleszenz führt zu weiteren

Namensgebungen wie „Hahnenschrei“ in Frankreich, „Großmutterhusten“ in England und „100-Tage-Husten“ in China.

Pertussis gehört weltweit zu den zehn am häufigsten auftretenden und mit dem Tod endenden Infektionskrankheiten. Im Jahr 2003 erkrankten trotz wirksamer Impfstoffe weltweit 17,6 Millionen Menschen an Keuchhusten, wobei 90% der Erkrankungen in den Entwicklungsländern auftraten. Dabei wurden 279.000 Todesfälle – meist bei Säuglingen unter sechs Monaten – verzeichnet (WHO, 2005). Häufig treten gerade bei Kleinkindern Komplikationen wie Bronchopneumonia und eitrige Bronchitis auf, die durch Sekundärinfektionen hervorgerufen werden, und für die meisten Todesfälle im Säuglingsalter verantwortlich sind. Neurologische Komplikationen wie Schlaganfälle und Enzephalopathien entstehen bei Kleinkindern möglicherweise als Folge einer Unterversorgung des Gehirns mit Sauerstoff, die aus den starken Hustenattacken und/oder der Wirkung des Pertussis Toxins resultiert (Steinman *et al.*, 1985). Es wird immer wieder von Patienten mit neurologischen Störungen, die erst nach einer Impfung mit einem inaktivierten Gesamtzell-Impfstoff (wP, *whole cell vaccine*) aufgetreten waren (Schupper und Shuper, 2007), berichtet.

In den meisten Industrieländern ist die Krankheit durch eine gute Grundimmunisierung unter Kontrolle gebracht worden, da eine präventive Impfung gegen Pertussis genutzt wird. Gerade in Deutschland existieren starke regionale Unterschiede in der Grundimmunisierung, so dass die Krankheit aufgrund einer allgemeinen Impfmüdigkeit wieder zunimmt. Für die Impfung werden Gesamtzell-Impfstoffe, die eine Suspension von Formalin-inaktivierten *B. pertussis*-Zellen enthalten, oder seit 1995 verschiedene azelluläre Impfstoffe (aP) verwendet. Diese azellulären Impfstoffe sind für die Grundimmunisierung ab dem dritten Lebensmonat zugelassen und enthalten Kombinationen verschiedener Virulenzfaktoren von *B. pertussis*. Sie enthalten alle das Pertussis Toxin und häufig zusätzlich das filamentöse Hämagglutinin, fimbrielle Antigene und/oder Pertactin in gereinigter und inaktivierter Form und in unterschiedlicher Zusammensetzung. Diese Mehrkomponentenwirkstoffe weisen gegenüber den Vollbakterienimpfstoffen eine geringere Nebenwirkungsrate sowie eine meist höhere Effektivität auf. Die Grundimmunisierung umfasst in der Regel vier Injektionen, die meist als Kombinationsimpfstoff Diphtherie-Tetanus-Pertussis verabreicht werden. Seit 1995 empfiehlt die Ständige Impfkommission der Bundesregierung (STIKO) eine Immunisierung aller Säuglinge und Kleinkinder gegen Pertussis. In den letzten Jahren konnte jedoch vor allem in Australien, Kanada und den USA ein erhöhtes Auftreten von

Keuchhusten bei Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen beobachtet werden (McIntyre *et al.*, 2000; Skowronski *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2003). Ein erworbener Impfschutz durch Immunisierung oder Erkrankung lässt im Laufe der Zeit nach, so dass als Kleinkinder geimpfte Personen im Erwachsenenalter erneut an Pertussis erkranken können (Hahn *et al.*, 2005). In den letzten 15 Jahren verbreitete sich *B. pertussis* in den Industrieländern hauptsächlich bei Jugendlichen und Erwachsenen, bei denen die Krankheit aufgrund der Grippe-ähnlichen Symptome nicht als Pertussis erkannt wurde (Cherry, 2005). Diese infizierten Personen stellen als Erregerreservoir ein großes Gesundheitsrisiko für Neugeborene und Säuglinge dar, da diese noch zu jung sind, um gegen Pertussis geimpft zu werden (Guiso, 2005).

Keuchhusten ist in erster Linie eine Toxin-vermittelte Infektionskrankheit. Bei der Pathogenese haftet das Bakterium mit Hilfe der Fimbrien an das zilienträgende Flimmerepithel im Respirationstrakt, was zusätzlich durch das Pertussis Toxin sowie die Adhäsine Pertactin und filamentöses Hämagglutinin stabilisiert wird. *B. pertussis* vermehrt sich im Wirt und bewirkt durch die Produktion von Toxinen die Lyse der Zilien. Die dadurch hervorgerufenen Veränderungen lösen eine Entzündung des Respirationstraktes aus, die schließlich die für den Keuchhusten typischen Hustenattacken zur Folge hat.

Die Erreger werden in der Regel bei Hustenstößen durch Tröpfcheninfektion übertragen. Häufig erfolgt diese Übertragung unbewusst auf einen größeren Personenkreis, da sich die als Infektionsquelle geltenden Patienten noch im Stadium vor dem Auftreten typischer Keuchhustensymptome befinden und die vorliegenden Symptome eher auf eine Erkältungskrankheit hindeuten (Bolag und Matter, 1992).

Die Inkubationszeit der Krankheit beträgt ein bis zwei Wochen. Die Erkrankung wird in drei Phasen gegliedert und hat eine Dauer von etwa sechs bis zehn Wochen. In der ersten Phase dem *Stadium catarrhale* treten typische Erkältungssymptome wie erhöhte Temperatur, Schnupfen, tränende Augen, Abgeschlagenheit und trockener Husten auf. Nach ein bis zwei Wochen beginnt das *Stadium convulsivum* mit einer Dauer von ein bis sechs Wochen, die sich in Einzelfällen sogar auf bis zu 20 Wochen ausdehnen kann. Es zeichnet sich durch plötzlich auftretende Hustenattacken mit mehreren aufeinander folgenden, krampfartigen Anfällen, gefolgt von laut keuchendem Einatmen bis hin zu starkem Speichel- und Schleimfluss bzw. Erbrechen aus. Diese Symptome sind auf die mittlerweile fast vollständige Zerstörung des Flimmerepithels durch das Bakterium zurückzuführen und sollen zur Reinigung der Schleimhäute dienen. Sie treten nachts häufiger als tagsüber auf. Das dritte abschließende *Stadium decrementi* hält drei bis sechs

Wochen an und ist durch langsam abnehmende Hustenattacken und somit abklingende Symptome charakterisiert. In dieser Phase kommt es zur vollständigen Genesung und Regeneration des respiratorischen Trakts (Hahn *et al.*, 2005).

2.1.3 Das Pertussis Toxin

Das Pertussis Toxin (PT) ist für die Pathogenese des Keuchhustens von entscheidender Bedeutung und stellt einen wichtigen Virulenzfaktor des human-pathogenen Stäbchenbakteriums *B. pertussis* dar (Weiss und Hewlett, 1986, Mattoo und Cherry, 2005). Das Protein verfügt über ein Molekulargewicht von 105 kDa und ist als Hexamer aus den sechs nicht kovalent miteinander verknüpften Untereinheiten S1 bis S5, die im Verhältnis 1:1:1:2:1 vorliegen, aufgebaut. Es zeigen sich signifikante strukturelle Homologien mit anderen bakteriellen Toxinen wie dem Cholera Toxin von *Vibrio cholerae* und dem Shiga Toxin von *Shigella dysenteriae* (Babu *et al.*, 2001).

PT ist ein bakterielles Exotoxin mit einem typischen AB-Motiv, das über eine enzymatisch aktive A-Untereinheit und eine B-Komponente, die an Sialoglycoproteine auf der Zielzelle bindet, verfügt (Tamura *et al.*, 1982). Die dreidimensionale Struktur des PT ist in der Abbildung 2.1 dargestellt (Schmitt *et al.*, 1999). Die A-Komponente, die über eine ADP-Ribosyltransferaseaktivität verfügt, besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette und wird als S1-Untereinheit (26,2 kDa) bezeichnet.

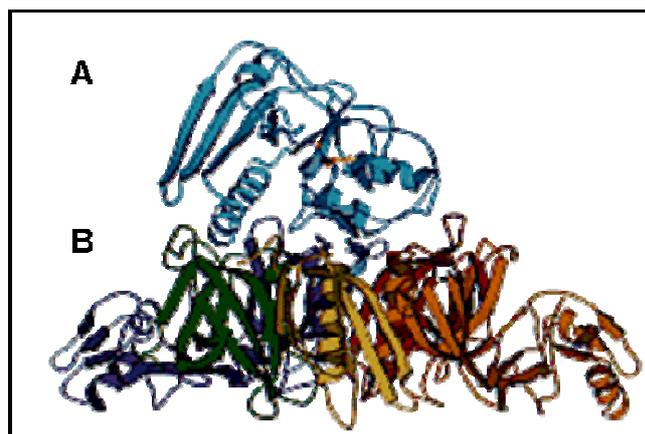


Abb. 2.1: Struktur des Pertussis Toxins. Dargestellt werden die A-Untereinheit in blau sowie die B-Komponente bestehend aus einer Kopie der Untereinheiten S2, S3 und S5 sowie zwei Kopien der Untereinheit S4. Die B-Komponente bindet an Rezeptoren der Zielzelle und ist notwendig, um die enzymatisch aktive A-Untereinheit in die Zielzelle einzuschleusen (Schmitt *et al.*, 1999).

Die B-Komponente des Toxins, die die Bindestelle für die eukaryotischen Rezeptoren trägt, ist ein Oligomer bestehend aus fünf Untereinheiten: je eine Kopie der Untereinheiten S2 (21,3 kDa), S3 (21,9 kDa) und S5 (11,7 kDa) sowie zwei Kopien der Untereinheit S4

(12,2 kDa). Diese schließen sich zu einer ringförmigen Struktur mit einer zentralen Pore zusammen, in welcher der C-Terminus der S1-Untereinheit liegt (Stein *et al.*, 1994).

B. pertussis sezerniert das PT als inaktives Proenzym, das *in vitro* über keine ADP-Ribosyltransferaseaktivität verfügt. Die B-Komponente vermittelt die Anbindung an die Sialoglycoproteine auf der Zelloberfläche der Zielzelle, und ermöglicht so der enzymatisch aktiven A-Untereinheit die Aufnahme und Translokation in das Zytoplasma. Die Aktivität des Enzyms setzt bei Eindringen in die Zielzelle durch Rezeptor-vermittelte Endozytose und Erreichen des Golgi-Apparates und Endoplasmatischen Retikulums über retrograden Transport ein (El Bayâ *et al.*, 1997; Kügler *et al.*, 2007). Dabei erfolgt die Aufnahme und der weitere Transport des Toxins mit Hilfe von Clathrin-coated pits und Akkumulation in Lysosomen und MVBs (*microvesicular bodies*) (Kügler *et al.*, 2007).

Das Pertussis Toxin ist ein ADP-ribosylierendes Toxin und verwendet NAD als Donormolekül, um es in Nikotinsäureamid und ADP-Ribose zu spalten. Der Zucker wird auf den Cysteinrest 352 in der Nähe des C-Terminus der α -Untereinheit heterotrimerer inhibitorischer G-Proteine übertragen (West *et al.*, 1985; Kaziro *et al.*, 1991). Da die Rezeptor erkennende Domäne im C-Terminus der α -Untereinheit liegt, wird durch die ADP-Ribosylierung die Interaktion der G-Proteine mit ihrem Rezeptor unterbunden und so ihre Aktivierung verhindert (Conklin *et al.*, 1993). Diese Konformationsänderungen führen zu einer Dissoziation der α -Untereinheit und des $\beta\gamma$ -Komplexes. Aus der Entkopplung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren folgt eine Inhibierung verschiedener Signaltransduktionswege (Hsia *et al.*, 1984). Eine weitere Folge der ADP-Ribosylierung ist eine Aktivierung der membranständigen Adenylatzyklase, was in manchen Zelltypen zu einem unkontrollierten Anstieg des zellulären cAMP-Spiegels führt (Katada und Ui, 1982a, b; Brückener *et al.*, 2003). Aus dem erhöhten cAMP-Spiegel resultieren eine Störung vieler zellulärer Funktionen sowie eine Abnahme der Phagozytoseaktivität.

Heterotrimere G-Proteine, bestehend aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit, sind in ihrer inaktiven Form mit gebundenem GDP an der Membran lokalisiert und in die Signaltransduktion involviert. Die Aktivierung der G-Proteine erfolgt durch einen Rezeptor-vermittelten Austausch des an die α -Untereinheit gebundenen GDP gegen GTP, was eine Dissoziation der G-Proteine in die α -Untereinheit und $\beta\gamma$ -Untereinheit sowie eine Ablösung vom Rezeptor zur Folge hat. Der freigesetzte $\beta\gamma$ -Komplex der G-Proteine kann mit verschiedenen Signalsystemen interagieren und diese regulieren. Zur Inaktivierung wird mit Hilfe der GTPase-Aktivität der α -Untereinheit ein Phosphatrest vom GTP

abgespalten, so dass die α -Untereinheit mit gebundenem GDP erneut mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit assoziiert (Kaziro *et al.*, 1991) (s. Abb. 2.2).

Mittlerweile sind über 20 unterschiedliche α -Untereinheiten bei Säugetieren bekannt. G-Proteine werden in stimulierende (G_s) und inhibierende G-Proteine (G_i) sowie $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12}$ unterteilt. Proteine der $G\alpha_q$ - und $G\alpha_{12}$ -Klasse werden durch bakterielle Toxine nicht beeinflusst (Strathmann und Simon, 1991; Hepler und Gilman, 1992).

Das Cholera Toxin von *Vibrio cholerae* zeigt strukturelle Homologien zu PT und verfügt ebenfalls über ein typisches AB_5 Motiv. Die enzymatisch aktive A-Untereinheit von CT ADP-ribosyliert hingegen die GTP-gebundenen $G\alpha$ -Untereinheiten stimulierender G-Proteine. Diese Modifikation führt zu einer Stimulierung der Aktivität der Adenylatzyklase und resultiert in einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration.

Die Abbildung 2.2 fasst schematisch die Wirkung von PT auf die α -Untereinheiten heterotrimerer inhibierender G-Proteine bzw. die Wirkung von CT auf die α -Untereinheiten stimulierender G-Proteine zusammen.

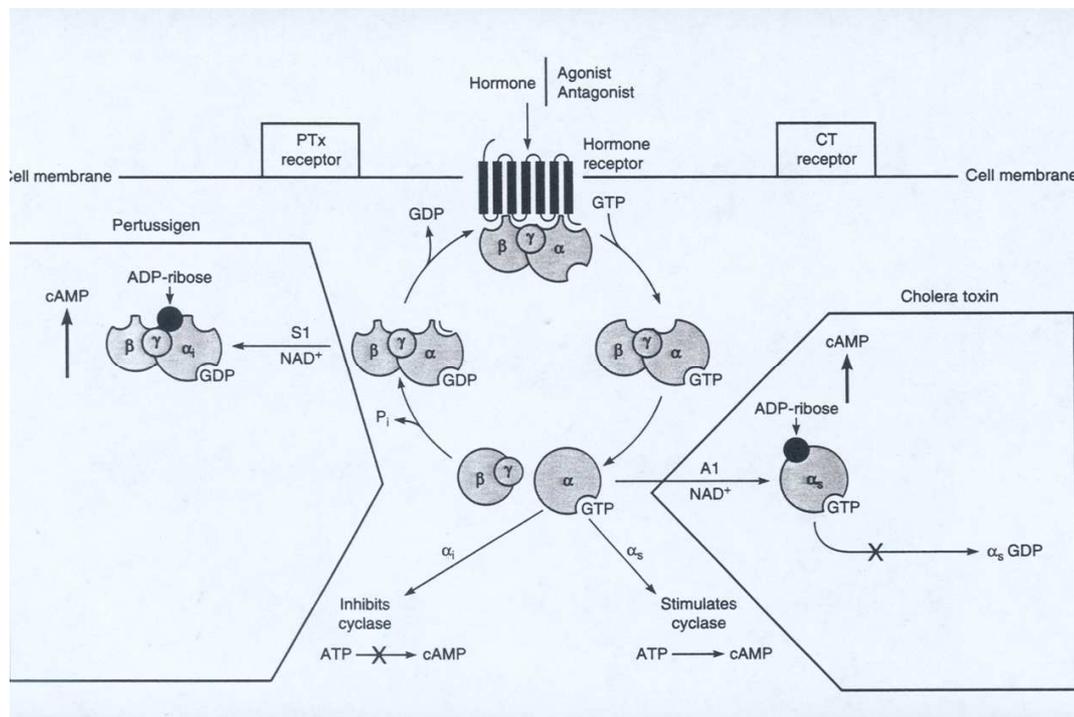


Abb. 2.2: Wirkung von PT auf die α -Untereinheiten heterotrimerer inhibierender G-Proteine bzw. von CT auf die α -Untereinheiten stimulierender G-Proteine. Dargestellt werden der Zyklus der G-Proteine, das heißt der Wechsel zwischen der GDP- und GTP-gebundenen Form sowie die Auswirkungen der Modifikationen der α -Untereinheiten durch PT bzw. CT auf die entsprechenden G-Proteine, die Adenylatzyklase und den cAMP-Spiegel.

2.2 Hirnendothelzellen

Hirnendothelzellen kleiden die inneren Flächen der Blutkapillaren des Gehirns aus und weisen zu anderen Endothelzellen des Körpers einige Unterschiede auf. Aufgrund ihrer Eigenschaften sind sie für die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke verantwortlich.

2.2.1 Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke dient als physiologische Diffusionsbarriere zwischen dem Blutkreislauf und dem Gehirn und sorgt für eine nahezu komplette Isolierung des Zentralen Nervensystems (ZNS) vom restlichen Körper. Durch diese Schutzfunktion verhindert sie den Übertritt im Blut zirkulierender Krankheitserreger, Toxine und hydrophiler Botenmoleküle in das Gehirn. Aufgrund dieser Barrierebildung werden stärkere Schwankungen im Gehirnmilieu sowie Erkrankungen durch Pathogene ausgeschlossen. Die Blut-Hirn-Schranke ist somit von essentieller Bedeutung für die normale Funktion des ZNS und die Aufrechterhaltung der Homöostase.

Zum Transport wichtiger Nährstoffe wie Glucose und Aminosäuren in das Gehirn liegen spezialisierte Systeme wie Natrium-Kalium-ATPase Enzymsysteme oder Aminosäuretransportsysteme vor (Chaudhuri, 2000). Lipophile Substanzen wie fettlösliche Vitamine, Sauerstoff, Kohlendioxid aber auch Alkohol, Heroin und Nikotin können über Diffusion die Blut-Hirn-Schranke passieren. Verschiedene Krankheiten des ZNS wie z.B. Schlaganfälle, Hirntumore, Autoimmunerkrankungen und traumatische Hirnverletzungen können eine Veränderung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zur Folge haben (Gloor, 2001).

Die Blut-Hirn-Schranke wird aus den Astrozyten, den Perizyten und den Endothelzellen aufgebaut (Reese und Karnovsky, 1967). Die Astrozyten verleihen den Blutkapillaren einen mechanischen Schutz und umschließen mit ihren Endfüßen die Perizyten, die Basallamina und die Endothelzellen. Perizyten sind in kleinen Blutgefäßen, wie Kapillaren, Venen und Arterien lokalisiert und umschließen die Endothelzellen. Sie spielen offenbar eine Schlüsselrolle in der Angiogenese, der strukturellen Integrität und Differenzierung der Blutgefäße sowie der Bildung von endothelialen *tight junctions* (TJ) (Ballabh *et al.*, 2004). Perizyten sind in die Basallamina eingebettet und in unregelmäßigen Abständen mit den Endothelzellen verbunden. Die Basallamina ist eine 30–40 nm dicke Proteinschicht und besteht aus Kollagen Typ IV, Heparinsulfat, Laminin, Fibronectin und

anderen Proteinen der extrazellulären Matrix (Farkas und Luitas, 2001). In Abbildung 2.3 ist der Querschnitt einer typischen zerebralen Blutkapillare dargestellt.

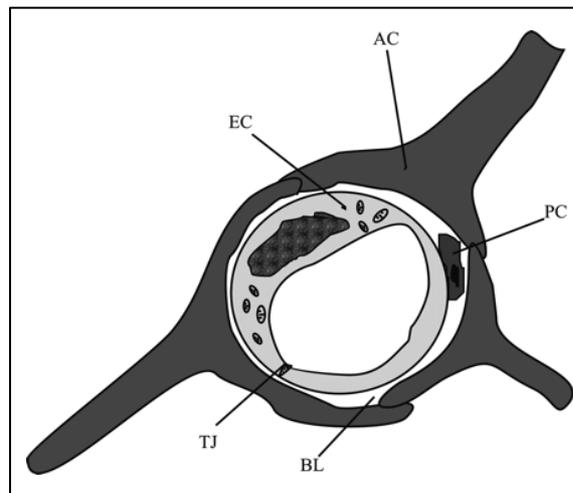


Abb. 2.3: Schematische Darstellung eines Querschnitts durch eine zerebrale Kapillare. Das Kapillarlumen ist von einer einzelnen Endothelzelle (EC) umgeben, wobei die beiden Enden der Zelle durch *tight junctions* (TJ) verbunden werden. Auf der dem Lumen abgewandten Seite liegen die Perizyten (PC). Diese und die EC werden von der Basallamina (BL) umschlossen. Die BL ist mit den Plasmamembranen der Astrozyten (AC) und den ECs verknüpft (Hawkins und Davis, 2005).

Endothelzellen kleiden die inneren Flächen der Blutgefäße des Gehirns aus und sind für die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke verantwortlich (Reese und Karnovsky, 1967). Diese zerebralen kapillaren Endothelzellen weisen zu den Endothelzellen anderer Gewebe im Körper einige Unterschiede auf. Sie verfügen über eine größere Anzahl an Mitochondrien (Oldendorf *et al.*, 1977), eine geringere Pinozytose-Aktivität (Sedlakova *et al.*, 1999), eine extrem geringe Durchlässigkeit aufgrund einer größeren Anzahl an *tight junctions* (TJ) (Gloor, 2001) und sie besitzen keine Interzellularräume (Fenstermacher *et al.*, 1988). Die humanen Hirnendothelzellen sind durch zwei verschiedene Typen von Zellkontakten miteinander verknüpft, den *tight junctions* und *adherens junctions*.

2.2.2 *Tight junctions* und *adherens junctions*

Tight junctions (TJ) sind undurchlässige Zell-Zell-Verbindungen, die zwischen den zerebralen Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke liegen. Sie gewährleisten als feste Verbindung zwischen den Zytosketten benachbarter Zellen eine Abdichtung der Zellen. Die Abbildung 2.4 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer humanen Blut-Hirn-Schranke mit *tight junctions* (Ballabh *et al.*, 2004).

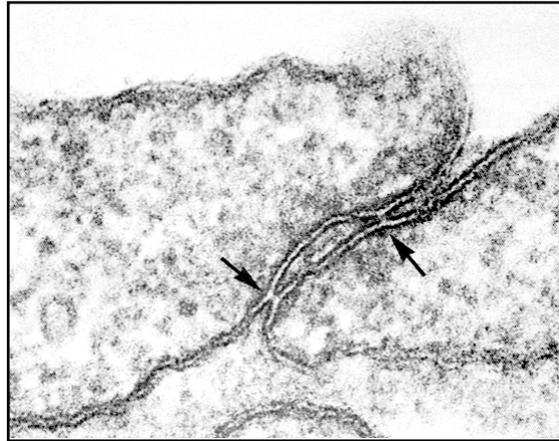


Abb. 2.4: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer humanen Blut-Hirn-Schranke mit *tight junctions* zwischen zerebralen Endothelzellen. Die Pfeile kennzeichnen die *tight junctions* (Ballabh *et al.*, 2004).

Tight junctions stellen eine spezielle Art von Zellkontakten dar und üben zwei wichtige Barrierefunktionen aus. Zum einen bilden sie eine Diffusionsbarriere zwischen den Zellen und verhindern somit fast vollständig einen parazellulären Transport nicht-membrangängiger Substanzen. Zum anderen unterbinden sie die freie Diffusion von Komponenten der Plasmamembran wie Membranproteine und -lipide, und tragen zur Aufrechterhaltung der Zellpolarität bei, da die unterschiedliche Protein- und Lipidzusammensetzung der apikalen und basolateralen Zellmembran erhalten bleibt.

TJ sind als multifunktionale Komplexe mit den drei integralen Membranproteinen Claudin, Occludin und *junctional adhesion molecule* (JAM), den zytoplasmatischen Proteinen wie z.B. die Familie *zonula occludans* (ZO) und Cingulin sowie den zytosolischen und nukleären Proteinen (Regulatorproteine, transkriptionale und posttranskriptionale Faktoren sowie Tumorsuppressoren) aus einer Vielzahl von Proteinen aufgebaut (Schneeberger und Lynch, 2004). Die zytoplasmatischen Proteine verbinden Membranproteine mit Aktin, das als Zytoskelettprotein für die Aufrechterhaltung der funktionellen und strukturellen Integrität des Endothels verantwortlich ist (Ballabh *et al.*, 2004; Bourdoulous *et al.*, 2010).

Die Interaktionen zwischen den verschiedenen Proteinen werden in Abbildung 2.5 zusammengefasst dargestellt (Bourdoulous *et al.*, 2010).

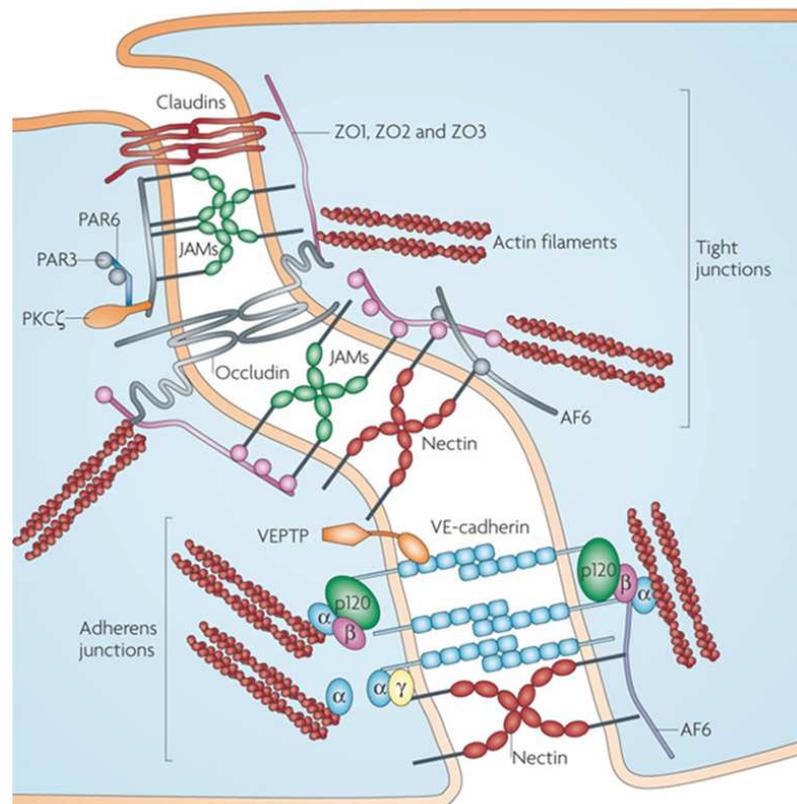


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Proteininteraktionen an der Blut-Hirn-Schranke. Bei den *tight junction* (TJ) Proteinen Occludin, den Claudinen und den *junctional adhesion molecules* (JAM) handelt es sich um Transmembranproteine. Die TJ Proteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3 stellen zytosomatische Proteine dar, die mit Occludin, den Claudinen und JAMs interagieren und mit Aktin verbunden sind, wodurch große Proteinkomplexe entstehen. Die *adherens junctions* (AJ) sind vertreten durch VE-Cadherin, die direkt an verschiedene Catenine (α , β , γ und p120), die wiederum mit Aktin verbunden sind, binden. Der PAR-3- PKC ζ -PAR-6-Polaritätskomplex spielt eine zentrale Rolle in der Bildung der TJ und Zellpolarität. Nectin ist an der Organisation von *tight* und *adherens junctions* beteiligt (Bourdoulous *et al.*, 2010).

Die *adherens junctions* (AJ) sind aus Cadherin-Catenin-Komplexen und assoziierten Proteinen aufgebaut. Catenine stellen eine Verbindung zum Aktinzytoskelett her und binden an die Cadherine, die als Transmembranproteine die Plasmamembran einmal durchspannen (Kemler, 1993). Durch diesen Komplex bilden die AJ eine feste Verbindung zwischen den Zytoskeletten benachbarter Zellen und gewährleisten einen mechanischen Zusammenhalt der Zellen.

2.2.3 Einfluss des Pertussis Toxins auf die Blut-Hirn-Schranke

Bei einer Erkrankung durch *B. pertussis* ist hauptsächlich der Respirationstrakt betroffen. Jedoch stellen neurologische Schäden und Enzephalopathien ernsthafte Komplikationen als Folge einer Pertussis-Infektion dar. In seltenen Fällen konnten solche Komplikationen auch nach einer Impfung gegen Keuchhusten mit Gesamtzell-Vakzinen beobachtet werden (Menkes und Kinsbourne, 1990; Schupper und Shuper, 2007). Es wird vermutet, dass an

diesen Komplikationen das Pertussis Toxin ursächlich beteiligt sein könnte. Welchen konkreten Einfluss das Toxin an diesen Prozessen hat, ist allerdings noch nicht bekannt. Möglicherweise löst das Toxin eine Veränderung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke aus. So konnte gezeigt werden, dass eine Injektion von abgetöteten Pertussis-Organismen in Mäusen eine Zunahme der Permeabilität des zerebralen Vaskularsystems nach 24 Stunden bewirkt (Amiel, 1976). Außerdem wird PT seit Jahren auch in immunologischen Studien eingesetzt, um bei Versuchstieren eine Beschleunigung des Ausbruchs von Autoimmunkrankheiten herbeizuführen (Munoz, 1985). Als Modellsystem für Multiple Sklerose dient z.B. die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE). Diese kann bei Versuchstieren induziert werden, indem ZNS-Gewebehomogenat oder Myelinantigene injiziert werden. Durch die Injektion von PT kann die EAE beschleunigt und verstärkt hervorgerufen werden. Wie PT die Entwicklung verstärkt, ist noch ungeklärt; es wird vermutet, dass es zur Erhöhung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke kommt (Linthicum *et al.*, 1982; Lehmann und Ben-Nun, 1992; Yong *et al.*, 1993; Ben-Nun *et al.*, 1997).

Um fundiertere Kenntnisse über die Auswirkungen des Pertussis Toxins auf die Integrität zerebraler Barrieren zu erhalten, wurden Zwei-Kompartiment-Systeme als Zellkultur-Modelle der Blut-Hirn-Schranke mit humanen zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen (HBMEC) etabliert (Stins *et al.*, 1997). Bei dieser Zelllinie, aber auch bei isolierten zerebralen Kapillarendothelzellen, konnte eine durch das Pertussis Toxin ausgelöste erhöhte Permeabilität und eine Verringerung des transendothelialen Widerstandes (*transendothelial electrical resistance*, TER) gezeigt werden (Brückener *et al.*, 2003; Kügler *et al.*, 2007). Diese Abnahme des TER kann auf die ADP-Ribosyltransferaseaktivität der A-Komponente zurückgeführt werden, da hingegen das B-Oligomer des Toxins keine Veränderung des TER bewirkt (Kügler *et al.*, 2007).

2.3 Die Migration von Endothelzellen

Bei der Migration von Zellen handelt es sich um einen komplexen Prozess, der in multizellulären Organismen einen sehr wichtigen Vorgang darstellt und für die normale Entwicklung von Zellen von essentieller Bedeutung ist.

2.3.1 Der Migrationszyklus

Die Zellmigration basiert auf der Aktin-gesteuerten Translokation der Zellen und beinhaltet Veränderungen im Zytoskelett, in der Zell-Substrat-Adhäsion und der extrazellulären Matrix. Bei der Reorganisation der Zelle werden ein sich in Wanderungsrichtung bewegendes vorderes und ein sich nachziehendes hinteres Ende der Zelle festgelegt (cellmigration gateway). Der Prozess der Zellmigration unterteilt sich in einen Zyklus aus vier verschiedenen wiederkehrenden Schritten (Abb. 2.6): Verlängerung der Lamellipodien (1), Bildung neuer Adhäsionskontakte (2), Kontraktion des Zellkörpers (3) und Ablösen des hinteren Zellendes (4) (Lauffenburger und Horwitz, 1996).

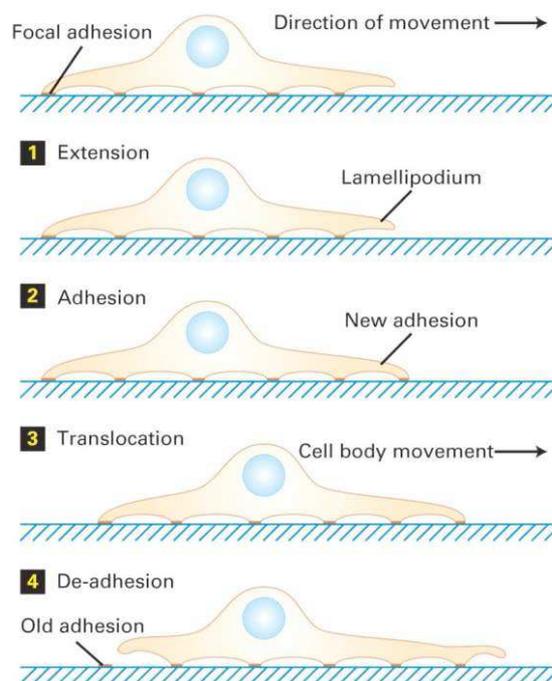


Abb. 2.6: Der Migrationszyklus. Eine migrierende Zelle bildet am Leitsaum, der die Richtung der Migration anzeigt, Lamellipodien mit vielen Filopodien (hier nur eins zur Vereinfachung eingezeichnet). Dabei ist sie über Fokaladhäsionen mit dem Substrat verbunden. Der Prozess der Migration wird in vier Einzelschritte unterteilt. Durch Aktinpolymerisation werden Membranausstülpungen in die Migrationsrichtung vorgeschoben (1) und am Leitsaum neue Adhäsionsstrukturen gebildet (2). Durch Kontraktion des Aktinzytoskeletts bewegt sich der Zellkörper vorwärts (3), und die alten Fokaladhäsionen am hinteren Ende der Zelle werden abgelöst (4). Dieser Zyklus wiederholt sich zur Fortbewegung der Zelle wiederkehrend (Nordheim, 2008).

Die Initiation der Migration erfolgt als Antwort auf Signale von benachbarten Zellen, der extrazellulären Matrix und/oder sich ausbreitender diffusionsfähiger Faktoren. Der erste Schritt des Migrationszyklus beginnt mit der Polarisierung der Zelle durch eine aktive Aktinpolymerisation und der Bildung neuer Membranausstülpungen am „*leading edge*“, dem sogenannten Leitsaum der Zellen, der die Richtung der Wanderung anzeigt. Dabei werden Lamellipodien, blattartige Strukturen mit einem Netzwerk an Aktin-Filamenten,

und viele Filopodien, fingerartige Strukturen mit dünnen parallelen Aktin-Filament-Bündeln, gebildet. An diesem Prozess der Polarisierung sind Cdc42, die atypische Proteinkinase C (aPKC) sowie die PAR-Proteine PAR-3 und PAR-6 beteiligt (cellmigration gateway). Diese Veränderungen in der Aktinorganisation spielen eine große Rolle bei der Wundheilung von Endothelzellen. So verhindert z.B. Cytochalasin B, ein Inhibitor der Aktinpolymerisation, die Migration der Zellen sowie das durch Lamellipodien-vermittelte schnelle Schließen einer Wunde (Selden und Schwartz, 1979; Aepfelbacher *et al.*, 1997).

Im zweiten Schritt werden am Leitsaum neue Adhäsionsproteine zur Verankerung der Zelle mit dem Substrat gebildet. Die Translokation und somit Fortbewegung des Zellkörpers erfolgt durch die Myosin II-vermittelte Kontraktilität der Zelle. Die Aktinstressfasern werden durch das Gleiten des Motorproteins Myosin II verkürzt, was eine Kontraktion der Zelle auslöst (Schritt 3). Zur Ablösung der alten Fokaladhäsionen spielen Zellkräfte eine große Rolle und sind zur Auflösung der alten Verankerung unbedingt notwendig. Wenn die Anheftung des Leitsaums im vorderen Teil der Zellen an die Matrix die Adhäsion des hinteren Saums der Zelle ausgleicht, bewegt sich das hintere Ende nach vorne (Wolf und Friedl, 2009).

2.3.2 Der Prozess der Zellmigration

Der Prozess der Zellmigration ist einer der wichtigsten Vorgänge in multizellulären Organismen und für eine normale Entwicklung der Zellen von essentieller Bedeutung. Die Zellmigration spielt eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von Organismen, aber auch bei der Immunantwort und der Wundheilung (Weijer, 2009).

Die kontrollierte Organisation der Zellbewegung, wie z.B. die Migration von Immunzellen aus dem Blutkreislauf in das entzündete Gewebe, stellt im adulten Organismus einen lebensnotwendigen Prozess dar. Bei der Wundheilung ist zum effizienten Schließen der Wunde ein koordiniertes Zusammenspiel zwischen Migration und Verteilung der Zellen am Rand der Wunde sowie Proliferation und Angiogenese erforderlich (Chaudhuri *et al.*, 2006). Dabei wandern Endothelzellen aus bereits bestehenden Blutgefäßen, proliferieren und bilden zusammen mit vaskulären glatten Muskelzellen und Perizyten ein neues kapillares Netzwerk (Davis und Senger, 2005; Lamalice *et al.*, 2007). Die Bildung von Blutgefäßen, von großen Arterien bis zu sehr kleinen Kapillaren, hängt von einer guten Zelladhäsion an der extrazellulären Matrix sowie

einer gut organisierten Zellbewegung ab (Reinhart-King, 2008). Die Migration von Endothelzellen ist daher entscheidend für die Prozesse der Wundheilung und Angiogenese. Liegt im Körper eine unkontrollierte Zellmigration vor, kann es zu fatalen Auswirkungen kommen. So können metastasierende Zellen ihre Fähigkeit zur Migration zurückerlangen, in gesundes Gewebe eindringen und dort Tumore ausbilden. Die Zellmigration spielt bei vielen Erkrankungen eine wichtige Rolle, so dass eine Verhinderung der Migration bestimmter Zelltypen die Entwicklung von Krankheiten wie Krebs, Arteriosklerose und chronischen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis hemmen würde.

Die Zellbewegung wird in unterschiedliche, zellspezifische Migrationsmuster unterteilt. Dabei wird zwischen der Einzelzell-Migration wie bei den Leukozyten und Lymphozyten und der kollektiven Migration von Endothel- und Epithelzellen unterschieden. Bei der Einzelzell-Migration können die Zellen eine bestimmte Entfernung schnell zurücklegen, was bei der Immunantwort eine wesentliche Rolle spielt. Die Einzelzell-Migration kann nach der Bildung von Zell-Zell-Kontakten in die kollektive Migration übergehen. Bei der kollektiven Migration bleiben die Zellen über Zell-Zell-Kontakte miteinander verbunden und wandern gemeinsam als Gewebe. Sie spielt eine Schlüsselrolle in Entwicklungsprozessen wie der Gastrulation oder der Organogenese. In vielen Fällen wandern individuelle Zellen über große Distanzen aktiv in großen, eng miteinander interagierenden Ansammlungen. Sie können sich aber auch in Schichten, in denen ein limitierter Austausch zwischen den benachbarten Zellen stattfindet, bewegen (Weijer, 2009). Es ist wenig darüber bekannt, wie sie sich in den Schichten fortbewegen, da sie über eine stark ausgeprägte apikal-basale Polarität verfügen und an der apikalen Seite miteinander über *adherens junctions* und *tight junctions* und an der basalen Seite über die Basallamina interagieren. Diese Interaktionen begrenzen die Bewegung der Zellen innerhalb der Schicht und limitieren mögliche Neuarrangements (Zallen und Blankenship, 2008).

2.3.3 Intrazelluläre Signalwege, die an der Zellmigration beteiligt sind

Die Zellmigration wird häufig als Antwort auf extrazelluläre Signale initiiert. Diese Signale werden von angrenzenden Zellen, der extrazellulären Matrix und/oder chemotaktischen Faktoren übermittelt, stimulieren Transmembranrezeptoren und lösen so die intrazelluläre Weiterleitung aus. An diesen Prozessen der Koordination der Regulation der Zellantworten und der Zellmigration können zahlreiche Signalmoleküle wie Ca^{2+} -regulierte Proteine, kleine GTPasen, Mitogen-aktivierte Proteinkinasekaskaden (MAPK), Proteinkinase A,

Proteinkinase C, Phospholipase C und D sowie Tyrosin-Kinasen beteiligt sein (Ridley, 2001).

Die kleinen Rho-GTPasen sind zentrale Regulatoren des Zytoskeletts (Nobes and Hall 1995). Zu dieser Proteinfamilie mit einer Masse von 20 bis 40 kDa zählt neben RhoA und Cdc42 auch Rac. Diese GTPasen spielen bei der Zellmigration eine wichtige Rolle. Kleine GTPasen der Rho-Familie regulieren die Aktinpolymerisation und Depolymerisation sowie die Aktivität von Aktin-assoziiertem Myosin (Hall, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die ADP-Ribosyltransferasen von *Clostridium botulinum* und *Staphylococcus aureus* sowie die Glucosyltransferase von *Clostridium difficile* die Migration von Endothelzellen inhibieren, da diese eine Deaktivierung von Rho-GTPasen auslösen und dadurch die Bildung von Aktinfilamenten und fokalen Adhäsinen verhindert wird (Aepfelbacher *et al.*, 1997). Zusätzlich regulieren Rho-GTPasen andere an der Zellbewegung beteiligte Prozesse wie die Zell-Substrat-Adhäsion, die Zell-Zell-Adhäsion, die Proteinsekretion und die Transkription (Ridley, 2001). Die kleine Rho-GTPase Cdc42 ist essentiell für die Bildung von Aktin-Strukturen wie Filopodien, mit denen z.B. Makrophagen chemoattraktive Gradienten wahrnehmen (Allen *et al.*, 1998). Über die Aktivierung der kleinen GTPase Rac werden aktinhaltige Lamellipodien induziert (Ridley *et al.*, 1992; Ridley und Hall 1992; Miki und Yamaguchi, 2000), während die Kontraktion des nachwandernden Zellteils durch die GTPase Rho gesteuert wird (Chrzanowska-Wodnicka und Burridge, 1996).

Exogene Wachstumsfaktoren wie der Epidermiswachstumsfaktor (EGF, *epidermal growth factor*) und der Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF, *fibroblast growth factor*) zeigen einen positiven Effekt auf die Migration und stimulieren nach einer *in vitro* Verwundung die Wanderung von Endothelzellen verschiedener Spezies. Die FGF-2 vermittelte Migration läuft dabei über Pertussis Toxin sensitive GTP-bindende Proteine. Das Pertussis Toxin wird in solchen Untersuchungen zur Inaktivierung inhibierender G-Proteine und daraus resultierender Inhibierung einiger Signaltransduktionswege eingesetzt. Der spezifische Effekt des Toxins auf die Migration wurde dabei vernachlässigt bzw. wenig untersucht (Rieck *et al.*, 2001). Zusätzlich konnte die essentielle Beteiligung inhibitorischer G-Proteine an der gerichteten Migration von Keimzellen beim Zebrafisch gezeigt werden (Dumstrei *et al.*, 2004).

Neben den inhibierenden G-Proteinen sind im weiteren Signaltransduktionsweg Proteine der Phosphatidylinosit-3-Kinase-Familie (PI3K) an der Migration vieler Zellen beteiligt. Im Zebrafisch benötigen Keimzellen für eine optimale Migration funktionale PI3K, die den

Zellen Beweglichkeit vermitteln. Eine Inhibierung der PI3K führt zu einer verlangsamten Migration der Keimzellen, was mit einer untypischen Zellmorphologie und reduzierten Filopodienstabilität korreliert (Dumstrei *et al.*, 2004). Bei primären Astrozyten aus Ratten führte eine Aktivierung des PI3K-Signalweges zu einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts und einer Migration der Astrozyten (Machide *et al.*, 2000). Bisher konnte nicht geklärt werden, welcher Effektor der PI3K die Aktivierung der Aktinpolymerisation, die für die Migration verantwortlich ist, vermittelt (Primo *et al.*, 2007). Auch bei den Signaltransduktionswegen, die an der inhibierenden Wirkung von PT auf die Migration von HBMEC beteiligt sind, könnte die PI3K eine Rolle spielen. Migrationsversuche mit Wortmannin, einem selektiven Inhibitor der PI3K, zeigen eine starke Hemmung der Migration von HBMEC, die sich bei Koinkubation mit PT noch verstärkt (Schulte, 2007). Die PI3K wird Rezeptor-vermittelt durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit heterotrimerer, inhibitorischer G-Proteine aktiviert. Eine PT induzierte ADP-Ribosylierung der G-Proteine verhindert die Aktivierung der PI3K und damit im weiteren Signaltransduktionsweg auch die Aktivierung der Proteinkinase C, einem nachrangigen Enzym der PI3K, das weitere Signalübertragungen verhindert.

Zu den PKC gehören Serin- und Threonin-Kinasen, die bei vielen Signaltransduktionswegen in eukaryotischen Zellen von essentieller Bedeutung sind (Toker, 1998). In Säugetieren sind mittlerweile mehr als zwölf unterschiedliche PKCs bekannt, die in drei Unterfamilien eingeordnet wurden: die konventionellen PKCs (cPKC) mit α , β I, β II und γ , die neue PKC-Familie (nPKC) mit δ , ϵ , η und τ und die atypischen PKCs (aPKC) mit ζ und λ . Mit PKC μ wird die Entdeckung einer weiteren PKC Familie vermutet, die auch als Proteinkinase D (PKD) bezeichnet wird. In humanen zerebralen Endothelzellen werden die PKC Isoformen α , δ , ϵ und ζ exprimiert. Die PKC scheint an den Migrationsprozessen beteiligt zu sein, da ihre Aktivierung die Anheftung, Verbreitung und Migration von Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) erhöht, und ihre Inhibierung diese Fähigkeiten der Zellen hingegen verringert (Kent, 1995).

Beim Zellmigrationszyklus stellt die Polarisierung der Zelle durch eine aktive Aktinpolymerisation und Bildung neuer Membranausstülpungen am „*leading edge*“ den ersten wichtigen Schritt dar. An diesem Prozess sind unter anderem die atypischen PKCs sowie Zellpolaritätsproteine wie PAR-3 (*partitioning defective 3*) und PAR-6 beteiligt, die einen Polaritätskomplex ausbilden (cellmigration gateway; Suzuki und Ohno, 2006). Diese Komplexe sind in den verschiedenen Organismen wie *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*

melanogaster und in Säugetiersystemen unterschiedlich benannt, übernehmen aber jeweils sehr ähnliche Aufgaben (Bloom *et al.*, 2004) (Abb. 2.7).

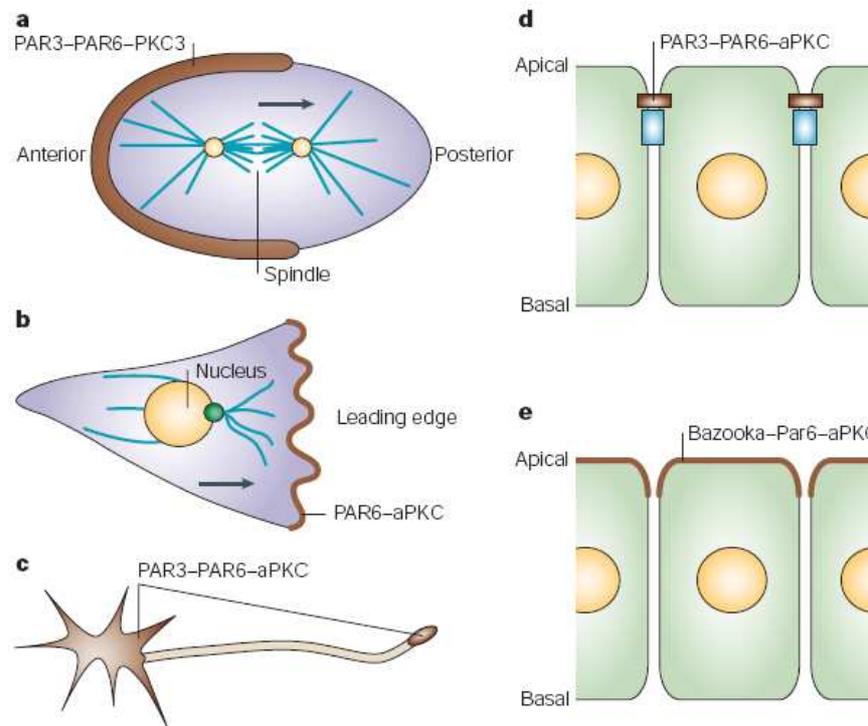


Abb. 2.7: An der Zellpolarität beteiligte Proteine bei *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und in Säugetiersystemen. In *C. elegans* sind PAR-3, PAR-6 und PKC3 am hinteren Teil der Zelle polarisiert (a). In migrierenden Zellen von Säugetieren sind Cdc42, PAR-6 und aPKC (humanes Homolog zu PKC3) am Leitsaum polarisiert (b). In Säugetierneuronen sind PAR-3, PAR-6 und aPKC im Zellkörper und am vorderen Ende der Axone lokalisiert (c). In Epithelzellen von Säugetieren polarisieren PAR-3, PAR-6 und aPKC an den *tight junctions* (braun), die mit den *adherens junctions* (blau) verbunden sind (d). In Epithelzellen von *Drosophila melanogaster* sind Bazooka (Homolog zu PAR-3), PAR-6 und aPKC asymmetrisch zum apikalen Kortex lokalisiert (e) (Bloom *et al.*, 2004).

Verschiedene in der Literatur beschriebene Untersuchungen am Zellpolaritätskomplex zeigten eine Beteiligung der Proteine PAR-3 (bzw. PKC3 oder Bazooka), aPKC und PAR-6 am Migrationsprozess. Dominant-negative Mutanten und siRNA-vermittelte Herunterregulierungen einzelner Komponenten des Komplexes resultierten in *Caenorhabditis elegans* in Veränderungen der Anordnung von *tight junctions* und der Bildung der Zellpolarität (Suzuki und Ohno, 2006). Eine Überexpression von PAR-3 verwandelt MDCK-Zellen in verlängerte gestreckte fibroblastische Zellen, die eine verstärkte Motilität aufweisen (Ohno *et al.*, 2002). Eine Herunterregulierung von PAR-6 oder PAR-3/Bazooka in *Drosophila melanogaster* resultiert in einer Desorganisation der Zellanordnung und einer verminderten Migration. Die für die Wanderung erforderlichen Transmembranproteine E-Cadherin und β_{ps} -Integrin zeigten nach der Herunterregulierung eine abnormale Verteilung (Pinheiro und Montell, 2004). In Endothelzellen sind PAR-3 und PAR-6 an den *adherens junctions* lokalisiert und bilden dort einen Komplex mit dem

vaskulär-endothelialen (VE-) Cadherin. Dieser Komplex spielt eine Rolle bei der apikal-basalen Polarität in Endothelzellen (Ebnet *et al.*, 2006). Die PAR-Proteine sind an einem Signaltransduktionsweg beteiligt, der sich mit vielen anderen, die zur Polarisierung migrierender Zellen führen, überschneidet. Wie das genaue Zusammenspiel zwischen den Proteinen aussieht ist bisher nicht näher bekannt (Macara und Goldstein, 2007).

Matrix Metalloproteinasen (MMP) sind eine Familie strukturell verwandter Enzyme, die Makromoleküle der extrazellulären Matrix degradieren. Die Genfamilie der humanen MMP umfasst zurzeit mindestens 19 Mitglieder. Sie werden in vier verschiedene Klassen eingeteilt, entweder auf Grundlage ihrer Domänen-Struktur und bevorzugten Substrate (z.B. Kollagenasen, Gelatinasen), oder durch ihre transmembrane Lokalisation, wie die Klasse membranständiger MMP (mt-MMP). MMPs sind in normalen physiologischen Prozessen wie der Neubildung von Gewebe bei der Embryonalentwicklung, der Angiogenese, der Wundheilung sowie bei Krankheiten wie metastasiertem Krebs und Arthritis beteiligt (Woessner und Nagase, 2000). Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Tournier zeigen, dass die Matrix Metalloprotease 9 aktiv an der Migration von humanen bronchialen Epithelzellen (HBEC) beteiligt ist. Eine Blockierung der Aktivierung oder Aktivität von MMP-9 äußert sich in einer reduzierten Migration (Tournier *et al.*, 1999). Eine Zugabe aktivierter MMP-2 stimuliert ebenfalls die Migration von Epithelzellen auf dem extrazellulären Matrixsubstrat Laminin 5 (Quaranta *et al.*, 2000).

2.3.4 Einfluss des Pertussis Toxins auf die Migration

Infektionen sind häufig mit einem verzögerten Schließen einer Wunde verbunden, was auf hohe Bakterienzahlen in Geweben zurückgeführt werden kann. Bakterien in niedrigen Zellzahlen können aber auch, bevor sie in das Gewebe eindringen, durch die Sekretion von Toxinen die Wundheilung inhibieren (Ovington, 2003). In vorangegangenen Untersuchungen wurde der Einfluss des vom Keuchhusten-auslösenden Bakterium *B. pertussis* sezernierten Pertussis Toxins auf die Wundheilung untersucht. Migrationsuntersuchungen zeigten eine verringerte Wanderung der Zellen bei Zugabe von PT von etwa 50% im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Stärke des inhibierenden Effektes ist abhängig von der eingesetzten Menge des Toxins und zeigt bei abnehmender Konzentration eine geringer werdende Hemmung. Ein Einfluss auf die Proliferation von HBMEC konnte ausgeschlossen werden, so dass der Effekt des verminderten Schließens

einer Wunde bei Zugabe von PT auf der Inhibierung der Migration der Zellen beruht (Schulte, 2007).

Zur Analyse der Zellmigration wurden in der Vergangenheit verschiedene Methoden entwickelt. Zur Beobachtung des Einflusses von PT auf die kollektive Migration von HBMEC wurden Edelstahlzylinder zur Erzeugung eines Spaltes verwendet und die Einwanderung der Zellen in diesen zellfreien Raum dokumentiert (Abb. 2.8).

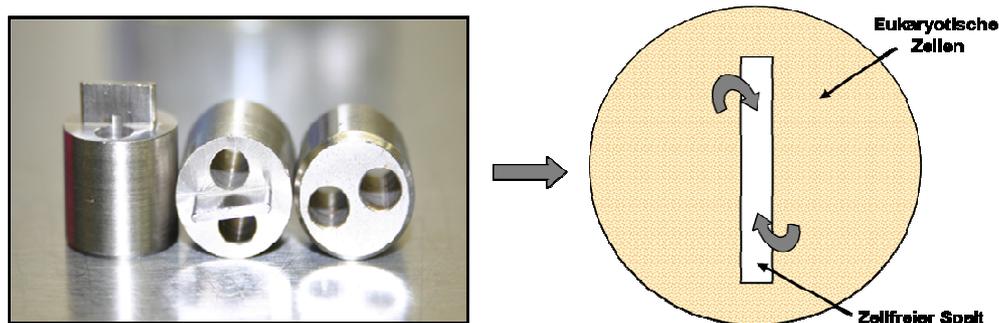


Abb. 2.8: Edelstahlzylinder zur Erzeugung eines zellfreien Spaltes. Die auf der linken Seite dargestellten Edelstahlzylinder werden vor dem Aussäen der Zellen mit der vorstehenden Kante nach unten in die 48-Well-Platten eingesetzt. Die Zellen werden von oben durch die Löcher nach Einsetzen der Zylinder in die Wells gegeben. Nach Anheftung der Zellen werden die Zylinder entfernt. Auf der rechten Seite sind schematisch der zellfreie Raum sowie der nach der Anheftung der Zellen entstandene Layer abgebildet.

Dieser beschriebene Migrationsversuch bietet im Vergleich zum „*scratch-window assay*“ zwei wichtige Vorteile. Zum einen entstehen durch die Verwendung der Zylinder gleich große und genau definierte zellfreie Räume, ohne dabei die Zellen zu verwunden und im Spalt zu verteilen. Zum anderen bleibt die Beschichtung im zellfreien Raum der Zellkulturplatte unverändert und wird nicht beschädigt (Samson *et al.*, 2004).

2.4 Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit

Die von Endothelzellen gebildete Blut-Hirn-Schranke reguliert als Diffusionsbarriere den Eintritt von Substanzen aus dem Blut in das Gehirn. Bei vielen Krankheiten des Gehirns wird die Integrität der Blut-Hirn-Schranke gestört, so dass Krankheitserreger, Virulenzfaktoren wie Toxine und weitere Substanzen in das Gehirn eindringen können. Das vom Keuchhustenerreger *Bordetella pertussis* produzierte Pertussis Toxin steht offenbar im Zusammenhang mit ernststen Komplikationen im Gehirn wie z.B. neurologischen Schäden und Enzephalopathien, die im Verlauf einer Pertussis-Infektion auftreten können (Menkes *et al.*, 1990; Schupper und Shuper, 2007).

Die Migration von Endothelzellen ist ein wichtiger Aspekt bei der Wundheilung verletzter Blutgefäße sowie während der Entwicklung von Organen. Die Zellmigration kann durch Infektionen und der Sekretion von Toxinen gestört werden. Das Pertussis Toxin inhibiert die Migration von humanen Hirnendothelzellen. Dieser Effekt ist abhängig von der Konzentration des PT und wird von der enzymatisch aktiven A-Untereinheit vermittelt.

In der vorliegenden Arbeit soll aufgeklärt werden, welche Proteine an der Signaltransduktion und somit an der Hemmung der Migration durch PT beteiligt sein könnten. Vorangegangene Experimente zeigten eine mögliche Beteiligung der Phosphatidylinositol 3-Kinase an den Regulationsmechanismen. In nachfolgenden Versuchen soll die Funktion weiterer Proteine am Migrationprozess untersucht werden. Dafür wird der Einfluss der Proteinkinase A, Proteinkinase C, Phospholipase C, $G\alpha_{i-2}$ und $G\alpha_{i-3}$, Claudin1 und Occludin, PAR-3 und PAR-6 sowie MMP-2 und MMP-9 auf die Migration mittels Lokalisierung in der Immunfluoreszenz, Inhibierung bzw. Aktivierung der Proteine und Herunterregulierung der Expression durch Transfektion untersucht werden, um Rückschlüsse über die Signaltransduktionswege zu erhalten. Expressionsstudien sollen den Einfluss von PT auf die Expression von $G\alpha_{i-2}$ und $G\alpha_{i-3}$, PI3K und Rac1 zeigen.

Parallele Untersuchungen zum Einfluss des zum Pertussis Toxin verwandten Cholera Toxins und von Brefeldin A (BFA) auf die Migration sollen weitere Aufschlüsse über die Regulationsmechanismen und mögliche Unterschiede zu den Mechanismen der Permeabilisierung von Endothel- und Epithelzellen liefern.

3 Material

3.1 Zelllinien

- A549 Die Zelllinie wurde aus humanem Bronchialkarzinomgewebe isoliert und verfügt über typisch epitheliale Eigenschaften.
- HBMEC *human brain microvascular endothelial cells*
Die humanen Zellen wurden einer Patientin, bei der eine Hirn-Biopsie durchgeführt wurde, entnommen (Stins *et al.*, 1997). Die Zelllinie stellte uns Prof. Dr. K.S. Kim (John Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA) zur Verfügung. Für die durchgeführten Versuche wurden sie von Passage 17 bis 35 verwendet.
- hCMEC/D3 *human cerebral microvascular endothelial cells*
Die Endothelzelllinie wurde von der Arbeitsgruppe von P.O. Couraud (Institut Cochin, Departement de Biologie Cellulaire, Paris, Frankreich) als menschliches Modell der Blut-Hirn-Schranke hergestellt und uns zur Verfügung gestellt (Weksler *et al.*, 2005). Es wurden die Passagen 29 bis 39 verwendet.
- MDCK/C7 *madin darby canine kidney*
Die Epithelzellen stammen aus der Niere eines weiblichen Kockerspaniels und wurden 1958 von S.H. Madin und N.B. Darby präpariert. In den durchgeführten Experimenten wurden die Passagen 5 bis 12 verwendet.
- U373MG Die humane Zelllinie wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Paulus (Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Münster) zur Verfügung gestellt. Diese Glioblastomzellen stammen von einem 61-jährigen männlichen kaukasischen Patienten.

3.2 Bakterielle Toxine

B-Oligomer	Das B-Oligomer des Pertussis Toxins wurde von der Firma Sigma (St. Louis, MO) bezogen und für die durchgeführten Versuche in einer Konzentration von 200 ng/ml eingesetzt.
Cholera Toxin	Das Cholera Toxin wurde von der Firma Sigma (St. Louis, MO) bezogen. Es wurde für die verschiedenen Versuche in den Konzentrationen 200 ng/ml und 1 µg/ml verwendet.
Pertussis Toxin	Das Pertussis Toxin stammt von der Firma Calbiochem (La Jolla, CA). Es liegt in salzfreier Form vor und wurde in 1 ml <i>A. bidest</i> aufgenommen. Dies entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml. Wenn nicht anders angegeben wurde es in einer Konzentration von 200 ng/ml eingesetzt.

3.3 Antikörper

In den folgenden Tabellen 3.1 und 3.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper für Immunfluoreszenzen und Western Blot-Analysen aufgeführt.

3.3.1 Primäre Antikörper

Tab. 3.1: Verwendete Primärantikörper. m: monoklonal, p: polyklonal, IF: Immunfluoreszenz, WB: Western Blot.

Bezeichnung	Beschreibung	Verdünnungen	Hersteller
Anti-Claudin-1	Kaninchen pAb	1:200 (WB), 1:100 (IF)	Dianova, Hamburg
Anti-Claudin-5	Ziege pIgG	1:100 (IF)	Santa Cruz, USA
Anti-Gα _{i-2}	Kaninchen pIgG	1:200 (WB), 1:20 (IF)	Santa Cruz, USA
Anti-Gα _{i-3}	Kaninchen pIgG	1:200 (WB), 1:20 (IF)	Santa Cruz, USA
Anti-MMP2	Kaninchen pAb	1:100 (IF)	Epitomics, USA
Anti-MMP9	Kaninchen mAb	1:100 (IF)	Epitomics, USA
Anti-Occludin	Kaninchen	1:200 (WB), 1:100 (IF)	Zymed, USA
Anti-PAR-3	Kaninchen	1:100 (IF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-PAR-6	Ziege	1:100 (IF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-PI3-K	Kaninchen pIgG	1:50 (IF)	Santa Cruz, USA
Anti-PKCα	Kaninchen pIgG	1:200 (WB), 1:100 (IF)	Santa Cruz, USA
Anti-PKCδ	Kaninchen pIgG	1:100 (IF)	Santa Cruz, USA
Anti-PKCε	Kaninchen pIgG	1:100 (IF)	Santa Cruz, USA
Anti-PKCζ	Kaninchen pIgG	1:1000 (WB), 1:100 (IF)	Santa Cruz, USA
Anti-α -Tubulin	Maus	1:1000 (WB)	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.3.2 Sekundäre Antikörper

Tab. 3.2: Verwendete Sekundärantikörper. AP: Alkalische Phosphatase, Cy2: Cyanin, Cy3: Indocarbocyanin, IF: Immunfluoreszenz, TR: Texas Red, WB: Western Blot.

Bezeichnung	Beschreibung	Verdünnungen	Hersteller
Anti-Kaninchen-Cy2	Cy2-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-IgG (H+L)	1:100 (IF)	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen-Cy3	Cy3-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-IgG (H+L)	1:100 (IF)	Dianova, Hamburg
Anti-Maus-Cy2	Cy2-konjugierter Ziege-anti-Maus-IgG (H+L)	1:100 (IF)	Dianova, Hamburg
Anti-Ziege-TR	Texas Red-konjugierter Affe-anti-Ziege	1:100 (IF)	Jackson Immunology, USA
Ziege-anti-Kaninchen-AP	Alkalische Phosphatase gekoppelter Antikörper aus Kaninchen gegen Ziegen-IgG und IgM	1:7000 (WB)	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus-AP	Alkalische Phosphatase gekoppelter Antikörper aus Maus gegen Ziegen-IgG und IgM	1:5000 (WB)	Dianova, Hamburg

3.4 Protein-Größenstandard

Als Molekulargewichtsstandard für Proteine wurde der SeeBlue®Plus2 Pre-Stained Standard von Invitrogen (Karlsruhe) eingesetzt. In der Tabelle 3.3 sind die entsprechenden molekularen Massen der Standardproteine aufgeführt.

Tab. 3.3. Protein-Molekulargewichtsstandard. Dargestellt werden die Molekulargewichte der Standardproteine nach elektrophoretischer Auftrennung.

Bezeichnung	Standardprotein	Molekulargewicht (kDa)	Hersteller
SeeBlue®Plus2 Pre-Stained Standard	Myosin	250	Invitrogen, Karlsruhe
	Phosphorylase	148	
	BSA	98	
	Glutamin-Dehydrogenase	64	
	Alkohol-Dehydrogenase	50	
	Carbon-Anhydrase	36	
	Myoglobinrot	22	
	Lysozym	16	
	Aprotinin	6	
Insulin, B-Kette	4		

3.5 Medien und Zusätze für die Zellkultur

In der folgenden Zusammenstellung sind die verschiedenen Medien, die für die Kultivierung der entsprechenden Zelllinien verwendetet wurden, aufgeführt.

DMEM für A549	DMEM Grundmedium High Glucose + 2 mM Glutamin 10% FCS
DMEM für MDCK/C7	DMEM Grundmedium High Glucose + 2 mM Glutamin 10% FCS 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (100 x)
DMEM für U373MG	DMEM Grundmedium High Glucose + 2 mM Glutamin 10% FCS 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (100 x)
EGM-2 für hCMEC/D3	EBM-2 Grundmedium EGM-2 BulletKit (2,5% FCS, VEGF, IGF-1, EGF, Basic FGF, Hydrocortison, Ascorbinsäure, Gentamycin) Die Zusätze des EGM-2 BulletKits wurden in einer 4-fach geringeren Verdünnung als vom Hersteller angegeben verwendet.
RPMI 1640 für HBMEC	RPMI 1640 Grundmedium + 2mM Glutamin 10% FCS 10% Nu-Serum 1 mM Na-Pyruvat 1% MEM Non essential amino acids (100 x) 1% MEM Vitamine (100 x) 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (100 x)

In der folgenden Zusammenstellung sind die für die Zellkultur verwendeten Medien und Zusätze mit den dazugehörigen Herstellern aufgeführt.

Ascorbinsäure	Cambrex BioScience, UK
Basic FGF	Cambrex BioScience, UK
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim

DMEM Grundmedium High Glucose + 2 mM Glutamin	PAA, Cölbe
Dulbecco's Phosphate buffered saline + Ca ²⁺ /Mg ²⁺	PAA, Cölbe
EBM-2 Grundmedium	Cambrex BioScience, UK
EGF	Cambrex BioScience, UK
FCS (Fötale Kälberserum)	PAA, Cölbe
Gentamycin	Cambrex BioScience, UK
Hydrocortison	Cambrex BioScience, UK
MEM Non essential amino acids	PAA, Cölbe
MEM Vitamine (100 x)	PAA, Cölbe
Natrium-Pyruvat	PAA, Cölbe
Nu-Serum	BD Biosciences, Heidelberg
Opti MEM I	Invitrogen, Hamburg
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe
RPMI 1640 Grundmedium + 2mM Glutamin	PAA, Cölbe
Trypsin/EDTA (10 x)	PAA, Cölbe
VEGF	Cambrex BioScience, UK

3.6 Chemikalien

Die im Rahmen der Arbeit verwendeten Chemikalien sind mit den entsprechenden Herstellern in der folgenden Liste dargestellt. Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) und Roth & Co. (Karlsruhe) bezogen.

ABTS-Tabletten	Pierce, Perbio Science, Bonn
Acrylamid	Roth & Co., Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumpersulfat	Biomol Feinchemikalien, Hamburg
BCIP	Biomol Feinchemikalien, Hamburg
BFA	Sigma-Aldrich, Steinheim
BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo	Invitrogen, Hamburg
Bromphenolblau	Bio-Rad, München
BSA	Omnilab Life Science, Bremen
Collagen Type 1	BD Biosciences, Heidelberg
Complete EDTA-free protease inhibitor	Roche, Mannheim
Coomassie Protein Assay Reagent	Omnilab Life Science, Bremen

Dulbecco's PBS mit bzw. ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	PAA, Cölbe
Fluorescent Mounting Medium	DakoCytomation, Hamburg
EDTA Dinatriumsalz	Roth & Co., Karlsruhe
Glutaraldehyd, EM-Grade, 25%	Science Services, München
H-7	Sigma-Aldrich, Steinheim
H-89	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Roth & Co., Karlsruhe
Lipofektamin 2000	Invitrogen, Hamburg
Magermilchpulver	Fluka Chemie, Buchs, CH
2-Mercaptoethanol	Roth & Co., Karlsruhe
<i>M-PER</i> [®] (Lysatpuffer)	Thermo Fisher SCIENTIFIC, USA
Methanol	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
NBT	Omnilab Life Science, Bremen
Paraformaldehyd (PFA)	Fluka Chemie, Buchs, CH
Peroxidase	Sigma-Aldrich, Steinheim
PMA	Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS (Natriumdodecylsulfat)	AppliChem, Darmstadt
TEMED	USB, Amersham Bioscience, Freiburg
Tris	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Omnilab Life Science, Bremen
Tween 20	Omnilab Life Science, Bremen
U-73122	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA

3.7 Puffer und Lösungen

In der folgenden Auflistung sind die in der Arbeit verwendeten allgemeinen Puffer sowie Lösungen und Puffer für die Durchführung der proteinbiochemischen Methoden aufgeführt.

3.7.1 Allgemeine Puffer

D-PBS (10 x)

14,24 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

2 g KH_2PO_4

81,9 g NaCl

2 g KCl

3.7.2 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden

Puffer und Lösungen zur Herstellung von Zellysaten

SDS-Probenpuffer

20% Glycerin

3% SDS

8% 2-Mercaptoethanol

3,125 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8

6 mg Bromphenolblau

ad 50 ml A. *bide*st

Puffer und Lösungen zur Durchführung der SDS-PAGE

Mischung S

750 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8

60 ml 0,2 M EDTA

60 ml 10% SDS

ad 1 l A. *bide*st

Mischung T

900 ml 2 M Tris-HCl pH 8,8

48 ml 0,2 M EDTA

48 ml 10% SDS

ad 1 l A. *bide*st

Sammelgelpuffer (5%)

3 ml Mischung S

3 ml 30% Acrylamid

11,9 ml A. *bide*st

180 μl APS

9 μl TEMED

Trenngelpuffer (15%)

7,5 ml Mischung T

18 ml 30% Acrylamid

10,5 ml A. *bide*st

330 μl APS

18 μl TEMED

SDS-Laufpuffer (10x)

30 g Tris

144 g Glycin

1% SDS

ad 1 l A. *bide*st

zu 1x Puffer verdünnen

Puffer und Lösungen für Western Blot-AnalysenTransferpuffer

48 mM Tris-Base

39 mM Glycin

pH 9,0

TBS (10x)

87,66 g NaCl

12,1 g Tris

ad 1 l A. *bide*st, pH 7,4TBS-T

TBS (1x)

1% Tween 20

AP-Puffer

50 ml 1 M Tris-HCl, pH 9,5

30 ml 2 M NaCl

3 ml 1 M MgCl₂ad 500 ml A. *bide*stBCIP-Lösung

750 mg BCIP

100% (v/v) DMF

ad 15 ml

NBT-Lösung

750 mg NBT

70% (v/v) DMF

ad 15 ml

Anodenpuffer I

300 mM Tris

20% (v/v) Methanol

pH 10,4

Anodenpuffer II

25 mM Tris

20% (v/v) Methanol

pH 10,4

Kathodenpuffer

25 mM Tris

20% (v/v) Methanol

40 mM 6-Aminodexanoic

3.8 Verbrauchsmaterialien

Die in der Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien mit den dazugehörigen Herstellern sind nachfolgend aufgeführt.

CIM-Platte 16	Roche, Mannheim
E-Platte 16	Roche, Mannheim
LightCycler® Capillaries	Roche, Mannheim
Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher und Schuell, Dassel
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter (0,2 µm Poren)	Schleicher und Schuell, Dassel
Well-Platten	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Essen
Zellkulturschalen	Nunc, Wiesbaden
Zellschaber	Corning Costar, Bodenheim

3.9 Geräte

Die folgende Liste fasst die in der Arbeit verwendeten Geräte sowie deren Hersteller zusammen.

Brutschränke	Hera Biocenter 2001: Integra Biosciences, Fernwald Heraeus Hera Cell, Hanau
Elektrophoresekammern	Proteingele: Hoefer Scientific Instruments, Pharmacia, Freiburg
Digitalkamera	Canon 300D
Gelgießkammer	Multiple Gel Caster SE 200, Hoefer Scientific Instruments, Pharmacia, Freiburg
LightCycler®	Roche, Mannheim
Magnetrührer	Merck, Darmstadt
Mikroskope	Axiophot: Zeiss, Göttingen Axiovert 40c: Zeiss, Göttingen Axiovert 100: Zeiss, Göttingen

pH-Messgerät	Axiovert 200M: Zeiss, Göttingen Φ 32 pH-Meter, Beckman-Coulter, München
Photometer	DU 640, Beckmann-Coulter, München
Precision Microplate Reader	MWG Biotech, Ebersburg
Semidry-Blotapparatur	Peqlab, Erlangen
Spannungsgeber	Constant Power Supply EPS, Pharmacia, Freiburg
Sterilbank	Technoflow, Integra Biosciences, Fernwald
Thermocycler	PCR Sprint, Hybrid, Engelsbach
Vortex	Bender & Hobein, Zürich, CH
Wasserbad	GFL, Burgwede
xCELLigence Real-Time Cell Analyzer	Roche, Mannheim
Zentrifugen	5415 R: Eppendorf, Hamburg 5417 R: Eppendorf, Hamburg Varifuge 3 OR: Heraeus Sepatech, Hanau

3.10 siRNA für die Transfektion

Die im Rahmen der Arbeit für die Transfektion verwendeten chemisch synthetisierten siRNAs sind mit den Sequenzen (5' → 3') in der folgenden Tabelle 3.4 aufgeführt.

Tab. 3.4: Für die Transfektion verwendete siRNA mit den dazugehörigen Sequenzen (5' → 3') sowie den dazugehörigen Herstellern.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Hersteller
Gα _{i-2}	CUUGAGCGCCUAUGACUUG	Sigma Prologo, Paris, F
Gα _{i-3}	CGGUUAUGGCGAGAUGGUGTT	MWG Biotech, Ebersburg

Die im Folgenden aufgeführten siRNAs, gegen spezifische Proteine, sind nach den jeweiligen entsprechenden Proteinen benannt und wurden von der Firma Invitrogen bezogen:

Claudin-1: CLDN1HSS189840, MMP-2: MMP2HSS106612, MMP-9: MMP9HSS106625, Occludin: OCLNHSS107401, PAR-3: PARD3HSS125534, PAR-6: PARD6AHSS147208, PKCα: PRKCAVHS41561, PKCζ: PRKCZVHS41530.

3.11 Oligonukleotide für die qRT-PCR

Im Rahmen der Arbeit verwendete Oligonukleotide für die qRT-PCR einschließlich der Sequenzen werden in der folgenden Tabelle 3.5 wiedergegeben. Sie wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersburg) bezogen.

Tab. 3.5: Für die qRT-PCR verwendete Oligonukleotide mit den dazugehörigen Sequenzen.

Oligoname	<i>forward</i> (5' → 3')	<i>reverse</i> (5' → 3')
G α_{i-2}	CGGUUAUGGCGAGAUGGUGUU	CUUGAGCGCCUAUGACUUG
G α_{i-3}	TGGGACGGCTAAAGATTGAC	ATAATTGCCGGGCATCATC
HPRT	TGATAGATCCATTTCCTATGACTGTAGA	AGGACATTCTTTCCAGTTAAAGTTGAG
PI3K	GGCTCAAAGACAAGAACAAAGG	TCCAGCACATGAACGTGTAAA
PKC α	TTGCTGATGAAAAGCTCCATGT	ATTTAGTGTGGAGCGGATGGTT
PKC ζ	CCAAGAGCCTCCAGTAGACG	GCACCAGCTCT TCTCACC
Rac1	CTGATCAGTTACACAACCAATGC	CATTGGCAGAATAATTGTCAAAGA

3.12 Enzyme für die Molekularbiologie

Zur cDNA-Synthese wurden der RNase-Inhibitor und der OligoDT-Primer von der Firma Ambion bezogen. Der RT-Puffer, die dNTPs und die Reverse Transkriptase stammten von der Firma Roche Diagnostics (Mannheim).

3.13 Kits

Für den **Proliferationsassay** wurde das Kit *Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)* von der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet.

Zur **Bestimmung des intrazellulären cAMP-Spiegels** wurde das Kit Amersham cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) System von GE Healthcare (Little Chalfont, UK) genutzt.

Zur **Isolation von Gesamt-RNA** wurde der RNeasy-Minikit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet.

Für die **qRT-PCR** wurde das Kit LightCycler[®] FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) genutzt.

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Zellkultur

Die Kultivierung der beiden humanen Hirnendothelzelllinien HBMEC und hCMEC/D3, der Epithelzelllinie MDCK/C7, der neuronalen Glioblastomzelllinie U373MG sowie der humanen Lungenkarzinomzelllinie A549 erfolgte im Brutschrank bei 37°C in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre bei 5% CO₂.

Als Kultivierungsmedien dienten dabei für die Zelllinie HBMEC RPMI 1640, für die Zelllinie hCMEC/D3 EBM-2 und für die A549-, MDCK/C7- und U373MG-Zellen DMEM. Die verwendeten Medien und Lösungen wurden vor ihrem Gebrauch auf 37°C erwärmt.

4.1.1.1 Passagieren adhärenter Zellen

Die fünf verwendeten Zelllinien wurden in 75 cm²-Kulturflaschen angezogen und bei einer erreichten Konfluenz von 70% bis 90% passagiert. Dabei wurde das Kulturmedium abgenommen, und die Zellen mit 3 ml 1 x Trypsin fünf Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend konnten die Zellen abgelöst werden. Die Zugabe von 3 ml des entsprechenden Kulturmediums stoppte die Reaktion des Trypsins durch das im Medium enthaltene FCS. Die erhaltene Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur (RT) und 800 rpm für 4 min zentrifugiert (Varifuge 3 OR, Heraeus Sepatech) und anschließend das gewonnene Zellpellet in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Ein entsprechendes Aliquot dieser Suspension wurde in neue mit 15 ml Kultivierungsmedium befüllte Kulturflaschen überführt. Ein Wechsel des Mediums in den Flaschen erfolgte nach zwei Tagen.

Zur besseren Ablösung der Zellen wurden die A549-, hCMEC/D3-, MDCK/C7- und U373MG-Zellen vor der Behandlung mit 1 x Trypsin für 5 min bei 37°C mit 3 ml D-PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ inkubiert.

Vor der Überführung der hCMEC/D3-Zellen in Kulturflaschen oder 48-Well-Platten wurden die Kulturgefäße zur Gewährleistung einer besseren Anheftung der Zellen mit Collagen beschichtet. Das Collagen wurde in einer 1:30-Verdünnung in die Kulturgefäße gegeben, so dass der Boden bedeckt ist, und diese wurden für 1 h bei 37°C inkubiert.

4.1.1.2 Auftauen kryokonservierter Zellen

Die bei -196°C in Stickstoff konservierten Zellen wurden unverzüglich bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und zu 8 ml Kulturmedium in eine 25 cm^2 -Kulturflasche gegeben. Nach einem Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Bei einer Konfluenz von 70% bis 90% wurden die Zellen wie unter 4.1.1.1 abgelöst und auf zwei 75 cm^2 -Kulturflaschen mit 15 ml Kulturmedium aufgeteilt. Nach ausreichender Expansion und einem negativen Test auf Mycoplasmen wurden einige Zellen nach wenig erfolgten Passagen, wie unter 4.1.1.3 beschrieben, kryokonserviert.

4.1.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Bei einer Konfluenz von 70% bis 90% (ungefähr 5×10^6 Zellen/ml) wurden die Zellen wie unter 4.1.1.1 abgelöst und bei 800 rpm und 4°C für 4 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml Kulturmedium mit 10% DMSO aufgenommen und resuspendiert. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in vorgekühlte Kryoröhrchen aliquotiert. Zunächst wurden die Zellen für 2 h bei -20°C und im Anschluss bei -80°C eingefroren. Zur langfristigen Aufbewahrung erfolgt die Lagerung der Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff.

4.1.1.4 Züchtung in 24-Well-Platten

Für mikroskopische Untersuchungen wurden die HBMEC in 24-Well-Platten auf Deckgläsern angezogen. Pro Well wurden 1×10^5 Zellen in $500\text{ }\mu\text{l}$ Medium ausgesät. Nach etwa ein bis zwei Tagen bei einer erreichten Konfluenz von 70% konnten die Zellen für Fluoreszenzanalysen verwendet werden. Das Medium wurde täglich gewechselt.

4.1.1.5 Züchtung in 48-Well-Platten

Für Migrationsversuche (s. 4.1.2) wurden die Zellen in 48-Well-Platten mit eingesetzten Edelstahlzylindern zur Erzeugung eines zellfreien Spaltes angezogen. Die Wells wurden vor Aussaat der Zellen mit 1% BSA blockiert. Pro Well wurden 2×10^5 Zellen in $700\text{ }\mu\text{l}$ Medium ausgesät.

Für Fluoreszenzanalysen migrierender HBMEC wurden vor Aussaat der Zellen und Einsetzen der Zylinder Deckgläser mit einem Durchmesser von 10 mm auf den Boden der Wells gelegt.

4.1.1.6 Züchtung in 96-Well-Platten

Für Zellproliferationsversuche (*Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)* Roche Diagnostics, Mannheim) erfolgte die Anzucht der HBMEC und MDCK/C7-Zellen in 96-Well-Platten. Dabei wurden 1×10^4 bzw. 7×10^4 Zellen pro Well in 100 μ l Kulturmedium mit und ohne Pertussis Toxin ausgesät. Nach zwei Tagen wurde der Zellproliferationsversuch mit dem Kit *Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)* von der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt (s. 3.13 u. 4.1.3). Das Medium in den Wells wurde täglich gewechselt.

Zur Bestimmung des intrazellulären cAMP-Spiegels mit dem Kit Amersham cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) System von GE Healthcare (Little Chalfont, UK) wurden 1×10^5 Zellen (HBMEC und MDCK/C7) in 100 μ l Kulturmedium in einer 96-Well-Platte über Nacht angezogen. Der Test wurde am nächsten Tag nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.1.1.7 Züchtung in 10 cm-Kulturschalen

Für die Transfektion von Zellen, deren Wanderungsverhalten in anschließenden Migrationsexperimenten untersucht werden sollte, wurden 1×10^6 HBMEC in einer 10 cm-Kulturschale in 10 ml antibiotikafreiem Kulturmedium angezogen und nach 24 h die Transfektion (s. 4.1.4) mit spezifischer siRNA durchgeführt.

Zur Isolierung von Gesamt-RNA (s. 4.4.1) sowie zur Herstellung von Gesamtzellextrakten (s. 4.3.1) aus transfizierten Zellen wurden für die Transfektion 1×10^6 Zellen nach Einsatz von spezifischen Stempeln in 10 cm-Kulturschalen angezogen.



Abb. 4.1: Spezifische Stempel zur Anzucht von Zellen in 10 cm-Kulturschalen. Diese Stempel bestehen aus einem Polyethylenketon, das über besondere thermische Eigenschaften verfügt. Im Vordergrund ist die Unterseite mit einer großen Anzahl an Stegen zur Erzeugung vieler zellfreier Räume zu sehen. Im Hintergrund ist die Oberseite des Stempels abgebildet. Die Löcher dienen zum Einfüllen des Mediums bzw. der Zellsuspension.

Diese Stempel (s. Abbildung 4.1) bestehen aus einem Polyethylenketon und verfügen an der Unterseite über mehrere Stege, die direkt am Boden der Kulturschale aufliegen, so dass in diesem Bereich keine Zellen adhären können. Durch diese besondere Anordnung entsteht eine größere Zahl an zellfreien Räumen, so dass die Anzahl an migrierenden Zellen erhöht wird.

Nach der Anheftung der Zellen am Boden der Kulturschale, was nach etwa zwei Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ erreicht wurde, konnten die Stempel entnommen werden. Die Kulturschalen wurden zum Entfernen nicht adhärenter Zellen zweimal mit frischem Medium gewaschen und über Nacht bis zur weiteren Verwendung inkubiert. Nach diesen 24 h erfolgte zunächst die Transfektion der Zellen und nach weiteren 24 h die Isolierung von Gesamt-RNA oder die Herstellung von Gesamtzellextrakten.

4.1.1.8 Quantifizierung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen wie unter 4.1.1.1 beschrieben mit 1 x Trypsin abgelöst, bei 800 rpm und RT für 4 min zentrifugiert und in 1 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zellzahl einer geeigneten Verdünnung konnte durch Auszählen von fünf diagonal verlaufenden Großquadraten von insgesamt 25 in einer Neubaukammer bestimmt werden.

Mit Hilfe des folgenden Kammerfaktors erfolgte die Berechnung der Zellzahl pro ml. Der Kammerfaktor beträgt mit x als die Zellzahl in 5 Großquadraten und VF als den Verdünnungsfaktor:

$$x \cdot 5 \cdot VF \cdot 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

4.1.2 Migrationsversuch

Zur Untersuchung der Migration eukaryotischer Zellen wurden zwei verschiedene Methoden angewendet. Zum einen wurden Edelstahlzylinder, die eingesetzt in eine 48-Well-Platte einen zellfreien Spalt erzeugen, verwendet. Zum anderen wurde die Migration mit dem xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) DP Instrument untersucht.

4.1.2.1 Migrationsstudien unter Verwendung von Edelstahlzylindern

Bei der Methode unter der Verwendung von Edelstahlzylindern zur Untersuchung der Migration wurden 2×10^5 Zellen pro Well in 700 μl Medium in einer 48-Well-Platte angezogen. Dazu wurden die Wells vor Aussaat der Zellen für eine Stunde mit 1% BSA beschichtet und ein Edelstahlzylinder, der mit seinem Steg am Boden der Wells aufliegt, zur Erzeugung eines zellfreien Spalts eingesetzt.

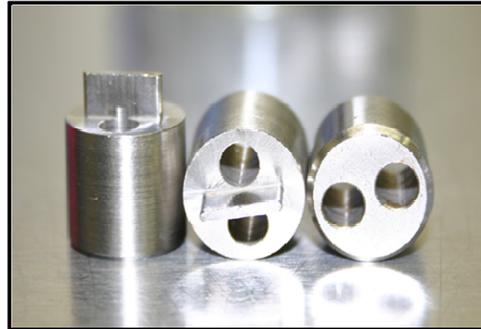


Abb. 4.2: Edelstahlzylinder zur Erzeugung eines zellfreien Spaltes. Die dargestellten Edelstahlzylinder werden vor dem Aussäen der Zellen mit der vorstehenden Kante nach unten in die 48-Well-Platten eingesetzt. Die Zellen werden von oben durch die Löcher nach Einsetzen der Zylinder in die Wells gegeben. Nach Anheftung der Zellen werden die Zylinder entfernt.

Die Zellen wurden durch die Löcher an der Oberseite in die Zylinder gegeben und für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach Anheftung der Zellen am Boden der Wells wurden die Zylinder entfernt, und die Wells zum Entfernen nicht adhärenter Zellen zweimal mit frischem Medium gewaschen.

Zur Bestimmung der Migrationsdistanz wurden mit Hilfe einer digitalen Kamera, die an ein inverses Mikroskop (Axiovert 40c) gekoppelt ist, Aufnahmen des Spaltes direkt nach Entfernung der Zylinder und von fixierten und gefärbten Zellen nach 20 bis 45 h Inkubation gemacht. Die Fixierung erfolgte mit 1% Glutaraldehyd für zehn Minuten und die Färbung mit 1% Kristallviolett für eine Minute. Zur Entfernung von überschüssigem Kristallviolett wurden die Zellen dreimal mit *A. bidest* gewaschen.

Zur Untersuchung des Einflusses von Pertussis Toxin auf die Migration der Zellen wurde PT in den Konzentrationen 1 $\mu\text{g/ml}$, 200 ng/ml , 100 ng/ml , 10 ng/ml und das B-Oligomer in der Konzentration 200 ng/ml verwendet. Cholera Toxin wurde in einer Konzentration von 200 ng/ml und 1 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Die Inhibitoren und Aktivatoren wurden in den folgenden Konzentrationen verwendet: Brefeldin A (BFA) [1 μM], H-7 [50 μM], H-89 [1 μM], Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) [500 nM], U-73122 [4 μM] und Wortmannin

[100 nM], und in den Untersuchungen zur Migration der Zellen bei Versuchsbeginn dem Medium zugesetzt.

4.1.2.2 Migrationsstudien mit dem xCELLigence Real-Time Cell Analyzer DP

Das xCELLigence RTCA DP System der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) stellt eine Methode dar, mit der die Migration von Zellen über einen bestimmten Zeitraum kontinuierlich untersucht werden kann.

Das System misst elektrische Impedanzen über integrierte Mikroelektroden, die quantitative Informationen über den biologischen Zustand der Zellen, wie Zellzahl, Viabilität und Morphologie, vermittelt.

Für die Migrationsstudien wurde eine sogenannte CIM-Platte 16 verwendet, die über zwei Kammern verfügt, die durch eine mikroporöse Polyethylenterephthalat-Membran getrennt sind. Die Migration von Zellen von der oberen in die untere Kammer durch die Membran wurde dabei kontinuierlich vom RTCA DP dokumentiert. Die obere Seite der Membran in der unteren Kammer enthält integrierte Sensoren von Mikroelektroden, die ein Impedanzsignal erhalten, wenn sie bei der Anheftung der Zellen aufgrund der Migrationsbewegung mit migrierenden Zellen in Kontakt treten. Diese Anheftung der Zellen wird als Änderung des Zellindex-Wertes vom Gerät gemessen. Der Zellindex-Wert wird über Änderungen der relativen Impedanz an den mikroelektronischen Sensoren im Boden der zum System gehörenden CIM-Platte 16 bestimmt und dient als Maß für die Menge migrierter Zellen.

Für Migrationsstudien wurden in die obere Kammer der CIM-Platte 16 pro Well 100 μ l der Zellsuspension (6×10^4 Zellen) mit Medium und mit Medium plus PT gegeben. Die CIM-Platte 16 wurde in das im CO₂-Inkubator äquilibrierte RTCA DP Instrument eingesetzt und die weitere Messung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Migration der Zellen in die untere Kammer wurde kontinuierlich detektiert. Die Messungen wurden in den ersten acht Stunden alle 5 min und danach in Zeitabständen von 15 min durchgeführt.

4.1.3 Proliferationsassay

Um den Einfluss des PT auf die Proliferation von eukaryotischen Zellen zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Zellproliferationsassays durchgeführt. Für diese Versuche

wurde zum einen der Kit Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) der Firma Roche (Mannheim) und zum anderen das xCELLigence RTCA DP System von Roche verwendet.

4.1.3.1 Proliferationsassay: Cell Proliferation ELISA

Untersuchungen zum Einfluss des PT auf die Proliferation von eukaryotischen Zellen wurden mit dem Zellproliferationsassay (*Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)*, Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt.

Es handelt sich dabei um eine nicht-radioaktive Methode, bei der BrdU (5-Bromo-2'-desoxyuridin) anstelle von Thymidin in neu synthetisierte DNA proliferierender Zellen eingebaut wird. Nach Fixierung der Zellen und Denaturierung der DNA bindet der monoklonale Antikörper Anti-BrdU-POD aus Maus an das eingebaute BrdU. Diese Komplexe können durch eine Reaktion mit dem Substrat Tetramethyl-benzidin aufgrund einer dabei hervorgerufenen Farbreaktion im ELISA-Reader bei 450 nm quantifiziert werden. Die Farbentwicklung und somit die gemessenen Extinktionen korrelieren direkt mit der Menge an synthetisierter DNA und damit auch mit der Anzahl sich teilender Zellen.

Es wurden 1×10^4 und 7×10^4 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte in 100 μ l Medium mit und ohne PT angezogen. Nach zwei Tagen erfolgte die Durchführung des Proliferationsassays nach den Angaben des Herstellers. Der Versuch wurde dreimal in jeweils drei parallelen Ansätzen durchgeführt.

4.1.3.2 Proliferationsassay: xCELLigence RTCA DP

Zur Untersuchung der Zellproliferation mit dem xCELLigence RTCA DP wurden 200 μ l der Zellsuspension (3×10^4 and 6×10^4 Zellen) mit Medium und mit Medium plus PT in jedes Well der xCELLigence E-Platte 16 gegeben. Das System misst kontinuierlich elektrische Impedanzen über Mikroelektroden, die sich am Boden der E-Platte befinden. Bei einer Proliferation der Zellen vergrößern sich diese Impedanzen aufgrund der Anheftung der Zellen, was als Änderung des Zellindex-Wertes vom Gerät gemessen wird. Der Zellindex-Wert wird also über Änderungen der relativen Impedanz an den mikroelektronischen Sensoren im Boden der zum System gehörenden E-Platte 16 bestimmt und dient als Maß für die Menge der Proliferation der Zellen.

Die Messungen zur Zellproliferation erfolgten nach den Angaben des Herstellers und wurden in den ersten 8 h alle 5 min und später in Zeitabschnitten von 15 min durchgeführt.

4.1.4 Transfektion

Zur Transfektion wurden die HBMEC in 10 cm-Kulturschalen wie unter 4.1.1.7 beschrieben angezogen und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Transfektion erfolgte durch Einbringen von spezifischer siRNA (s. 3.10) in die Zellen unter Verwendung von Lipofektamin. Dazu wurden zunächst 25 µl Lipofektamin und 10 µl siRNA (500 pmol) in je 1250 µl Opti-MEM 1 gegeben und für fünf Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze vereinigt und weitere 20 min bei RT inkubiert. Die über Nacht ausgesäten Zellen wurden einmal mit Opti-MEM 1 gewaschen und anschließend nach Zugabe von 10 ml Opti-MEM 1 die vorbereiteten Transfektionsansätze zugegeben. Nach vier Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Medium durch frisches RPMI 1640 ersetzt.

Nach weiteren 24 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen wie unter 4.1.1.1 mit 1 x Trypsin gelöst und mit den Zylindern in 48-Well-Platten zur Untersuchung der Migration (s. 4.1.2.1) ausgesät.

Die Dokumentation des durch die Zylinder erzeugten zellfreien Spaltes erfolgte durch Aufnahmen mit einer Digitalkamera, die an ein inverses Mikroskop (Axiovert 40c) angeschlossen ist. Fotos wurden direkt nach dem Entfernen der Edelstahlzylinder sowie nach weiteren 24 Stunden erstellt.

Die Effizienz der Transfektion wurde mit dem BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo, einem Fluorescein-markiertem dsRNA Oligomer, hergestellt zur Verwendung in RNAi Analysen, bestimmt. Bei den anschließenden Berechnungen im Migrationsversuch wurde die erzielte Transfektionsrate berücksichtigt und in die dargestellten Ergebnisse einberechnet.

4.1.5 Bestimmung des Intrazellulären cAMP-Spiegels

Zur Bestimmung des intrazellulären cAMP-Spiegels wurde das Kit Amersham cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) System von GE Healthcare (Little Chalfont, UK) verwendet. Dazu wurden 1 x 10⁵ Zellen (HBMEC und MDCK/C7) in 100 µl Kulturmedium in einer 96-Well-Platte über Nacht angezogen (s. 4.1.1.6). Anschließend wurde der Versuch nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Zellen wurden am Fluoreszenzmikroskop Axiophot oder am Konfokal-Mikroskop Axiovert 200M durchgeführt. Das verwendete Fluorophor konnte durch Bestrahlung der Präparate mit langwelligem UV-Licht detektiert werden. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte durch Aufnahmen mit einer Kamera, die direkt an das Mikroskop angeschlossen war.

4.2.1 Vorbereitung der Zellen

Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden 1×10^5 Zellen pro Well in 24-Well-Platten auf Deckgläsern ausgesät und für zwei Tage bis zu einer Konfluenz von 70% polarisiert. Bei Untersuchungen zum Einfluss des Pertussis Toxins wurden die Zellen für sechs Stunden mit bzw. ohne PT vorinkubiert. Zur Betrachtung migrierender Zellen wurden 2×10^5 Zellen pro Well in 48-Well-Platten mit Deckgläsern (\varnothing 10 mm) und Zylindern ausgesät. Nach zwei Stunden wurden die Zylinder entfernt und die Zellen über Nacht (ÜN) mit und ohne PT bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

4.2.2 Fixierung und Permeabilisierung

Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen zweimal für zwei Minuten mit PBS mit Mg²⁺/Ca²⁺ gewaschen. Anschließend folgte die Fixierung der Zellen durch 20-minütige Inkubation mit 4% Paraformaldehyd (PFA) oder 10-minütige Inkubation mit einem auf -20°C vorgekühltem Gemisch aus Methanol und Aceton (1:1). Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit D-PBS erfolgte eine Absättigung freier Bindungsstellen durch 15-minütige Inkubation mit 50 mM NH₄Cl. Danach wurden die Zellen einmal mit D-PBS gewaschen und durch Inkubation mit 0,2% Triton X-100 für 3 min permeabilisiert, um innere Zellstrukturen für die Antikörper zugänglich zu machen. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal 5 min mit D-PBS gewaschen.

4.2.3 Antikörperfärbung für Immunfluoreszenzen

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden fixierte und permeabilisierte Zellen für 30 bis 60 min mit 1% BSA in D-PBS inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation mit dem primären Antikörper für 1 h bei RT oder ÜN bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit D-PBS für 5 min erfolgte die Zugabe des sekundären

Antikörper mit einem gekoppelten Fluorophor für 30 min in einer abgedunkelten Kammer. Nach erneutem dreimaligem Waschen für je 5 min mit D-PBS wurden die erstellten Präparate mit „*Fluorescent Mounting Medium*“ auf Objektträgern eingebettet und zur Aushärtung und Lagerung bei 4°C aufbewahrt. Die Präparate wurden am Fluoreszenzmikroskop Axiophot oder am Konfokal-Mikroskop Axiovert 200M betrachtet.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Herstellung von Zellysaten

Die Herstellung von Gesamtzellextrakten eukaryotischer Zellen erfolgte mit dem Lysatpuffer *M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent* (Thermo Fisher SCIENTIFIC, Rockford, USA). Dafür wurden 1×10^6 Zellen in 10 cm-Kulturschalen mit den entsprechenden Stempeln (s. 4.1.1.7) angezogen und anschließend aufgeschlossen, um die zellulären Proteine in einer löslichen Fraktion zu erhalten.

Dafür wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen für zwei Minuten mit D-PBS in 350 µl *M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent* (10 ml Lysatpuffer plus 100 µl Protease-Inhibitor) mit einem Zellschaber abgelöst. Die dabei erhaltenen Zellextrakte wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 14000 x g für 8 min zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

Die Lysate wurden nach Bestimmung der Proteinkonzentration mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und nach dem Erhitzen auf 95°C für 10 min bei -20°C gelagert.

4.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Gesamtzellysaten diente die von Bradford entwickelte Methode (Bradford, 1976). Das Bradford-Reagenz enthält den Farbstoff Coomassie-Brillantblau G 250, der in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonat-Form unspezifisch an kationische und nicht-polare hydrophobe Seitenketten der Proteine bindet. Diese Komplexbildung führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm. Eine zunehmende Absorption bei 595 nm dient daher als Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Zur Bestimmung wurde ein Aliquot des Zellysats mit *A. bidest* zu einem Gesamtvolumen von 250 µl verdünnt und zu 500 µl Bradford-Reagenz gegeben. Nach

10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Durch eine Eichgerade von BSA, die im Bereich von 30 bis 2000 µg Protein/ml erstellt wurde, konnte die der Absorption entsprechende Proteinkonzentration bestimmt werden. Als Leerwert diente ein Aliquot des Lysatpuffers.

4.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Trennung von Proteinen nach ihren molekularen Massen wurde die von U. K. Laemmli entwickelte Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet (Laemmli, 1970). Bei dieser Methode wird den Proteinen das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) zugesetzt, so dass SDS-Protein-Komplexe entstehen, die die Eigenladung der Proteine überdecken und über eine konstante negative Ladung pro Masseinheit (1,4 g SDS pro 1 g Protein) verfügen (Rehm, 1996). In einer SDS-PAGE nimmt die Wanderungsgeschwindigkeit der SDS-Protein-Komplexe proportional zu ihrer Masse ab.

Bei dieser Gelelektrophorese werden die Proteine zunächst im kleineren, weitporigen Sammelgel auf eine Linie fokussiert, von der sie konzentriert in das engporige Trenngel wandern. Dies führt zur Erzeugung schärferer und klarerer Banden. Im Trenngel erfolgt entsprechend die eigentliche Trennung der Proteine.

Die Porengröße der Gele wird vom Gehalt an Acrylamid sowie vom Grad der Vernetzung des N'N'-Methylenbisacrylamid bestimmt. Das zugegebene Ammoniumpersulfat (APS) dient bei der Gelbildung als Radikalstarter und das TEMED als Katalysator der Reaktion. Durch das Erhitzen der Proben auf 95°C sowie das im Probenpuffer enthaltene SDS und 2-Mercaptoethanol werden die Schwefelbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäuren gespalten. Dies führt zur Auflösung der Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine (Lottspeich und Zorbas, 1998). Das Protein liegt folglich in seiner lang gestreckten denaturierten Form vor.

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen erfolgte in dieser Arbeit mit 12,5%-igen Polyacrylamid-Gelen bei 25 mA. Nach der Elektrophorese wurden die getrennten Proteine auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen.

4.3.4 Western Blot

Zum Nachweis der durch die SDS-PAGE getrennten Proteine mit spezifischen Antikörpern wurden diese elektrophoretisch mit der Semidry-Blotapparatur auf eine Membran übertragen. Je nach Protein erfolgte die Übertragung auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran.

Bei der Verwendung der Nitrocellulosemembran wurden diese und das Gel vor der Übertragung für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Für den Transfer wurden auf die Anodenplatte der Blotapparatur zwei in Transferpuffer getränkte Whatmanpapiere, die prääquilibrierte Membran, luftblasenfrei das PAA-Gel sowie zwei weitere in Transferpuffer getränkte Whatmanpapiere gelegt. Dieser Stapel wurde mit der Kathodenplatte abgedeckt.

Zur Befeuchtung der PVDF-Membran wurde diese für 15 Sekunden auf eine Methanoloberfläche, für zwei Minuten in *A. bidest* und anschließend für fünf Minuten in Anodenpuffer II gelegt. Für den Proteintransfer wurden auf die Anodenplatte der Blotkammer zwei in Anodenpuffer I getränkte Whatmanpapiere, ein in Anodenpuffer II getränktes Whatmanpapier, die prääquilibrierte PVDF-Membran, das Proteingel ohne Erzeugung von Luftblasen sowie drei in Kathodenpuffer getränkte Whatmanpapiere gelegt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 25 V für 45 min in Richtung der Anode.

Anschließend wurde die Membran mit 1 x TBS gewaschen und für 60 min bei RT mit 5% Magermilchpulver in 1 x TBS zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen blockiert. Die anschließende Inkubation mit dem Primärantikörper in 1% Magermilchpulver in 1 x TBS erfolgte für mindestens eine Stunde bei RT oder ÜN bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit 1 x TBS-T wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper mit gekoppelter alkalischer Phosphatase in 1% Magermilchpulver in 1 x TBS für 30 min bei RT inkubiert. Die Entwicklung des Blots erfolgte nach weiterem dreimaligem Waschen für je 5 min mit 1 x TBS-T.

Zur Detektion der Proteine wurde die Membran in 15 ml AP-Puffer mit jeweils 50 µl 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat-Toluidinsalz (BCIP) und Nitrotetrazolium-blauchlorid (NBT) inkubiert. An den Stellen auf der Membran, an denen das Antikörperkonjugat gebunden vorlag, bildeten sich aufgrund der Umsetzung des BCIP/NBT-Substrates durch die alkalische Phosphatase dunkle Präzipitate in Form von Banden. Die Reaktion wurde durch Waschen der Filter in *A. bidest* gestoppt.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Isolierung von RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte unter Verwendung des RNeasy-Minikits der Firma Qiagen (Hilden) und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Anzucht wurden 1×10^6 Zellen in 10 cm-Kulturschalen in 10 ml Medium ausgesät und nach 24-stündiger Kultivierung für weitere 6, 15 und 20 Stunden mit Medium oder mit Medium mit PT inkubiert.

Die Eluierung der RNA wurde durch eine 2-minütige Inkubation der Säule mit 30 μ l RNase-freiem *A. bidest* und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm erreicht. Zur Erhöhung der RNA-Ausbeute erfolgte eine Wiederholung dieser Schritte nach Zugabe von 20 μ l RNase-freiem *A. bidest*. Zur Lagerung der isolierten Gesamt-RNA wurden die Proben bei -80°C bis zur weiteren Verwendung zur cDNA-Synthese eingefroren.

4.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur exponentiellen Amplifizierung von DNA-Abschnitten mit bekannten flankierenden Nukleotidsequenzen (Saiki *et al.*, 1998). Dabei werden zwei kurze Oligonukleotide, die so genannten Primer, eingesetzt, die mit komplementären DNA-Bereichen der zuvor denaturierten und somit einzelsträngigen zu amplifizierenden *template*-DNA hybridisieren. Dies wird als *annealing* bezeichnet. Eine eingesetzte DNA-Polymerase verlängert im Elongationsschritt ausgehend vom 3'-Ende der gebundenen Primer den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt, so dass ein zum Ausgangsstrang identischer Doppelstrang entsteht. Die mehrfache Wiederholung von Denaturierung der *template*-DNA, *annealing* und Elongation führen zur exponentiellen Vervielfältigung der DNA, da alle neu gebildeten Stränge in den Folgezyklen als Matrizen dienen. Die optimale *annealing*-Temperatur hängt von der Länge und dem GC-Gehalt der Primer ab.

4.4.3 cDNA-Synthese

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase wird aus mRNA die dazu komplementäre cDNA synthetisiert. Die cDNA-Synthese ist eine molekularbiologische Methode, die

Anwendung in der Genexpressionanalyse findet, da sie bei der Detektion und quantitativen Bestimmung der Expressionsrate der zugrundeliegenden mRNA hilft.

Die Reverse Transkriptase ist eine spezifische RNA-abhängige DNA-Polymerase und benötigt einen Primer zur Synthese. Dieses Oligo-dT-Nukleotid (15–25 Desoxythymidine) bindet an die RNA und ist komplementär zum Poly-A-Schwanz der eukaryotischen mRNA. Das Produkt ist nun ein cDNA-Strang, der mit dem ursprünglichen RNA-Strang hybridisiert ist.

Zur cDNA-Synthese wurden 5 µl der isolierten Gesamt-RNA (s. 4.5.1) mit 0,13 µl OligoDT-Primer und 7,87 µl *A. bidest* versetzt und für 10 min auf 65°C erhitzt. Nach einer Abkühlung auf 4°C wurden auf Eis 4 µl RT-Puffer, 0,5 µl RNase-Inhibitor, 2 µl dNTP und 0,5 µl Reverse Transkriptase zugesetzt. Die Proben werden für 30 min auf 55°C und für 5 min auf 85°C erhitzt und anschließend erfolgt eine Abkühlung auf 4°C. Nach Beendigung des Laufes wurde die synthetisierte cDNA bei -20°C gelagert.

4.4.4 Quantitative *real-time* PCR

Mögliche Veränderungen in der Expression von Genen wurden mit der Methode der quantitativen *real-time* PCR unter Verwendung des LightCycler® 2.0 Real-Time PCR Systems der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) untersucht. Dabei handelt es sich um eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der PCR beruht und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht.

Die Quantifizierung erfolgt durch Zugabe des Fluorophors SYBR Green I, das spezifisch an doppelsträngige DNA bindet. Die Fluoreszenz von SYBR Green I wird bei Einlagerung in die kleine Furche der DNA verstärkt. Durch die Messung der Fluoreszenzintensität kann nach jedem Zyklus die Menge des amplifizierten PCR-Produktes bestimmt werden. Die Fluoreszenz nimmt somit proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufes bestehend aus mehreren Zyklen wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen und eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Nur in der exponentiellen Phase der PCR ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen. Jedes DNA-Fragment verfügt über eine spezifische Schmelzkurve, so dass bestimmt werden kann, ob tatsächlich nur ein spezifisches Produkt amplifiziert wurde. Zur quantitativen Analyse dient der „*Crossing Point*“, der die Anzahl an Zyklen angibt, bei denen der Fluoreszenzlevel aller Proben

gleich ist. Diese Zykluszahl hängt von der Ausgangsmenge der Ziel-RNA in der Probe ab. Mit zunehmender Menge an *template* verringert sich die Zykluszahl zum Erreichen des „*Crossing Points*“, so dass Rückschlüsse auf die Menge an spezifischer mRNA in einer Probe gezogen werden können.

Bei dieser Methode wurden Gen-spezifische Primerpaare verwendet. Das HPRT I-Gen (Hypoxantin-guanine phosphoribosyltransferase I) diente als Referenz, da es sich hierbei um ein konstitutiv exprimiertes *housekeeping gene* handelt (Vandesompele *et al.*, 2002). Die Reaktionen wurden mit dem Kit LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I nach Angaben des Herstellers angesetzt.

In der Tabelle 4.1 ist das in der qRT-PCR verwendete Programm aufgeführt.

Tab. 4.1: Programm der durchgeführten qRT-PCR-Reaktion.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initialdenaturierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	10 min	29
<i>annealing</i>	60°C	10 min	
Elongation	72°C	10 min	
Schmelzkurve	65°C	15 min	1
Abkühlung	40°C	30 min	1

Die erhaltenen Daten wurden mit der *quantification program software* (Version 3.3, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) ausgewertet.

5 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der inhibierende Effekt des Pertussis Toxins (PT) auf die Migration humaner zerebraler Endothelzellen untersucht. Dabei sollten Rückschlüsse über die an den Regulationsmechanismen und an den Signaltransduktionswegen beteiligten Proteine gewonnen werden. Dazu wurde der Einfluss von Inhibitoren und/oder Aktivatoren für die Proteinkinase A, die Proteinkinase C, die Phospholipase C und die Adenylatzyklase untersucht. Immunfluoreszenzanalysen sollten Aufschlüsse über die Lokalisierung möglicher involvierter Proteine in den Zellen während der Migrationsprozesse liefern. Durch die Herunterregulierung der Expression von PKC α und PKC ζ , Ga $_{i-2}$ und Ga $_{i-3}$, Claudin-1 und Occludin, PAR-3 und PAR-6 sowie MMP-2 und MMP-9 sollte die Beteiligung dieser Proteine am Migrationsprozess aufgeklärt werden.

5.1 Einfluss des Pertussis Toxins auf die Migration von Endothelzellen

Die Migration von Zellen ist ein essentieller Prozess in der Entwicklung multizellulärer Organismen und spielt eine wichtige Rolle bei weiteren biologischen Mechanismen wie z.B. der Wundheilung nach Schädigung von Geweben oder Infektionen (Ridley, 2001). Infektionen stehen häufig mit einem verzögerten Schließen einer Wunde in Verbindung, das auf eine hohe Zahl an Bakterien in den Geweben zurückgeführt werden kann oder auf einer Inhibierung durch Toxine beruhen kann, die die Bakterien sezernieren, bevor sie in das Gewebe eindringen (Ovington, 2003).

Vorangegangene Untersuchungen zeigten einen inhibierenden Effekt des Pertussis Toxins (PT), das vom Keuchhusten-auslösenden Bakterium *Bordetella pertussis* sezerniert wird, auf die Migration humaner Hirnendothelzellen (HBMEC) (Schulte, 2007).

5.1.1 Inhibierung der Migration von HBMEC durch Pertussis Toxin

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Untersuchung des Migrationsverhaltens zwei unterschiedliche Untersuchungsmethoden angewandt. Dabei wurden zum einen manuelle Migrationsexperimente, in denen Edelstahlzylinder zur Erzeugung eines zellfreien Spaltes dienten, und zum anderen automatisierte Messungen der Zellmigration in Echtzeit mit dem xCELLigence Real-Time Cell Analyzer DP Instrument der Firma Roche durchgeführt.

Für die manuellen Migrationsassays wurden die eukaryotischen Zellen in 48-Well-Platten mit einem Edelstahlzylinder zur Erzeugung eines in der Fläche definierten, zellfreien Spaltes kultiviert (s. 4.1.2.1). Die Einwanderung der Zellen in den zellfreien Raum in An- und Abwesenheit von PT wurde im Zeitverlauf durch Dokumentation des Spaltes nach Entfernen der Zylinder und nach Beendigung des Versuches durch Fixierung und Färbung der Zellen erfasst. Die folgende Abbildung 5.1 zeigt den zellfreien Spalt mit einer Breite von 1 mm nach der Entfernung der Edelstahlzylinder (0 h) und die Veränderungen am zellfreien Raum nach Einwanderung der HBMEC nach 43 h Inkubation in Medium mit bzw. ohne PT.

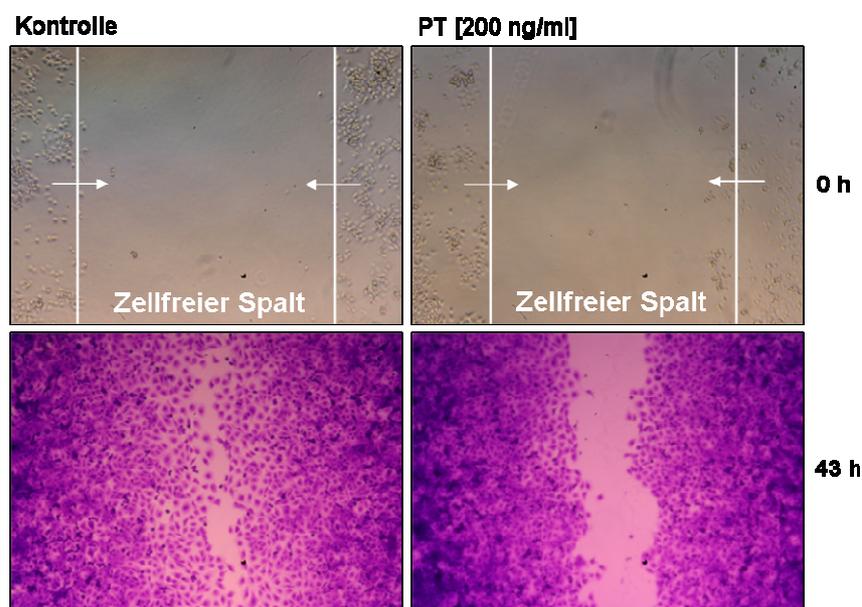


Abb. 5.1: Aufnahmen zum Einfluss des Pertussis Toxins auf die Migration von HBMEC. Es wurden 2×10^5 Zellen in Medium (Kontrolle) und Medium plus PT [200 ng/ml] in 48-Well-Platten ausgesät. Die Erzeugung eines zellfreien Spaltes mit einer Breite von 1 mm erfolgte wie unter 4.1.2.1 beschrieben. Es wurden Aufnahmen vom zellfreien Spalt nach 0 h (dem Zeitpunkt des Entfernens der Edelstahlzylinder) sowie nach 43 h Inkubation angefertigt. Vor den Aufnahmen nach 43 h wurden die Zellen mit Glutaraldehyd fixiert und mit Kristallviolett gefärbt.

Zu Beginn des Versuches ist in beiden Ansätzen der breite, definierte, zellfreie Spalt zu erkennen. Dieser verringert sich aufgrund der Einwanderung der HBMEC nach 43 h Inkubation, wobei für die Kontrollzellen eine deutlich stärkere Verkleinerung des Spaltes im Vergleich zu den Zellen, die mit PT inkubiert wurden, zu verzeichnen ist.

In der Abbildung 5.2 werden die Migrationsstrecken der Kontrollzellen und der Zellen, die mit PT inkubiert wurden, graphisch dargestellt. Dabei wurden mit Hilfe der Aufnahmen des zellfreien Spaltes (s. Abb. 5.1) die im Zeitintervall von 43 h zurückgelegten Wanderungstrecken der Zellen in Geschwindigkeiten umgerechnet. Diese

Wanderungsgeschwindigkeit der unbehandelten Kontrollzellen wurde zu 100% gesetzt und dazu die Wanderungsgeschwindigkeit der mit PT-inkubierten Zellen in Bezug gesetzt.

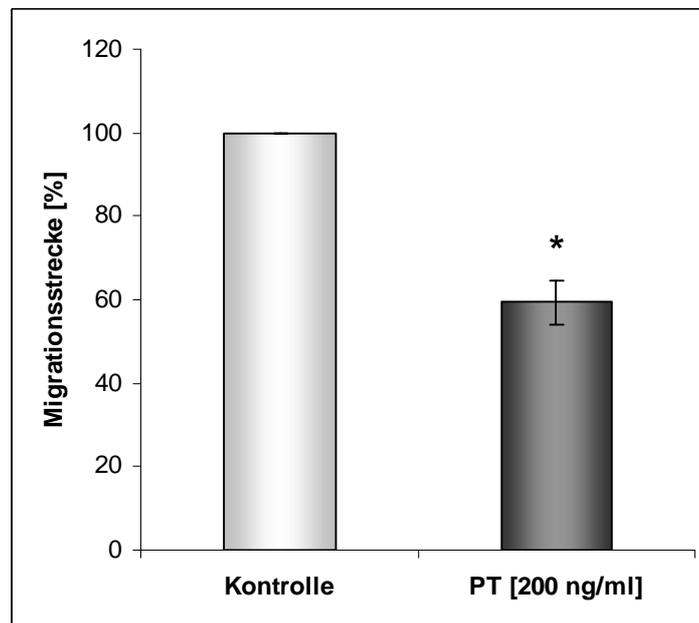


Abb. 5.2: Graphische Darstellung der Wanderungstrecken der HBMEC nach 43-stündiger Inkubation mit und ohne PT. Die Wanderungstrecken wurden mit Hilfe der in der Abbildung 5.1 gezeigten Aufnahmen vom zellfreien Spalt berechnet und bezogen auf die Kontrolle in Prozent umgerechnet. Die Berechnung erfolgte aus vier unabhängigen Migrationsversuchen. Das Ergebnis erweist sich nach dem Student's t-Test mit $*p=0,014$ als statistisch signifikant.

Die Inkubation der Zellen mit PT führt zu einer Inhibierung der Migration um 40,3% im Vergleich zu den Kontrollzellen. Dieses Ergebnis erweist sich nach dem Student's t-Test mit $*p=0,014$ als statistisch signifikant.

Als zweite Methode zur Untersuchung des Einflusses des Pertussis Toxins auf die Migration von HBMEC wurden automatisierte Messungen mit dem xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) DP Instrument herangezogen (s. 4.1.2.2). Hierbei konnte der Zellindex, der als Maß für die Zellmigration dient, über einen definierten Zeitraum kontinuierlich in Echtzeit verfolgt und dokumentiert werden. Das System misst elektrische Impedanzen über integrierte Mikroelektroden und wandelt diese in den Zellindex um. Für die Migrationsstudien wird eine sogenannte CIM-Platte 16 verwendet, die über zwei Kammern verfügt, die durch eine Membran getrennt sind. Die Migration der Zellen von der oberen in die untere Kammer durch die Membran wird kontinuierlich vom xCELLigence RTCA DP dokumentiert. Die obere Seite der Membran in der unteren Kammer, enthält integrierte Sensoren von Mikroelektroden, die ein Impedanzsignal erhalten, wenn sie in Kontakt mit migrierenden Zellen treten.

Die Abbildung 5.3 zeigt die Graphen der Ansätze, in denen die HBMEC-Zellen mit Medium als Kontrolle (blau) und mit Medium plus PT [200 ng/ml] (rosa) inkubiert wurden, sowie der Ansätze, in denen nur Medium (rot) und Medium plus PT (grün) in die Wells gegeben wurde.

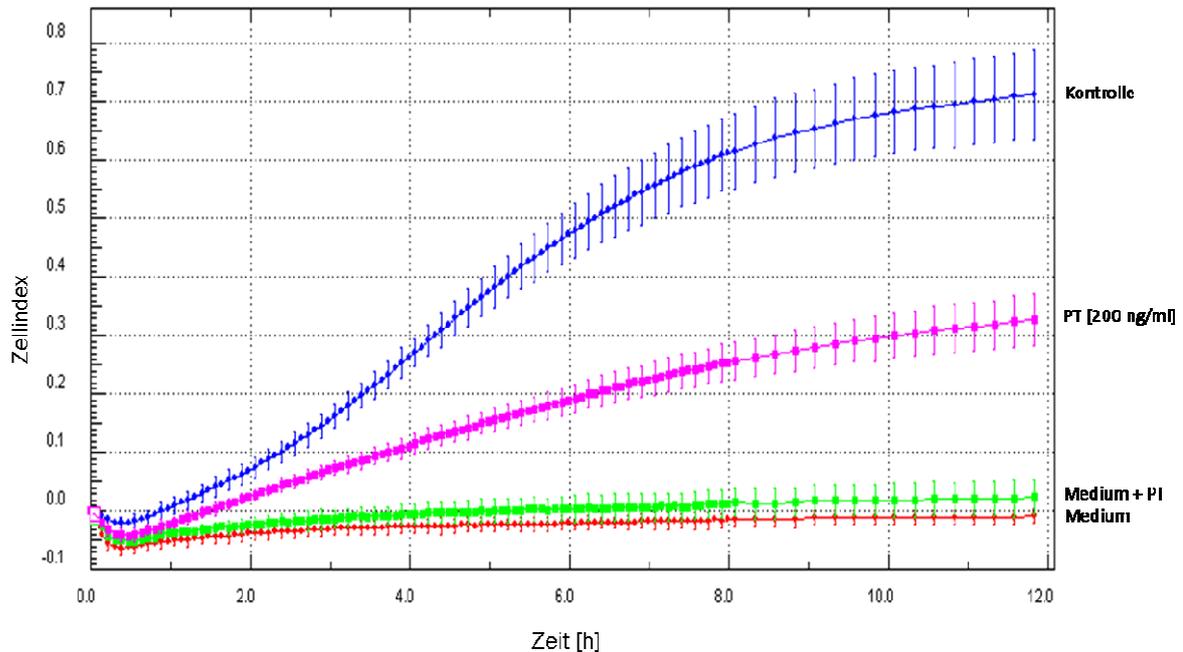


Abb. 5.3: Graphische Darstellung der Messung zum Einfluss von PT auf die Migration von HBMEC mit dem xCELLigence Real-Time Cell Analyzer DP Instrument. Es wurden 60.000 Zellen in den Wells der CIM-Platte 16 ausgesät (Vierfachbestimmungen) und mit Medium mit und ohne PT inkubiert (s. 4.1.2.2). Als Kontrollen dienen nur mit Medium (rot) und mit Medium mit PT (grün) gefüllte Wells. Die Graphen zeigen den Verlauf der Messung der ersten zwölf Stunden.

Die mit PT-inkubierten Zellen zeigen einen geringeren Zellindex, der als Maß für die Migrationsfähigkeit dient, als die Kontrollzellen. Die Migration der HBMEC wird bei Zugabe von PT um etwa 50% inhibiert. Die Wells, die nur mit Medium bzw. mit Medium plus Pertussis Toxin befüllt wurden, nehmen keinen Einfluss auf den Zellindex.

Neben der Darstellung in Form von Verlaufskurven des Zellindexes können die Ergebnisse auch als Steigung der Zellindices zwischen zwei Zeitpunkten dargestellt werden (Abb. 5.4.).

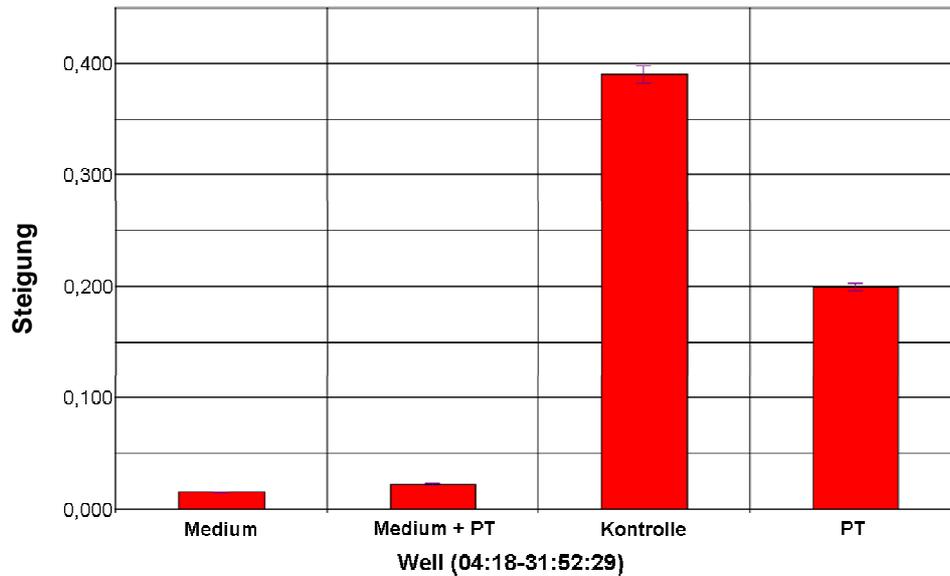


Abb. 5.4: Graphische Darstellung zum Einfluss von PT auf die Migration als Steigung zwischen zwei Zeitpunkten. Die in der Abbildung 5.3 gezeigten Zellindices als Maß für die Migration der Zellen werden als Steigung der verschiedenen Zellindices zwischen den Zeitpunkten 04:18 h und 31:52 h dargestellt.

Die stärkste Steigung, die als Maß für die Migration gilt, wird bei den Kontrollzellen erreicht. Durch die Zugabe von PT reduziert sich der Zellindex und somit die Steigung um die Hälfte, so dass festgehalten werden kann, dass PT die Migration der HBMEC um etwa 50% hemmt. Die Kontrollen zeigen einen Zellindex, der annähernd Null beträgt.

5.1.2 Konzentrationsabhängiger Einfluss des Pertussis Toxins auf die Migration von HBMEC

In weiteren automatisierten Messungen mit dem xCELLigence Real-Time Cell Analyzer DP Instrument wurde untersucht, ob der durch das Pertussis Toxin vermittelte inhibitorische Effekt auf die Migration der HBMEC abhängig von der eingesetzten Konzentration ist, und ob hohe Konzentrationen die Migration vollständig blockieren können. Frühere manuelle Migrationsassays mit PT in den Konzentrationen [200 ng/ml], [100 ng/ml] und [10 ng/ml] ließen eine Konzentrationsabhängigkeit des Effektes vermuten.

Die Zellen wurden wie unter 4.1.2.2 beschrieben in der CIM-Platte ausgesät und mit Medium bzw. mit Medium plus PT in den Konzentrationen [1000 ng/ml], [200 ng/ml], [100 ng/ml] und [10 ng/ml] inkubiert. Die über einen Zeitraum von acht Stunden gewonnenen Ergebnisse werden in der Abbildung 5.5 graphisch dargestellt.

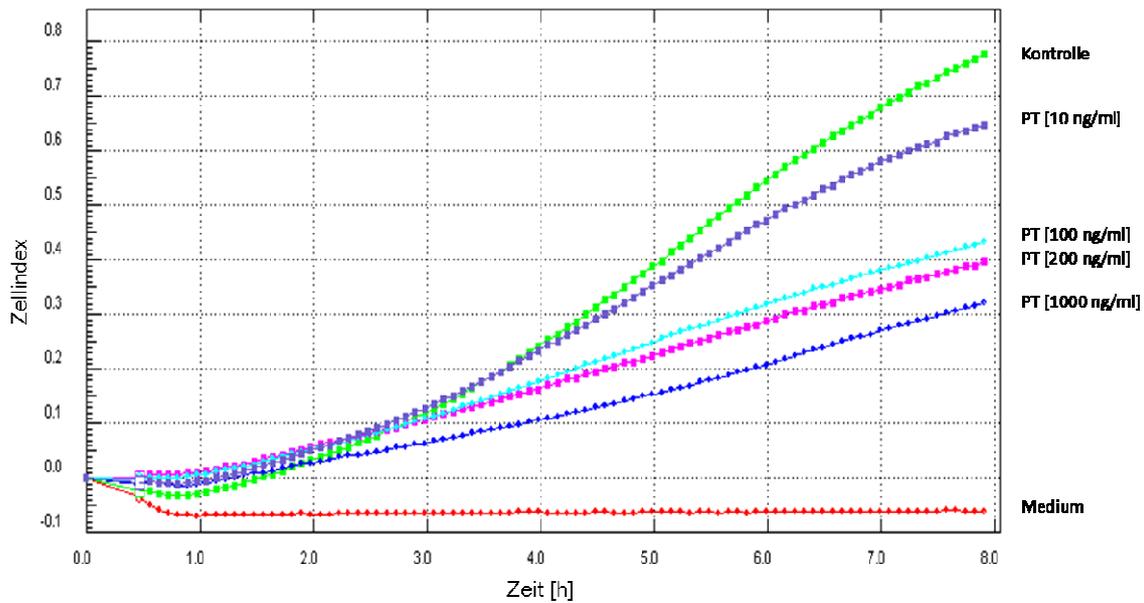


Abb. 5.5: Graphische Darstellung zum Einfluss verschiedener Konzentration von PT auf die Migration von HBMEC gemessen mit dem xCELLigence Real-Time Cell Analyzer DP Instrument. Es wurden 60.000 Zellen in den Wells der CIM-Platte ausgesät (s. 4.1.2.2) und mit Medium und mit Medium mit PT in den Konzentrationen [1000 ng/ml], [200 ng/ml], [100 ng/ml] und [10 ng/ml] inkubiert. Als Kontrollansatz diente Medium. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Graphen zeigen den Verlauf der Messung der ersten acht Stunden an.

Zusammengefasst ist bei allen untersuchten Konzentrationen des PT ein inhibierender Effekt auf die Migration zu beobachten. Der Zellindex d.h. die Zahl migrierender Zellen ist umso niedriger je höher die verwendete Konzentration ist. Bei [10 ng/ml] ist die Reduktion mit 17,5% sehr gering im Vergleich zu den Kontrollzellen. Bei [100 ng/ml] beträgt die Inhibierung 45% und bei [200 ng/ml] 50%. Auch unter der höchsten gewählten Konzentration von 1 µg/ml PT liegt noch eine Wanderung der Zellen vor. Diese Migration ist im Vergleich zu den Kontrollzellen um 60% gehemmt. Das Toxin scheint auch in dieser Konzentration nicht toxisch auf die Zellen zu wirken.

5.1.3 Einfluss des Pertussis Toxins auf die Migration anderer Zelltypen

In weiteren Migrationsexperimenten wurde untersucht, ob der beobachtete inhibitorische Effekt des Pertussis Toxins auch die Migration anderer Zelltypen beeinflusst oder spezifisch für die kapillaren Hirnendothelzellen HBMEC ist. Für diese Untersuchungen wurden hCMEC/D3 als weitere kapillare Hirnendothelzelllinie, U373MG als Glioblastomzelllinie, A549-Zellen aus humanem Bronchialkarzinomgewebe mit typisch epithelialen Eigenschaften und MDCK/C7-Zellen als weitere epitheliale Zelllinie verwendet (Abb. 5.6).

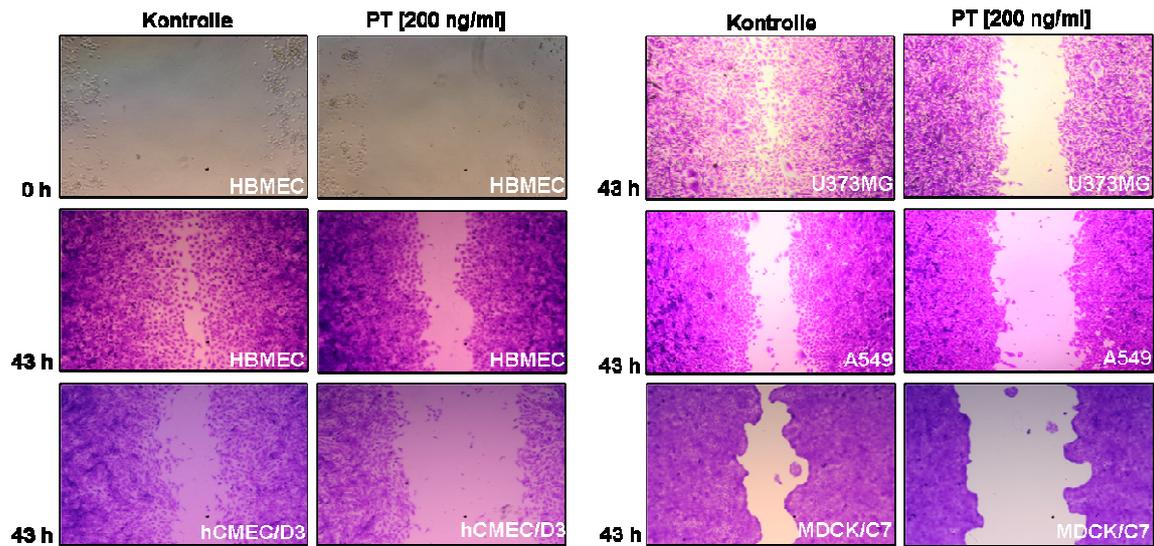


Abb. 5.6: Aufnahmen vom zellfreien Spalt von HBMEC, hCMEC/D3, U373MG, A549 und MDCK/C7 bei Inkubation mit und ohne Pertussis Toxin. Für den Migrationsassay wurden 2×10^5 Zellen pro Well in Medium mit bzw. ohne PT [200 ng/ml] in 48-Well-Platten ausgesät (s. 4.1.2.1). Nach 43 h Inkubation wurden die Zellen fixiert, mit Kristallviolett gefärbt und Aufnahmen angefertigt. Zum Vergleich werden Aufnahmen von HBMEC zu Beginn des Versuches direkt nach dem Entfernen der Zylinder (0 h) dargestellt.

Die Abbildung fasst die Ergebnisse des Migrationsversuches der vier Zelllinien verglichen mit HBMEC-Zellen nach 43 h Inkubation mit Medium und mit Medium mit PT zusammen. Aufnahmen, die zu Beginn des Versuches direkt nach dem Entfernen der Zylinder (0 h) angefertigt wurden, sind exemplarisch nur von den HBMEC gezeigt, da zu Beginn des Versuches die Ausgangsspaltgrößen der verschiedenen getesteten Zelllinien mit den gezeigten übereinstimmen. Der Migrationsversuch zeigt für die verschiedenen verwendeten Zelllinien bei Zugabe von PT eine verzögerte Einwanderung der Zellen in den Spalt.

Mit Hilfe dieser Aufnahmen (Abb. 5.6) wurden die im Zeitintervall von 43 h zurückgelegten Wanderungstrecken der Zellen in Strecken pro Stunde umgerechnet. Diese Wanderungsgeschwindigkeit der unbehandelten Kontrollzellen wurde zu 100% und dazu die Wanderungsgeschwindigkeit der mit PT-inkubierten Zellen in Bezug gesetzt (Abb. 5.7). Die Auswertung der Versuche zum Einfluss von PT auf die Migration der unterschiedlichen Zelltypen bestätigt die bereits in den mikroskopischen Aufnahmen beobachteten Effekte des PT.

Für die Hirnendothelzelllinie hCMEC/D3 ergibt sich eine Inhibierung der Migration durch das Pertussis Toxin um $59,9 \pm 12\%$, für die A549-Zellen eine Hemmung von $49,5 \pm 8,3\%$, für die U373MG-Zellen eine reduzierte Migration von $53,8 \pm 3,5\%$ und für die epitheliale Zelllinie MDCK/C7 eine Inhibierung von $46,8 \pm 2,3\%$. Die Ergebnisse

erweisen sich nach dem Student's t-Test für die hCMEC/D3-Zellen mit $*p=0,013$ und für die A549-Zellen mit $*p=0,014$ als statistisch signifikant, für die U373MG-Zellen mit $**p=0,009$ als statistisch hoch signifikant und für die MDCK/C7-Zellen mit $***p=0,0008$ als statistisch höchst signifikant.

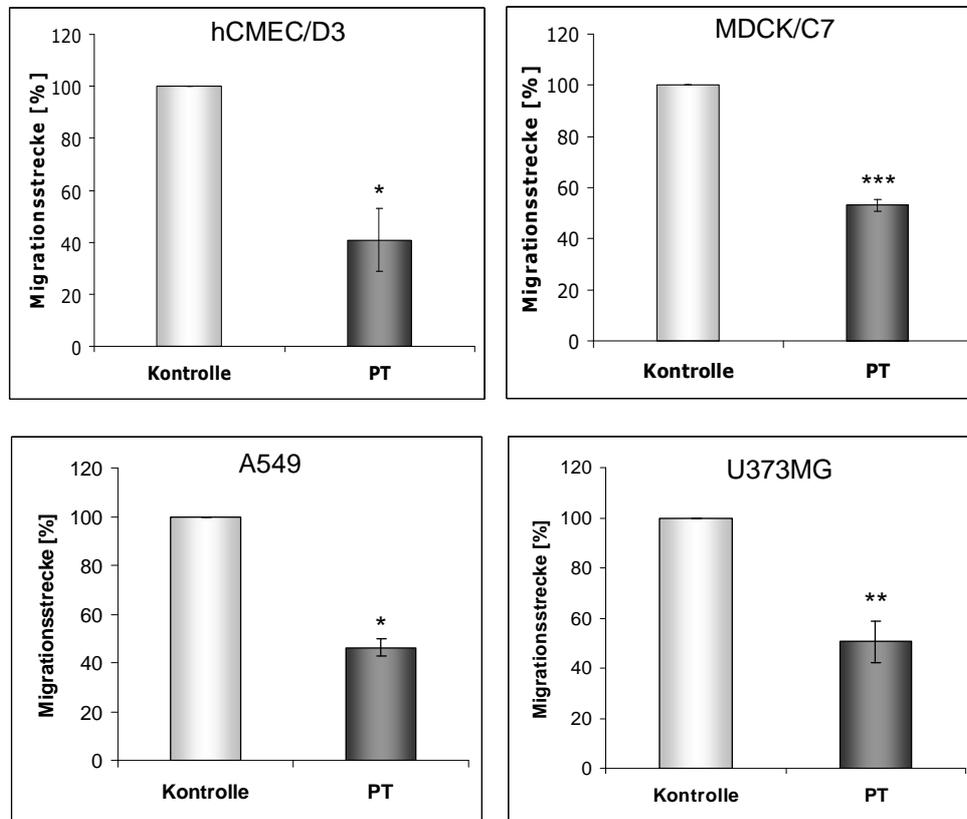


Abb. 5.7: Migrationsstrecken für hCMEC/D3-, U373MG-, A549- und MDCK/C7-Zellen, die mit und ohne PT inkubiert wurden. Mit Hilfe der Aufnahmen des zellfreien Spaltes (Abb. 5.6) wurden die im Zeitintervall von 43 h zurückgelegten Wanderungsstrecken der Zellen in Strecken pro Stunde umgerechnet. Diese Wanderungsgeschwindigkeit der unbehandelten Kontrollzellen wurde zu 100% gesetzt und zu diesem Wert die Wanderungsgeschwindigkeit der mit PT-inkubierten Zellen in Bezug gesetzt. Es wurden die Migrationsstrecken von drei unabhängigen Experimenten mit jeweiliger Dreifach-Bestimmung berechnet. Die Ergebnisse erweisen sich nach dem Student's t-Test für die hCMEC/D3-Zellen mit $*p=0,013$ und für die A549-Zellen mit $*p=0,014$ als statistisch signifikant, für die U373MG-Zellen mit $**p=0,009$ als statistisch hoch signifikant und für die MDCK/C7-Zellen mit $***p=0,0008$ als statistisch höchst signifikant.

Diese Untersuchungen zeigen, dass es sich bei der Hemmung der Migration durch PT nicht um einen HBMEC- oder Endothelzellspezifischen Effekt handelt, sondern dass alle bisher untersuchten Zelltypen, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, davon betroffen sind.

5.2 Einfluss verschiedener Inhibitoren und Aktivatoren auf die Migration von zerebralen Endothelzellen

Um nähere Aufschlüsse zu erhalten, welche Signaltransduktionswege an der Hemmung der Migration durch das Pertussis Toxin beteiligt sein könnten, wurden die Effekte verschiedener Inhibitoren und Aktivatoren auf die Wanderung von HBMEC betrachtet.

Für diese Untersuchungen wurden folgende Inhibitoren verwendet: H-7 als selektiver Inhibitor der Proteinkinase C, H-89 als Inhibitor der Proteinkinase A und U-73122 als Inhibitor der Phospholipase C. In vorangegangenen Untersuchungen zum Einfluss von PT auf die Permeabilität von BCEC-Monolayern für HRP konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Inhibierung von PKC einen deutlich verstärkenden Einfluss auf die PT-vermittelte Erhöhung der Permeabilität hat (Brückener, 1999).

Als Aktivatoren wurden Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) mit Einfluss auf die Proteinkinase C und das Cholera Toxin, das (ebenfalls) die Adenylatzyklase stimuliert, verwendet. Frühere Ergebnisse zeigen eine Reduzierung der PT-induzierten Permeabilisierung der BCEC-Monolayer bei gleichzeitiger Aktivierung der PKC durch PMA. Das Cholera Toxin führte zu keiner Veränderung der Permeabilität (Brückener, 1999).

5.2.1 Einfluss von U-73122 auf die Migration

Zur Untersuchung des Einflusses der Phospholipase C (PLC) auf die Migration von HBMEC wurde U-73122 als selektiver Inhibitor eingesetzt. Die HBMEC wurden als Kontrolle mit Medium, mit Medium plus PT [200 ng/ml], mit Medium plus U-73122 [4 μ M] und mit Medium plus PT und U-73122 in den in vorangegangenen Untersuchungen zum Einfluss auf die Permeabilisierung verwendeten Konzentrationen inkubiert (Brückener, 1999). Durch die zeitliche Verfolgung der Einwanderung in den zellfreien Spalt über einen Zeitraum von 40 h konnten die Wanderungstrecken in prozentuale Migrationsstrecken bezogen auf die Kontrollzellen berechnet werden. Dabei wurden die Strecken der Kontrollzellen zu 100% und dazu die Wanderungstrecken der behandelten Zellen in Bezug gesetzt (s. Abb. 5.8).

Es zeigt sich eine PT-vermittelte Hemmung der Migration von HBMEC um $41 \pm 3,6\%$. Die Inkubation mit U-73122 führt zu einer Inhibierung der Migration um $69,8 \pm 4,9\%$. Eine gleichzeitige Koinkubation von PT und U-73122 zeigt einen sehr ähnlichen inhibitorischen Effekt von $68,9 \pm 3,6\%$.

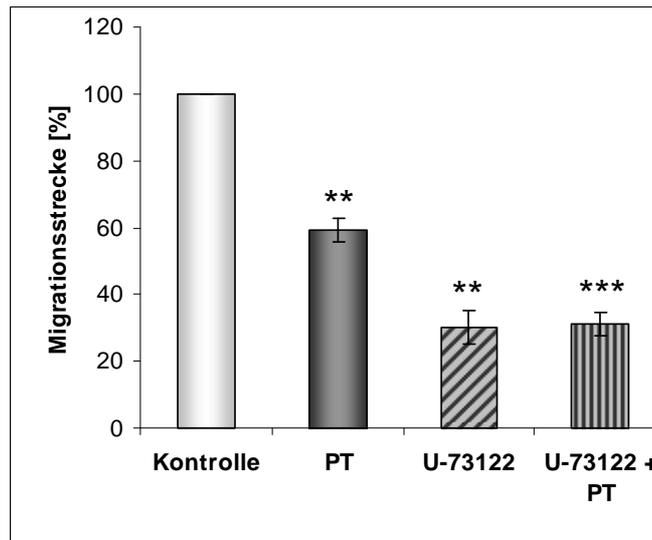


Abb. 5.8: Graphische Darstellung der Migrationsstrecken zur Untersuchung des Einflusses von U73122 auf die Wanderung der HBMEC. Dafür wurden 2×10^5 HBMEC mit Medium (Kontrollzellen), mit Medium plus 200 ng/ml Pertussis Toxin (PT), mit Medium plus 4 μ M U-73122 und mit Medium plus PT und U-73122 inkubiert. Mit Hilfe der Aufnahmen des zellfreien Spaltes wurden die im Zeitintervall von 40 h zurückgelegten Wanderungsstrecken der Zellen berechnet. Die Wanderungsstrecke der unbehandelten Kontrollzellen wurde zu 100% und dazu die Wanderungsstrecke der behandelten Zellen in Bezug gesetzt. Es wurden drei unabhängige Experimente als Dreifachansätze durchgeführt. Die Ergebnisse weisen nach dem Student's t-Test für PT mit $**p = 0,0025$ und für U-73122 mit $**p = 0,0016$ eine hohe und für die Koinkubation mit PT und U-73122 mit $***p = 0,0009$ höchste statistische Signifikanz auf.

Die Ergebnisse weisen nach dem Student's t-Test für PT mit $**p = 0,0025$ und für U-73122 mit $**p = 0,0016$ eine hohe und für die Koinkubation mit PT und U-73122 mit $***p = 0,0009$ höchste statistische Signifikanz auf. Sie deuten eine Beteiligung der Phospholipase C an den Regulationsmechanismen der Migration von HBMEC an.

5.2.2 Einfluss von H-7 und Phorbol-12-myristat-13-acetat auf die Migration

In weiteren Migrationsversuchen sollte die Beteiligung der Proteinkinase C (PKC) an den Signaltransduktionswegen, die zur Hemmung der Migration durch PT führen, untersucht werden. Dabei wurde H-7 als Inhibitor und Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) als Aktivator der Proteinkinase C eingesetzt. Für die Migrationsversuche wurden PT [200 ng/ml], H-7 [50 μ M] und PMA [500 nM] in den bereits in vorangegangenen Untersuchungen zum Einfluss auf die Permeabilisierung angegebenen Konzentrationen verwendet (s. 4.1.2.1) (Brückener, 1999). Die Abbildung 5.9 zeigt die prozentualen Wanderungsstrecken der Zellen der verschiedenen Ansätze bezogen auf die Migrationsstrecke der Kontrollzellen. Diese konnten durch die zeitliche Verfolgung der Einwanderung in den zellfreien Spalt über einen Zeitraum von 40 Stunden berechnet

werden. Dabei wurden die Strecken der Kontrollzellen zu 100% und dazu die Wanderungsstrecken der behandelten Zellen in Bezug gesetzt.

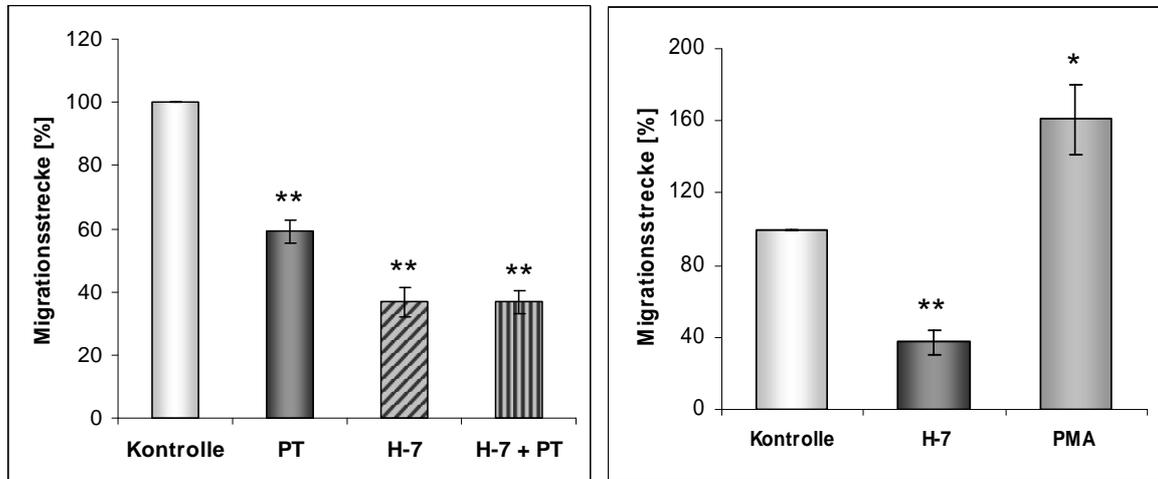


Abb. 5.9: Graphische Darstellung der Untersuchung zum Einfluss von H-7 und PMA auf die Migration von HBMEC. Es wurden 2×10^5 HBMEC mit Medium als Kontrolle, mit Medium plus 200 ng/ml Pertussis Toxin (PT), plus 50 μ M H-7, plus PT und H-7 sowie plus 500 nM PMA inkubiert. Durch Auswertung der Aufnahmen des zellfreien Spaltes erfolgte die Berechnung der Migrationsstrecken nach 40-stündiger Inkubation. Die Wanderungsstrecke der unbehandelten Kontrollzellen wurde zu 100% und dazu die Wanderungsstrecke der behandelten Zellen in Bezug gesetzt. Es wurden drei unabhängige Experimente als Dreifachansätze durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen nach dem Student's t-Test mit $**p = 0,0025$ für PT, mit $**p = 0,0018$ für H-7 und mit $**p = 0,0011$ für PT und H-7 zusammen eine hohe und mit $*p = 0,031$ für PMA eine statistische Signifikanz.

Für die Zellen, die mit PT inkubiert wurden, ist eine Hemmung der Migration von $41,0 \pm 3,6\%$ zu verzeichnen. Eine stärkere Inhibierung von $63,2 \pm 4,7\%$ ist bei der Zugabe des Inhibitors H-7 sowie von $63,1 \pm 3,7\%$ bei Koinkubation mit PT und H-7 festzustellen. Die Zugabe des Aktivators PMA bewirkt eine Steigerung der Migration um etwa 60% und zeigt ein gegenteiliges Ergebnis im Vergleich zum Inhibitor auf. Die Ergebnisse zeigen nach dem Student's t-Test mit $**p = 0,0025$ für PT, mit $**p = 0,0018$ für H-7 und mit $**p = 0,0011$ für PT und H-7 zusammen eine hohe und mit $*p = 0,031$ für PMA eine statistische Signifikanz. Diese Untersuchungen zur Inhibierung und Aktivierung der PKC lassen vermuten, dass die PKC bei der Signaltransduktion, die zu einer Beeinflussung der Zellmigration führt, eine Rolle spielt.

5.2.3 Einfluss von H-89 auf die Migration

Weitere Inhibitionsversuche sollten Rückschlüsse über die Beteiligung der Proteinkinase A (PKA) an den Regulationsprozessen der Migration ermöglichen. Dafür wurde den Hirnendothelzellen unter den zuvor erläuterten Migrationsbedingungen mit H-89 [1 μ M]

ein selektiver Inhibitor der PKA zugesetzt (s. 4.1.2.1). Dieser Inhibitor der PKA wurde bereits in vorangegangenen Untersuchungen zum Einfluss auf die Permeabilität in der angegebenen Konzentration verwendet (Brückener *et al.*, 2003). Dabei konnte jedoch kein Effekt auf die Permeabilisierung eines Endothelzelllayers beobachtet werden (Brückener *et al.*, 2003). Die Abbildung 5.10 fasst die Ergebnisse zum Einfluss einer Inhibierung der PKA durch H-89 graphisch zusammen und zeigt die prozentualen Wanderungstrecken der Zellen der verschiedenen Ansätze bezogen auf die Migrationsstrecke der Kontrollzellen. Diese konnten durch die zeitliche Verfolgung der Einwanderung in den zellfreien Spalt über einen Zeitraum von 40 Stunden berechnet werden. Dabei wurden die Strecken der Kontrollzellen zu 100% und dazu die Wanderungstrecken der behandelten Zellen in Bezug gesetzt.

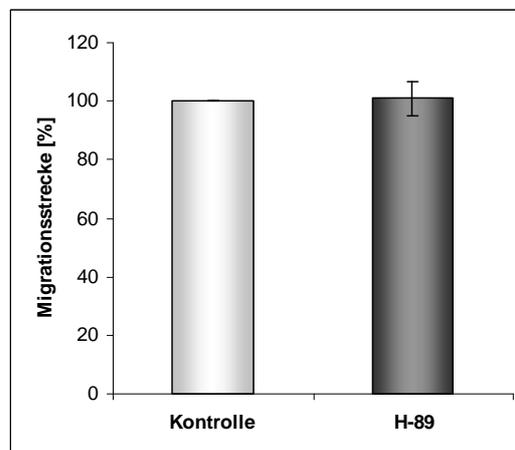


Abb. 5.10: Graphische Darstellung der Untersuchung zum Einfluss von H-89 auf die Migration von HBMEC. Es wurden 2×10^5 HBMEC mit Medium als Kontrolle sowie mit Medium plus $1 \mu\text{M}$ H-89 inkubiert. Die Berechnung der Migrationsstrecken erfolgte mit Hilfe der Aufnahmen des zellfreien Spaltes bezogen auf die Kontrollzellen. Es wurden drei unabhängige Experimente als Dreifachansätze durchgeführt.

Zwischen dem Migrationsverhalten der Kontrollzellen, die zu 100% gesetzt wurden, und dem der Zellen, die mit H-89 inkubiert wurden und im Vergleich zu den Kontrollzellen einen um 0,55% höheren Wert für die Wanderungstrecke erreichen, sind keine Unterschiede zu erkennen. Ein Einfluss einer Koinkubation von PT und PKA auf die Migration wurde nicht untersucht, da H-89 die Wanderung der Zellen nicht beeinflusst.

Eine Inhibierung der PKA hat keinen Effekt auf die Migration, so dass die PKA offenbar nicht direkt an der Hemmung der Prozesse der Migration beteiligt ist.

5.3 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen migrierender HBMEC

Um nähere Aufschlüsse über die Lokalisierung verschiedener Proteine, die in den PT vermittelten Signaltransduktionsweg zur Inhibierung involviert sein können, zu erhalten, wurden Immunfluoreszenzanalysen von HBMEC während des Migrationsprozesses durchgeführt. Die Zellen wurden auf Deckgläsern in 48-Well-Platten mit den Zylindern wie für die Migrationsexperimente beschrieben ausgesät (s. 4.1.2.1). Nach Entfernen der Zylinder wurden die Zellen ÜN mit oder ohne Pertussis Toxin inkubiert. Nach der Fixierung und Permeabilisierung der HBMEC wurden diese mit den entsprechenden primären und sekundären Antikörpern zum Nachweis spezifischer Proteine inkubiert (s. 4.2.1.1 – 4.2.1.3). Dabei wurden Zellen, die sich direkt am Spalt befinden, mit Zellen aus dem konfluenten Zelllayer verglichen. Es wurden Immunfluoreszenzen zum Nachweis der *tight junction* Proteine Claudin-1, Claudin-5 und Occludin, der PKC-Untereinheiten α , δ , ζ und η , der α -Untereinheiten inhibitorischer G-Proteine $G\alpha_{i-2}$ und $G\alpha_{i-3}$, der Polaritätsproteine PAR-3 und PAR-6, der Matrix Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 sowie der PI3K angefertigt.

Dabei konnten jedoch lediglich in den Immunfluoreszenzanalysen zum Nachweis von Occludin sowie den PKC-Isoformen α und ζ Unterschiede der Akkumulation in den Zellen im Layer verglichen mit denen, die in den zellfreien Raum migrieren, festgestellt werden. In der folgenden Abbildung 5.11 werden zunächst die Aufnahmen für den Nachweis von Occludin gezeigt.

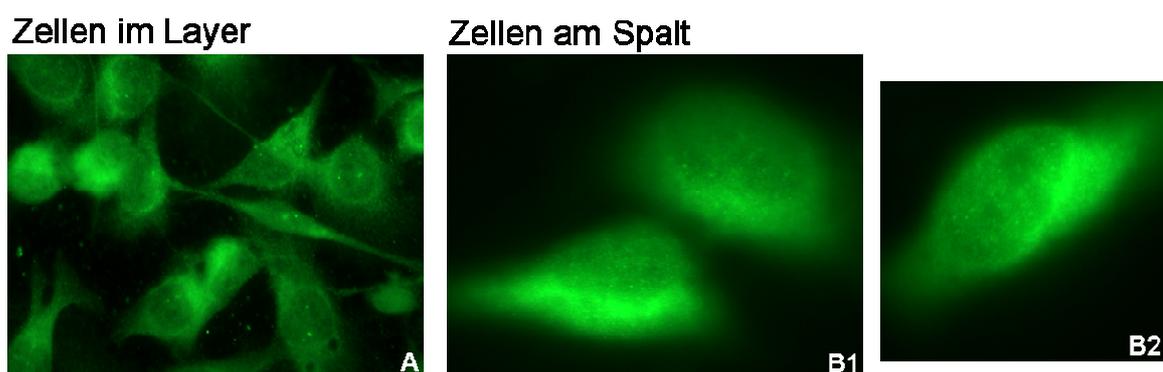


Abb. 5.11: Immunfluoreszenzanalysen zum Nachweis von Occludin in migrierenden HBMEC. (A) Kontrollzellen aus konfluentem Zelllayer: 600 x Vergrößerung, (B1, B2) Kontrollzellen am Spalt, vergrößerter Bildausschnitt. Es wurden 2×10^5 Zellen pro Well in 48-Well-Platten wie für den Migrationsversuch beschrieben (s. 4.1.2.1) auf Deckgläsern ausgesät. Die Inkubation in An- und Abwesenheit von PT erfolgte ÜN. Die Inkubation der Zellen mit PT zeigt keine Unterschiede zur Kontrolle (ohne Abbildung). Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen (s. 4.2.1.2) wurden diese mit dem primären Antikörper Anti-Occludin und dem sekundären Cy2-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-IgG (H+L) Antikörper wie unter 4.2.1.3 beschrieben markiert. Die Auswertung der Präparate erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M).

Es sind Unterschiede in der Lokalisation von Occludin in den Zellen aus dem konfluenten Layer verglichen mit den Zellen, die sich direkt am Spalt befinden, zu erkennen. Bei den Zellen, die in den zellfreien Spalt migrieren, liegen leichte Occludin-Akkumulationen an den Zellrändern vor (B1, B2), die in dieser Form in den Zellen im konfluenten Layer (A) nicht zu beobachten sind. Die Zugabe von PT induziert keine weiteren Unterschiede, so dass auf die Darstellung der Aufnahmen verzichtet wurde. In den Immunfluoreszenzanalysen zum Nachweis der weiteren *tight junction* Proteine Claudin-1 und Claudin-5 konnten keine Unterschiede in der Lokalisierung der Proteine im Zelloyer und den migrierenden Zellen am Spalt ausgemacht werden (Daten nicht gezeigt).

Die Abbildung 5.12 zeigt exemplarisch Aufnahmen zu den Immunfluoreszenzanalysen von PKC α , bei denen Veränderungen in der Lokalisation auftreten.

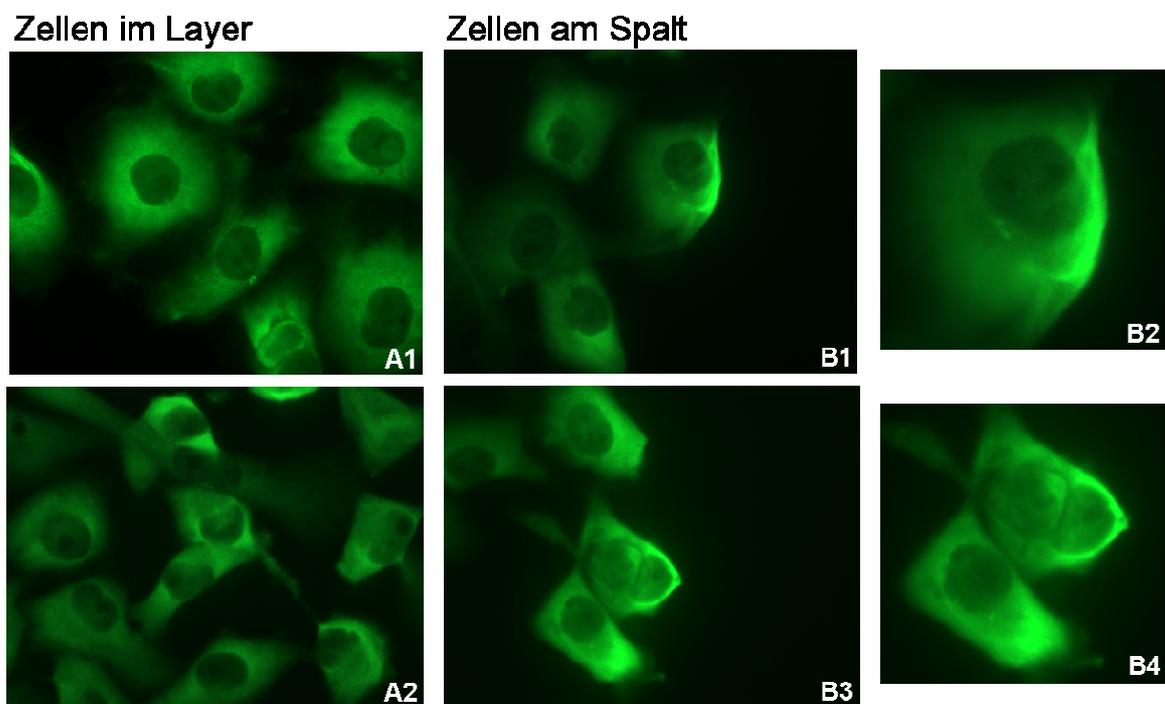


Abb. 5.12: Immunfluoreszenzanalysen zum Nachweis von PKC α in migrierenden HBMEC. A1 und A2 zeigen Kontrollzellen aus dem konfluenten Zelloyer: 600 x Vergrößerung. B1, B2, B3 und B4 zeigen Kontrollzellen am Spalt, B1 u. B3: 600 x Vergrößerung, B2 u. B4: vergrößerter Bildausschnitt. Es wurden 2×10^5 Zellen pro Well in 48-Well-Platten wie beim Migrationsversuch beschrieben auf Deckgläsern ausgesät (s. 4.1.2.1). Die Inkubation mit und ohne PT erfolgte ÜN. Die mit PT inkubierten Zellen zeigten keine Unterschiede zu den Kontrollzellen (ohne Abbildung). Nach der Fixierung und Permeabilisierung der Zellen (s. 4.2.1.2) wurden diese mit dem primären Antikörper Anti-PKC α und dem sekundären Cy2-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-IgG (H+L) Antikörper wie unter 4.2.1.3 beschrieben markiert. Die Auswertung der Präparate erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M).

Bei den Zellen (B1–B4), die in den Spalt einwandern, ist PKC α stärker an den Zellrändern in Richtung des Leitsaums zum zellfreien Raum lokalisiert, während es in den Zellen im

Layer (A1 und A2) im gesamten Zytoplasma gleichmäßig verteilt vorliegt. Die Inkubation mit PT ergab das gleiche Bild, weshalb auf die Darstellung verzichtet wurde.

In der folgenden Abbildung 5.13 sind die Aufnahmen zum Nachweis von PKC ζ dargestellt. Es können leichte Unterschiede in der Lokalisation von PKC ζ in den Zellen am Spalt (B1 und B2) und den Zellen aus dem Layer festgestellt werden. Das Protein ist bei den in den freien Raum migrierenden Zellen eher an den Zellrändern in Richtung des Leitsaums lokalisiert, und liegt bei den Zellen im Layer (A) im gesamten Zytoplasma gleichmäßig verteilt vor.

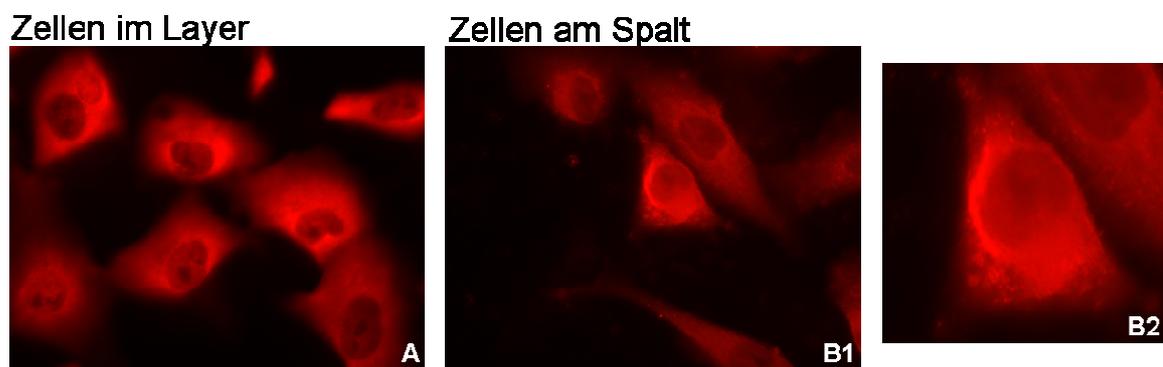


Abb. 5.13: Immunfluoreszenzanalysen zum Nachweis von PKC ζ in migrierenden HBMEC. A zeigt Kontrollzellen aus dem konfluenten Zellschicht: 600 x Vergrößerung. B1 und B2 zeigen Zellen am Spalt, B1: 600 x Vergrößerung, B2: vergrößerter Bildausschnitt einer 600 x Vergrößerung. Es wurden 2×10^5 Zellen pro Well in 48-Well-Platten wie für den Migrationsversuch beschrieben auf Deckgläsern ausgesät (s. 4.1.2.1). Die Inkubation mit und ohne PT erfolgte ÜN. Die Inkubation mit PT zeigte keine Unterschiede zu den Kontrollzellen (ohne Abbildung). Nach der Fixierung und der Permeabilisierung der Zellen (s. 4.2.1.2) wurden diese mit dem primären Antikörper Anti-PKC ζ und dem sekundären Cy3-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-IgG (H+L) Antikörper wie unter 4.2.1.3 beschrieben markiert. Die Präparate wurden am Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M) betrachtet.

In den Immunfluoreszenzanalysen zum Nachweis der weiteren PKC-Isoformen δ und η sowie der Proteine $G\alpha_{i-2}$, $G\alpha_{i-3}$, PAR-3 und PAR-6, MMP-2 und MMP-9 sowie PI3K konnten keine Unterschiede ihrer Akkumulation in den Zellen im Layer verglichen mit denen am zellfreien Spalt sowie in An- und Abwesenheit von PT detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

5.4 An den inhibitorischen Prozessen der Zellmigration von HBMEC beteiligte Proteine

Da die PKC-Isoformen α und ζ sowie das *tight junction* Protein Occludin in der Immunfluoreszenzanalyse eine verstärkte Lokalisation am Leitsaum aufzeigten, sollte eine Verringerung ihrer Expression, die durch Transfektion (s. 4.1.4) mit spezifischer siRNA

(s. 3.10) und Lipofektamin als Transfektionsreagenz erzielt werden kann, Rückschlüsse über ihre mögliche Beteiligung an den PT-induzierten Effekten auf das Migrationsverhalten liefern. Die Zellmigration ist ein sehr komplexer Prozess, an dem eine Vielzahl von verschiedenen Proteinen beteiligt ist.

Wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben können die Proteine $G_{\alpha_{i-2}}$ und $G_{\alpha_{i-3}}$, Claudin-1, PAR-3 und PAR-6 sowie MMP-2 und MMP-9 ebenfalls eine wichtige Rolle im Migrationsprozess spielen (vgl. 2.3.3). Diese Hinweise einer möglichen Beteiligung an der Zellwanderung sollten in Migrationsexperimenten mit HBMEC, in denen durch Transfektion mit spezifischer siRNA die Expression der Proteine herunterreguliert wurde, überprüft werden.

Die α -Untereinheiten $G_{\alpha_{i-2}}$ und $G_{\alpha_{i-3}}$ inhibitorischer heterotrimerer G-Proteine stehen mit dem Pertussis Toxin in einem direkten Zusammenhang, da sie als Zielmoleküle von PT durch die Toxin-vermittelte ADP-Ribosylierung modifiziert werden. Diese Beziehung lässt eine Beteiligung von $G_{\alpha_{i-2}}$ und $G_{\alpha_{i-3}}$ an den Regulationsmechanismen, die zur PT-vermittelten Inhibierung der Migration führen, vermuten. Aufgrund des Befundes einer begünstigten Migration bei einer PKC-regulierten Überexpression von Claudin-1, sollte dieses *tight junction* Protein neben Occludin ebenfalls auf eine Beteiligung am Migrationsprozess untersucht werden (Leotlela *et al.*, 2007). Untersuchungen am Zellpolaritätskomplex PAR-3 – aPKC – PAR-6 zeigten eine Beteiligung der Proteine PAR-3 und PAR-6 am Migrationsprozess. Dabei resultierten z.B. Experimente mit dominant-negativen Mutanten und eine siRNA-vermittelte Herunterregulierung einzelner Komponenten des Komplexes bei *Caenorhabditis elegans* in Veränderungen der Bildung der Zellpolarität und der Anordnung von *tight junctions* (Suzuki und Ohno, 2006). Matrix Metalloproteinasen (MMPs) sind in physiologischen Prozessen wie z.B. der Neubildung von Gewebe bei der Embryonalentwicklung und der Wundheilung beteiligt (Woessner und Nagase, 2000). Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Tournier zeigten eine aktive Beteiligung der MMP-9 an der Migration von humanen bronchialen Epithelzellen (HBEC), da sich eine Blockierung der Aktivierung oder der Aktivität von MMP-9 in einer reduzierten Migration äußert (Tournier *et al.*, 1999). Eine Zugabe aktivierter MMP-2 stimuliert ebenfalls die Migration von Epithelzellen (Quaranta *et al.*, 2000).

Vorangegangene Untersuchungen zeigten bereits eine reduzierte Migration bei Inhibierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) durch Wortmannin, die sich bei einer Zugabe von PT weiter verstärkte (Schulte, 2007). Dieses Ergebnis deutet darauf hin,

dass die PI3K möglicherweise an den Signaltransduktionswegen des PT-vermittelten inhibierenden Effektes auf die Migration beteiligt ist. Mit der qRT-PCR soll der direkte Einfluss des PT auf die Expression von PI3K untersucht werden.

5.4.1 Untersuchungen zur Effizienz der Transfektion von HBMEC mit siRNA und Lipofektamin

Migrationsversuche mit transfizierten HBMEC, in denen durch spezifische siRNA die Expression bestimmter Proteine herunterreguliert wurde, sollten Rückschlüsse über ihre Beteiligung am Migrationsprozess liefern. Zunächst wurden verschiedene Untersuchungen zu den Bedingungen und zur Effizienz der Transfektion von HBMEC mit siRNA und Lipofektamin als Transfektionsreagenz durchgeführt. Zur Bestimmung der Effizienz der Transfektion wurden Kontrollen mit dem BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo, einem Fluorescein-markiertem dsRNA Oligomer, hergestellt zur Verwendung in RNAi Analysen, durchgeführt. Zudem wurde die Expression der herunterregulierten Proteine in den transfizierten Proben durch Western Blot-Analyse bestimmt und eine Transkriptionsanalyse der mRNA mit der Methode der Qrt-PCR durchgeführt.

In Migrationsexperimenten mit HBMEC, die unter den angegebenen Transfektionsbedingungen (s. 4.1.4) nur mit dem Transfektionsreagenz Lipofektamin behandelt wurden, konnte kein Einfluss des Lipofektamins auf die Wanderung der Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen festgestellt werden. Bei den mikroskopischen Untersuchungen zur Effizienz der Transfektion mit dem BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo zeigte sich, dass etwa 50-70% der Zellen transfiziert wurden und das Fluorescein-markierte dsRNA Oligomer aufgenommen haben (Aufnahmen nicht gezeigt). Diese ermittelten Transfektionseffizienzen wurden bei der Auswertung der Migrationsexperimente in die Berechnung der Wanderungstrecken einbezogen.

Für Western Blot-Untersuchungen zur Effizienz der Synthese der Proteine wurden 20 h nach der Transfektion Gesamtzelllysate hergestellt und die Proteine durch eine SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Membran wurden diese durch spezifische Erst- und Zweitantikörper, an die alkalische Phosphatase gekoppelt ist, nachgewiesen (s. 4.3).

Der Nachweis der **PKC-Isoformen α und ζ** erfolgte mit den spezifischen Primärantikörpern Anti-PKC α und Anti-PKC ζ und einem sekundären Ziege-anti-

Kaninchen Antikörper. Das Ergebnis der Western Blot-Analyse ist in der Abbildung 5.14 dargestellt. α -Tubulin dient als interner Standard zum Nachweis einer vergleichbaren Beladung mit Gesamtzelllysate in der SDS-PAGE.

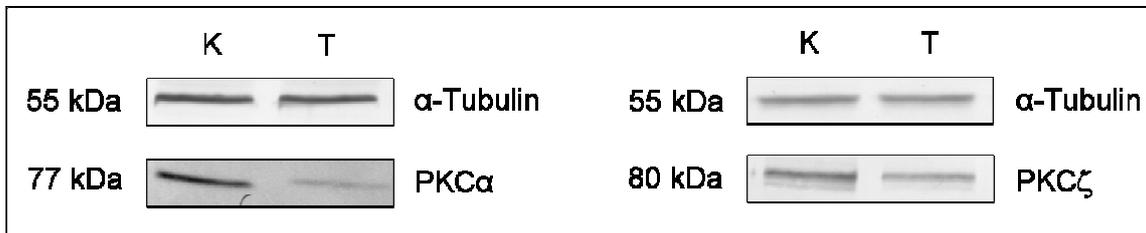


Abb. 5.14: Western Blot-Analyse zum Nachweis von PKC α und PKC ζ aus Gesamtzellextrakten von mit siRNA gegen PKC α und PKC ζ transfizierten HBMEC. Die Gesamtzelllysate der Kontrolle (K) und des Transfektionsansatzes (T) wurden 20 h nach der Transfektion (s. 4.1.4) hergestellt, und die Proteine durch eine SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion der Proteine mit den spezifischen primären Antikörpern Anti-PKC α und Anti-PKC ζ (beide polyklonale IgG aus Kaninchen) in einer 1:200-Verdünnung und Anti- α -Tubulin (Maus) in einer 1:1000-Verdünnung. Als sekundäre Antikörper dienen ein Ziege-anti-Kaninchen Antikörper und ein Ziege-anti-Maus Antikörper (beide 1:7000), an die eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist (s. 4.3).

Die Western Blots zum Nachweis von PKC α mit 77 kDa bzw. PKC ζ mit 80 kDa zeigen anhand der Kontrolle, dem Nachweis von α -Tubulin, dass in den beiden Gesamtzelllysaten des Kontroll- und des Transfektionsansatzes die gleiche Menge an Zelllysate aufgetragen wurde. In den Kontrollzellen ist sowohl für PKC α als auch für PKC ζ eine stärkere Bande nachweisbar als bei den transfizierten Zellen, was auf eine erfolgreiche Herunterregulierung der Proteinsynthese durch die transfizierte siRNA hindeutet.

Neben den Western Blot-Analysen wurde die mRNA Transkription von PKC α bzw. PKC ζ nach der Transfektion mit der qRT-PCR Methode untersucht, die eine genaue Quantifizierung der mRNA ermöglicht (s. 3.11 u. 4.4).

In der folgenden Abbildung 5.15 werden die Ergebnisse der qRT-PCR zur mRNA Transkription von PKC α bzw. PKC ζ in den Kontroll- und den Transfektionsansätzen tPKC α bzw. tPKC ζ dargestellt. Die mRNA Transkription von PKC α und PKC ζ ist nach der Transfektion mit spezifischer siRNA (s. 3.10 u. 4.1.4) deutlich geringer als bei den Kontrollzellen, was auf eine erfolgreiche Herunterregulierung der Proteine hindeutet. Verglichen mit den entsprechenden nicht transfizierten Kontrollzellen zeigt tPKC α eine um etwa 70% geringere mRNA Transkription für PKC α und tPKC ζ eine um etwa 60% verringerte Transkription für PKC ζ .

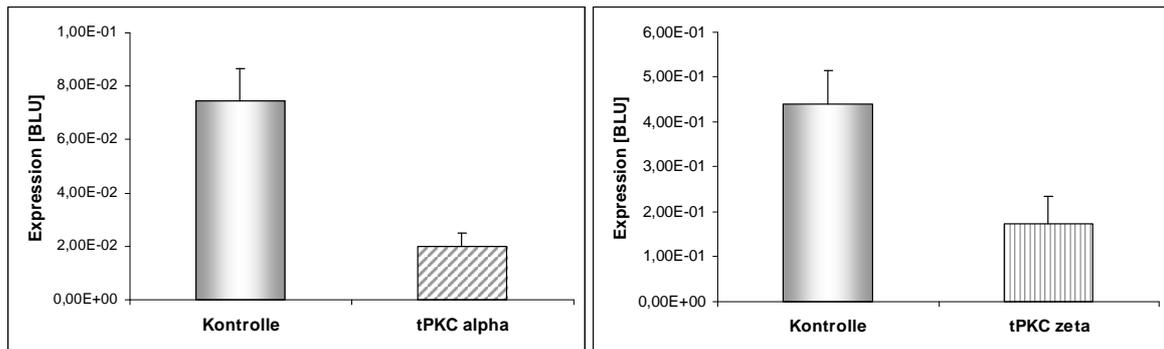


Abb. 5.15: Expression von PKC α bzw. PKC ζ in den Kontrollzellen und den Transfektionsansätzen tPKC α bzw. tPKC ζ . Nach der Transfektion (s. 4.1.4) mit den spezifischen siRNAs (s. 3.10) gegen PKC α bzw. PKC ζ und 20-stündiger Inkubation mit PT wurde die RNA isoliert, die cDNA synthetisiert und mit der Methode der qRT-PCR die Expression von PKC α bzw. PKC ζ quantitativ bestimmt (s. 3.11, 4.4.2, 4.4.3 u. 4.4.4). Die qRT-PCR wurde mit drei verschiedenen cDNAs je dreimal wiederholt.

Die $G\alpha$ -Untereinheiten $G\alpha_{i-2}$ und $G\alpha_{i-3}$ wurden durch die spezifischen Primärantikörper Anti- $G\alpha_{i-2}$ und Anti- $G\alpha_{i-3}$ und den sekundären Ziege-anti-Kaninchen Antikörper, an den eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist, nachgewiesen. Das α -Tubulin dient als interner Standard zum Vergleich der aufgetragenen Gesamt-Proteinmengen. Das Ergebnis der Western Blot-Analyse ist in der Abbildung 5.16 dargestellt.

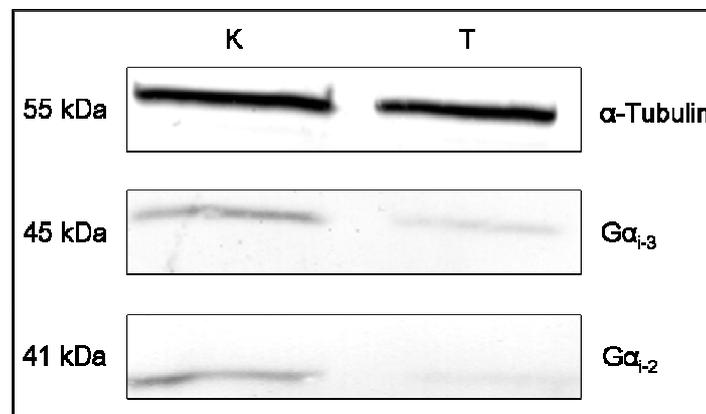


Abb. 5.16: Western Blot von Gesamtzelllysaten der mit siRNA gegen $G\alpha_{i-2}$ und $G\alpha_{i-3}$ transfizierten HBMEC zum Nachweis der $G\alpha$ -Untereinheiten $G\alpha_{i-2}$ und $G\alpha_{i-3}$. 20 h nach der Transfektion wurden die Gesamtzelllysate der Kontrolle (K) und des Transfektionsansatzes (T) hergestellt. Die Proteine wurden durch eine SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte die Detektion der $G\alpha$ -Untereinheiten $G\alpha_{i-2}$ und $G\alpha_{i-3}$. Dafür wurden die spezifischen primären Antikörper Anti- $G\alpha_{i-2}$ und Anti- $G\alpha_{i-3}$ (beide polyklonale IgG aus Kaninchen) in einer 1:200-Verdünnung und Anti- α -Tubulin (Maus) in einer 1:1000-Verdünnung verwendet. Als sekundäre Antikörper dienten ein Ziege-anti-Kaninchen Antikörper und ein Ziege-anti-Maus Antikörper (beide 1:7000), an die eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist (s. 4.3).

Sowohl im Kontrollansatz als auch im Transfektionsansatz zeigt der interne Standard α -Tubulin mit einem Molekulargewicht von 55 kDa gleich starke Banden, so dass gewährleistet ist, dass in der SDS-PAGE zur Auftrennung der Proteine gleiche Mengen der

Zelllysate aufgetragen wurden. Die Banden der $G\alpha$ -Untereinheiten mit den erwarteten Molekulargewichten von 41 kDa für $G\alpha_{i-2}$ und 45 kDa für $G\alpha_{i-3}$ weisen in der Kontrolle eine stärkere Expression im Vergleich zu den Transfektionsansätzen auf, was zeigt, dass die siRNA die Expression von $G\alpha_{i-2}$ und $G\alpha_{i-3}$ deutlich reduziert hat, und auf eine gute Effizienz der Transfektion hindeutet.

Der Nachweis der *tight junction* Proteine **Claudin-1** und **Occludin** erfolgte mit den spezifischen Erst-Antikörpern Anti-Claudin-1 und Anti-Occludin und den sekundären Ziege-anti-Kaninchen Antikörpern mit gekoppelter alkalischer Phosphatase. Als interner Standard zur Kontrolle, dass in der SDS-PAGE gleiche Mengen der Zelllysate aufgetragen wurden, diente α -Tubulin (Abb. 5.17).

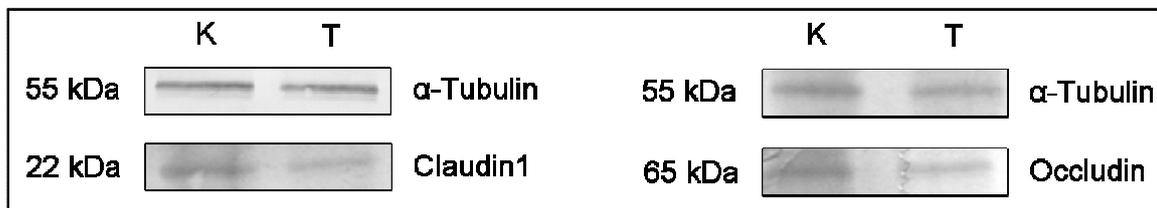


Abb. 5.17: Western Blot von Gesamtzelllysaten transfizierter HBMEC zum Nachweis von Claudin-1 und Occludin. Die Gesamtzelllysate der Kontrolle (K) und des Transfektionsansatzes (T) wurden 20 h nach der Transfektion hergestellt, und die isolierten Proteine durch eine SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte der Nachweis der Proteine mit den spezifischen primären Antikörpern Anti-Claudin-1 und Anti-Occludin (beide polyklonale IgG aus Kaninchen) in einer 1:200-Verdünnung und Anti- α -Tubulin (Maus) in einer 1:1000-Verdünnung. Als sekundäre Antikörper dienten ein Ziege-anti-Kaninchen Antikörper und ein Ziege-anti-Maus Antikörper (beide 1:7000), an die eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist (s. 4.3).

In den Kontrollen und den Transfektionsansätzen ist α -Tubulin (55 kDa) in vergleichbarer Menge nachweisbar, so dass gewährleistet ist, dass gleiche Zelllysatenmengen aufgetragen wurden. Für Claudin-1 mit 22 kDa und Occludin mit 65 kDa kann eine stärkere Bande und somit höhere Expression in den Kontrollen im Vergleich zu den Transfektionsansätzen detektiert werden. In den Transfektionsansätzen ist daher durch die transfizierte spezifische siRNA die Expression der Proteine herunterreguliert.

5.4.2 Einfluss der Transfektion von HBMEC mit siRNA gegen $PKC\alpha$ und $PKC\zeta$ auf die PT-vermittelten Effekte

Eine Aktivierung der PKC erhöht die Anheftung, Proliferation und Migration von Endothelzellen aus Nabelschnurvenen. Ihre Inhibierung hingegen verringert diese Fähigkeiten der Zellen (Kent, 1995). Um die Beteiligung von $PKC\alpha$ und ζ an der durch das Pertussis Toxin hervorgerufenen Inhibierung der Migration zu untersuchen, wurden

HBMEC mit spezifischer siRNA gegen PKC α und PKC ζ transfiziert (s. 3.10 u. 4.1.4) und in Migrationsexperimenten (s. 4.1.2.1) eingesetzt. Mit Hilfe der Dokumentation der Einwanderung der Zellen in den zellfreien Spalt wurden die im Zeitintervall von 24 h zurückgelegten Wanderungstrecken in Strecken pro Stunde umgerechnet. Diese Wanderungsgeschwindigkeit der unbehandelten Kontrollzellen wurde zu 100% gesetzt und dazu die Wanderungsgeschwindigkeit der mit PT-inkubierten, transfizierten (tPKC α und tPKC ζ) sowie transfizierten und mit PT-inkubierten Zellen in Bezug gesetzt (Abb. 5.18). Die erreichte Transfektionseffizienz von etwa 50% wurde bei der Auswertung der Wanderungstrecken in die Berechnung einbezogen.

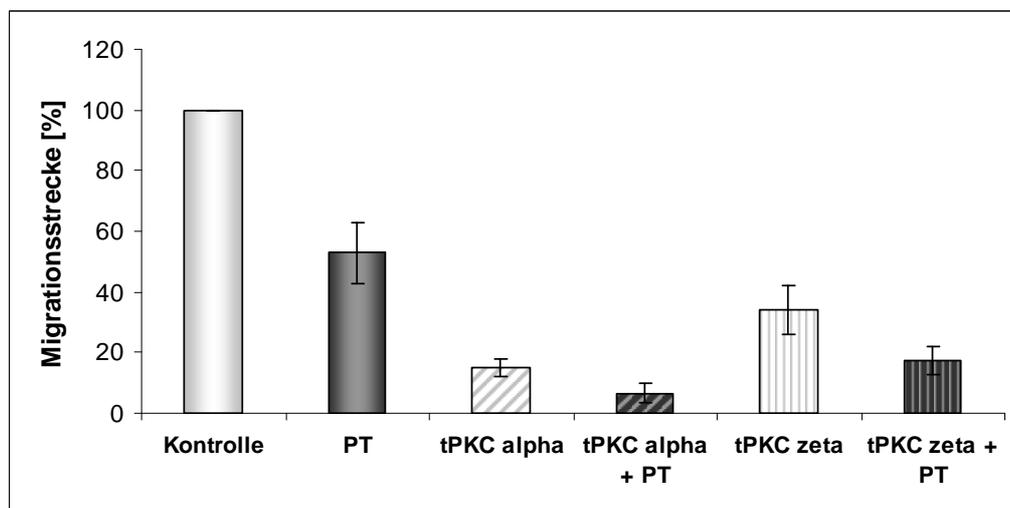


Abb. 5.18: Graphische Darstellung zur Untersuchung der Beteiligung von PKC α und PKC ζ an den Migrationsprozessen nach Herunterregulierung der Expression der Proteine durch Transfektion. Nach der Transfektion mit spezifischer siRNA und Lipofektamin (s. 4.1.4) wurden 2×10^5 HBMEC der verschiedenen Ansätze und unbehandelten Zellen mit den Zylindern mit Medium plus PT inkubiert (s. 4.1.2.1). Die Berechnung der Migrationsstrecken erfolgte mit Hilfe der Aufnahmen des zellfreien Spaltes bezogen auf die Kontrollzellen. Es wurden vier unabhängige Experimente als Dreifachansätze durchgeführt. Die Transfektionseffizienz von 50% wurde bei der Auswertung der Wanderungstrecken in die Berechnung einbezogen.

Die nicht transfizierten Zellen zeigen nach Zugabe von PT eine Verringerung der Migration um $47,1 \pm 10,2\%$ im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Bei den transfizierten Zellen ist eine starke Reduzierung der Migration zu beobachten. Diese verstärkt sich weiter, wenn die Zellen zusätzlich mit PT inkubiert werden. Die beschriebene Inhibierung ist bei den Ansätzen mit siRNA gegen PKC α (tPKC α) mit $84,9 \pm 2,2\%$ und gleichzeitiger Zugabe von PT mit $93,5 \pm 3,0\%$ geringfügig größer als die der Ansätze, in denen PKC ζ (t PKC ζ) herunterreguliert wurde. Hier ergibt sich eine Inhibierung um $65,9 \pm 7,9\%$ ohne und eine um $82,8 \pm 4,5\%$ mit PT. Aus diesen

Ergebnissen kann geschlossen werden, dass beide PKC-Isoformen an den Signaltransduktionswegen, die zur Hemmung der Migration führen, beteiligt sein könnten.

Bei der Wundheilung spielt neben der Wanderung der Zellen die Proliferation eine bedeutende Rolle (Chaudhuri *et al.*, 2006). Vorangegangene Ergebnisse eines Zellproliferationsassays (*Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)*, Roche, s. 4.1.3.1) haben gezeigt, dass PT die Proliferation von HBMEC nicht beeinflusst (Schulte, 2007). Die reduzierte Migration der mit siRNA gegen PKC α und PKC ζ transfizierten HBMEC könnte somit auch an einer Beteiligung der PKC-Isoformen an der Proliferation liegen. Die Abbildung 5.19 zeigt die Ergebnisse zur Untersuchung zum Einfluss einer Herunterregulierung von PKC α und PKC ζ durch Transfektion mit spezifischer siRNA auf die Zellproliferation von HBMEC.

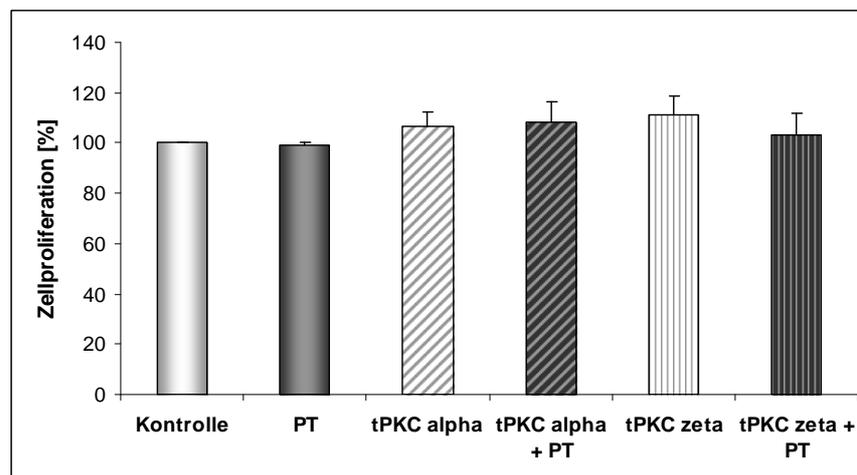


Abb. 5.19: Einfluss einer Herunterregulierung von PKC α und PKC ζ auf die Zellproliferation von HBMEC nach Inkubation in Medium und in Medium plus PT. Die HBMEC wurden mit spezifischer siRNA gegen PKC α und PKC ζ transfiziert (s. 4.1.4). Für den anschließenden Zellproliferationsassay (*Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)*, Roche Diagnostics, Mannheim) wurden 7×10^4 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte in 100 μ l Medium mit und ohne PT [200 ng/ml] angezogen (s. 4.1.3.1). Nach zwei Tagen erfolgte die Durchführung des Versuches nach den Angaben des Herstellers. Der Test beruht auf dem Einbau von BrdU anstelle von Thymidin in neu synthetisierte DNA sich teilender Zellen. Der monoklonale Antikörper Anti-BrdU-POD aus Maus bindet an das eingebaute BrdU. Diese Komplexe können aufgrund einer durch Zugabe weiterer Reagenzien hervorgerufenen Farbreaktion mit einem im ELISA-Reader bei 450 nm quantifiziert werden. Die Farbentwicklung und somit die gemessenen Extinktionen korrelieren direkt mit der Menge an synthetisierter DNA und damit auch mit der Anzahl sich teilender Zellen. Die Absorptionen wurden bezogen auf die Kontrolle berechnet. Die Berechnung erfolgte aus drei unabhängigen Proliferationsversuchen.

Im Proliferationsassay mit dem Kit *Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)* (s. 4.1.3.1) konnte für HBMEC-Zellen, in denen die Expression von PKC α und PKC ζ durch Transfektion herunterreguliert wurde, kein Effekt auf das Proliferationsverhalten der Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten Kontrollzellen festgestellt werden (Abb.5.19).

Der hemmende Effekt auf die Migration basiert demzufolge nicht auf einem veränderten Proliferationsverhalten.

5.4.3 Einfluss der Transfektion von HBMEC mit siRNA gegen $G\alpha_{i-2}$ und $G\alpha_{i-3}$ auf die PT-vermittelten Effekte

Das Pertussis Toxin ADP-ribosyliert die α -Untereinheiten inhibitorischer heterotrimerer G-Proteine, was vermuten lässt, dass die $G\alpha$ -Untereinheiten $G\alpha_{i-2}$ und $G\alpha_{i-3}$ bei den Regulationsmechanismen der PT-induzierten Inhibierung der Migration eine Rolle spielen. Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung wurde die Expression von $G\alpha_{i-2}$ und $G\alpha_{i-3}$ in HBMEC durch Transfektion mit siRNA (s. 3.10 u. 4.1.4) herunterreguliert und anschließend das Wanderungsverhalten dieser Zellen in Migrationsexperimenten (s. 4.1.2.1) beobachtet und dokumentiert. Dafür wurde die spezifische siRNA für $G\alpha_{i-2}$ und $G\alpha_{i-3}$ in HBMEC in einem Ansatz gleichzeitig transfiziert. Eine gleichzeitige Reduzierung von $G\alpha_{i-2}$ und $G\alpha_{i-3}$ wurde gewählt, da erste Versuche gezeigt haben, dass bei einer Herunterregulierung nur einer Untereinheit die Aufgaben der herunterregulierten Untereinheit vermutlich von der nicht transfizierten teilweise übernommen werden, da keine Unterschiede im Migrationsverhalten erkennbar sind (Daten nicht gezeigt). Die Abbildung 5.20 fasst die Ergebnisse dieser Untersuchungen graphisch zusammen.

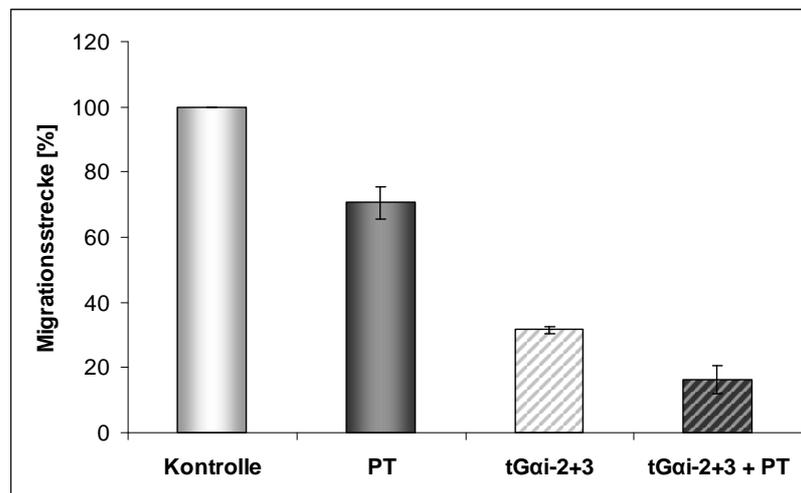


Abb. 5.20: Graphische Darstellung zur Untersuchung der Beteiligung von $G\alpha_{i-2+3}$ an der PT-vermittelten Hemmung der Migration nach Herunterregulierung der Expression der Proteine durch Transfektion. Nach der Transfektion (s. 4.1.4) mit beiden spezifischen siRNAs in einem Ansatz und Lipofektamin wurden 2×10^5 HBMEC der verschiedenen Ansätze und unbehandelten Zellen mit den Zylindern mit Medium sowie mit Medium plus PT inkubiert (s. 4.1.2.1). Die Berechnung der Migrationsstrecken erfolgte mit Hilfe der Aufnahmen vom zellfreien Spalt bezogen auf die Kontrollzellen. Es wurden vier unabhängige Experimente als Dreifachansätze durchgeführt. Die bestimmte Transfektionseffizienz von etwa 70% wurde bei der Auswertung der Wanderungsstrecken in die Berechnung einbezogen.

Zur Auswertung wurden die im Zeitintervall von 24 h zurückgelegten Wanderungstrecken in Strecken pro Stunde umgerechnet. Diese berechnete Wanderungsgeschwindigkeit der unbehandelten Kontrollzellen wurde zu 100% und dazu die Wanderungsgeschwindigkeit der mit PT-inkubierten, transfizierten ($tG\alpha_{i2+3}$) sowie transfizierten und mit PT-inkubierten Zellen in Bezug gesetzt. Die bestimmte Transfektionseffizienz von etwa 70% wurde bei der Auswertung der Wanderungstrecken in die Berechnung einbezogen.

Der Ansatz, in dem beide $G\alpha$ -Untereinheiten ($tG\alpha_{i2+3}$) herunterreguliert wurden, zeigt eine starke Hemmung der Migration von $68,5 \pm 0,9\%$. Die Zugabe von PT zum Transfektionsansatz verstärkt die Inhibierung auf $83,2 \pm 4,2\%$. Die transfizierten Zellen weisen eine höhere Hemmung als die Kontrollzellen bei Inkubation mit PT auf, bei denen die Migration im Vergleich zu den Kontrollzellen um 30% inhibiert ist. Aufgrund der gezeigten Hemmung der Migration nach der gleichzeitigen Herunterregulierung von $G\alpha_{i-2}$ und $G\alpha_{i-3}$ können beide Proteine an den Prozessen, die zur PT-vermittelten Inhibierung führen, beteiligt sein. In Untersuchungen mit der qRT-PCR-Methode zur Expression von $G\alpha_{i-2}$ und $G\alpha_{i-3}$ im Verlauf des Migrationsprozesses bei Inkubation für 0 h, 6 h und 20 h mit Medium sowie Medium plus PT konnten keine Unterschiede in der Expression der $G\alpha$ -Untereinheiten festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Das PT nimmt keinen Einfluss auf die Expression von $G\alpha_{i-2}$ und $G\alpha_{i-3}$, inhibiert es jedoch durch die ADP-Ribosylierung.

5.4.4 Einfluss der Transfektion von HBMEC mit siRNA gegen Claudin-1 und Occludin auf die PT-vermittelten Effekte

Claudin-1 und Occludin gehören zu den *tight junction* (TJ)-Proteinen. TJ sind undurchlässige Zell-Zell-Verbindungen, die zwischen den zerebralen Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke liegen und zwei wichtige Barrierefunktionen ausüben. Als Diffusionsbarriere zwischen den Zellen verhindern sie fast vollständig einen parazellulären Transport nicht membrangängiger Substanzen und tragen durch Verhinderung der freien Diffusion von Komponenten der Plasmamembran wie Membranproteine und -lipide zur Aufrechterhaltung der Zellpolarität bei.

In Immunfluoreszenzanalysen zur Lokalisation von Claudin-1 zeigte sich nach sechs Stunden der PT-Inkubation eine veränderte Lokalisation des TJ-Proteins. Diese Beobachtung könnte auf einer Umverteilung des Proteins beruhen, da eine veränderte Gesamtexpression von Claudin-1 im Western Blot nicht beobachtet werden konnte. Das Protein ist nicht mehr nur an den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert, sondern befindet sich vermehrt im Zytosol. Nach 24 Stunden sind keine Veränderungen in der Claudin-1

Verteilung mehr nachzuweisen, so dass diese Relokalisation transiente Reaktionen auf die PT Inkubation darstellen. Für Occludin waren die Ergebnisse nicht eindeutig und bedürfen zusätzlicher Untersuchungen (Böcker, 2007).

Weitere Transfektionsversuche sollten Rückschlüsse auf eine Beteiligung von Claudin-1 und Occludin an der Migration bzw. an der PT-vermittelten Hemmung ermöglichen. Für diese Untersuchungen wurden HBMEC mit spezifischer siRNA gegen Claudin-1 und Occludin transfiziert (s. 3.10 u. 4.1.4) und in anschließenden Migrationsexperimenten (s. 4.1.2.1) eingesetzt. Mit Hilfe der Dokumentation der Einwanderung der Zellen in den zellfreien Spalt wurden die im Zeitintervall von 24 h zurückgelegten Wanderungstrecken in Strecken pro Stunde umgerechnet. Diese Wanderungsgeschwindigkeit der unbehandelten Kontrollzellen wurde zu 100% gesetzt und dazu die Wanderungsgeschwindigkeit der mit PT-inkubierten, transfizierten (tClaudin-1 und tOccludin) sowie transfizierten und mit PT-inkubierten Zellen in Bezug gesetzt (Abb. 5.21). Die errechnete Transfektionseffizienz von etwa 60% wurde bei der Berechnung der zurückgelegten Migrationsstrecken einbezogen.

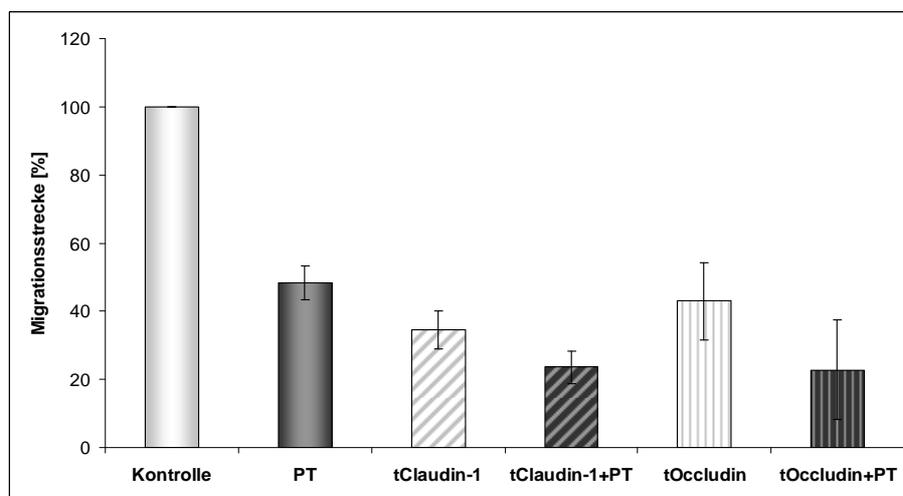


Abb. 5.21: Graphische Darstellung zur Beteiligung von Claudin-1 und Occludin an der PT-vermittelten Hemmung der Migration nach Herunterregulierung der Expression der Proteine durch Transfektion. Nach der Transfektion mit den spezifischen siRNAs (s. 3.10 und 4.1.4) wurden 2×10^5 HBMEC der verschiedenen Ansätze und der unbehandelten Zellen mit Medium sowie mit Medium plus PT unter Migrationsbedingungen inkubiert (s. 4.1.2.1). Die Berechnung der Migrationsstrecken erfolgte bezogen auf die Kontrollzellen mit Hilfe der Aufnahmen vom zellfreien Spalt. Die ermittelte Transfektionseffizienz von etwa 60% wurde bei der Auswertung der Wanderungstrecken in die Berechnung einbezogen. Es wurden drei unabhängige Experimente als Dreifachansätze durchgeführt.

Die nicht transfizierten Zellen weisen nach Zugabe von PT eine Hemmung der Migration von $51,6 \pm 4,9\%$ auf. Die Migration der transfizierten Zellen ist bei Inkubation sowohl ohne als auch mit PT geringer. Die Zellen, in denen Claudin-1 (tClaudin-1) herunterreguliert

wurde, weisen ohne Zugabe von PT eine Inhibierung von $65,6 \pm 5,6\%$ und bei einer Inkubation mit PT eine Hemmung von $76,4 \pm 4,8\%$ auf. Bei der Verwendung der siRNA gegen Occludin (tOccludin) werden mit einer Inhibierung von $57,1 \pm 11,5\%$ im Ansatz ohne PT und $77,2 \pm 14,6\%$ im Ansatz mit PT ähnliche Werte für die Inhibierung der Migration erreicht. Es können folglich beide untersuchten *tight junction* Proteine eine Rolle bei den Migrationsprozessen spielen.

5.4.5 Einfluss der Transfektion von HBMEC mit siRNA gegen PAR-3 und PAR-6 auf die PT-vermittelten Effekte

Verschiedene Untersuchungen am Zellpolaritätskomplex PAR-3 – aPKC – PAR-6 zeigten eine Beteiligung der Proteine PAR-3 und PAR-6 am Migrationsprozess. Dabei resultierten z.B. Experimente mit dominant-negativen Mutanten und eine siRNA-vermittelte Herunterregulierung einzelner Komponenten des Komplexes bei *Caenorhabditis elegans* in Veränderungen der Bildung der Zellpolarität und der Anordnung von *tight junctions* (Suzuki und Ohno, 2006).

Durch eine Herunterregulierung von PAR-3 und PAR-6 und daraus resultierenden Effekten auf das Wanderverhalten der Zellen sollte eine Beteiligung dieser Proteine an den Signaltransduktionswegen, die zur Inhibierung der Migration durch das Pertussis Toxin führen, untersucht werden. Die Abbildung 5.22 zeigt die Ergebnisse des Migrationsversuches. Mit Hilfe der Dokumentation der Einwanderung der Zellen in den zellfreien Spalt wurden die im Zeitintervall von 24 h zurückgelegten Wanderungstrecken in Wanderungsgeschwindigkeiten umgerechnet. Der Wert für die unbehandelten Kontrollzellen wurde zu 100% gesetzt und dazu die Wanderungsgeschwindigkeit der mit PT-inkubierten, transfizierten (tPAR-3 und tPAR-6) sowie transfizierten und mit PT-inkubierten Zellen in Bezug gesetzt. Die ermittelte Effizienz der Transfektion von etwa 50% wurde bei der Auswertung der Wanderungstrecken einberechnet.

Die nicht transfizierten Zellen, die mit PT inkubiert wurden, zeigen eine Inhibierung von $46,1 \pm 4,6\%$ im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die mit siRNA gegen PAR-3 transfizierten Zellen (tPAR-3) weisen ohne Zugabe von PT eine Hemmung von $75,5 \pm 2,9\%$ und bei Zugabe von PT eine Hemmung von $88,4 \pm 4,5\%$ auf. Bei der Herunterregulierung von PAR-6 (tPAR-6) liegt eine Inhibierung von $72,1 \pm 10,4\%$ und nach einer Inkubation mit PT eine Inhibierung von $87,2 \pm 12,1\%$ vor. Diese Ergebnisse werden in der Abbildung 5.22 graphisch zusammengefasst dargestellt. Diese Resultate

bestätigen die Ergebnisse einer Beteiligung von PAR-3 und PAR-6 an den Migrationsprozessen von Suzuki und Ohno (2006) auch für HBMEC.

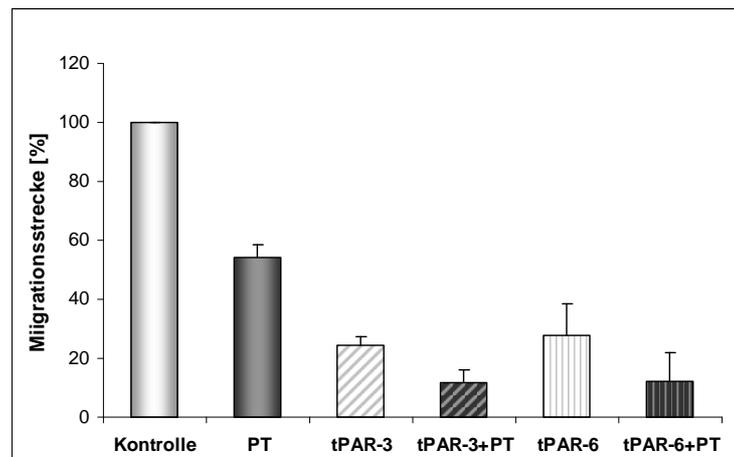


Abb. 5.22: Graphische Darstellung zur Untersuchung der Beteiligung von PAR-3 und PAR-6 an den PT-vermittelten Effekten auf die Migration nach Herunterregulierung der Expression der Proteine durch Transfektion. Nach der Transfektion mit der spezifischen siRNA und Lipofektamin (4.1.4) wurden 2×10^5 HBMEC der verschiedenen Ansätze und unbehandelte Zellen mit den Zylindern mit Medium sowie mit Medium plus PT inkubiert (s. 4.1.2.1). Die Berechnung der Migrationsstrecken erfolgte mit Hilfe der Aufnahmen des zellfreien Spaltes bezogen auf die Kontrollzellen. Es wurden drei unabhängige Experimente als Dreifachansätze durchgeführt. Die ermittelte Transfektionseffizienz von etwa 50% wurde bei der Auswertung der Wanderungsstrecken in die Berechnung einbezogen.

Diese Ergebnisse könnten einen additiven Effekt bei Zugabe von PT zu den transfizierten Zellen aufweisen, das einen direkten Einfluss von PT auf die Proteine aufzeigen könnte. Parallele Untersuchungen zur qRT-PCR Transkriptionsanalyse ergaben eine reduzierte mRNA Transkription für PAR-6 nach Behandlung mit PT. Die Transkription der mRNA von PAR-3 war nach Toxinbehandlung im Vergleich zu mRNA aus unbehandelten Kontrollzellen signifikant erhöht (Seidel, 2010). PT hat somit einen Einfluss auf den Komplex aus PAR-3 und PAR-6. PAR-3 und PAR-6 können möglicherweise an den Regulationsmechanismen der PT-vermittelten Inhibierung der Migration beteiligt sein.

5.4.6. Einfluss der Transfektion von HBMEC mit siRNA gegen MMP-2 und MMP-9 auf die PT-vermittelten Effekte

Die Matrix Metalloproteinasen 2 und 9 (MMP-2/-9) können an den Prozessen, die zur Hemmung der Migration führen, beteiligt sein (Tournier *et al.*, 1999; Quaranta *et al.*, 2000). Ob dieser Befund auch für HBMEC zutrifft, sollte durch Migrationsversuche mit Zellen geprüft werden, die nach Transfektion mit siRNA gegen MMP-2/-9 weniger MMP-2/-9 exprimierten als in einem parallelen Ansatz entsprechende Kontrollzellen (s. 4.1.2.1 u. 4.1.4). Die Abbildung 5.23 fasst die Dokumentation der Einwanderung der Zellen in den

zellfreien Spalt aus dem Migrationsversuch in Form der zurückgelegten Migrationsstrecken in Prozent zusammen. Dabei wurden die im Zeitintervall von 24 h zurückgelegten Wanderungstrecken in Strecken pro Stunde umgerechnet und die erhaltene Wanderungsgeschwindigkeit der unbehandelten Kontrollzellen zu 100% gesetzt. Auf diesen Wert wurden die Wanderungsgeschwindigkeiten der Zellen, die mit PT inkubiert, mit siRNA transfiziert (tMMP-2 und tMMP9) sowie transfiziert und mit PT inkubiert wurden, in Bezug gesetzt. Für diese Transfektionsversuche konnte eine Effizienz von etwa 60% festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Diese wurde bei Bestimmung der Wanderungstrecken in die Berechnung einbezogen,

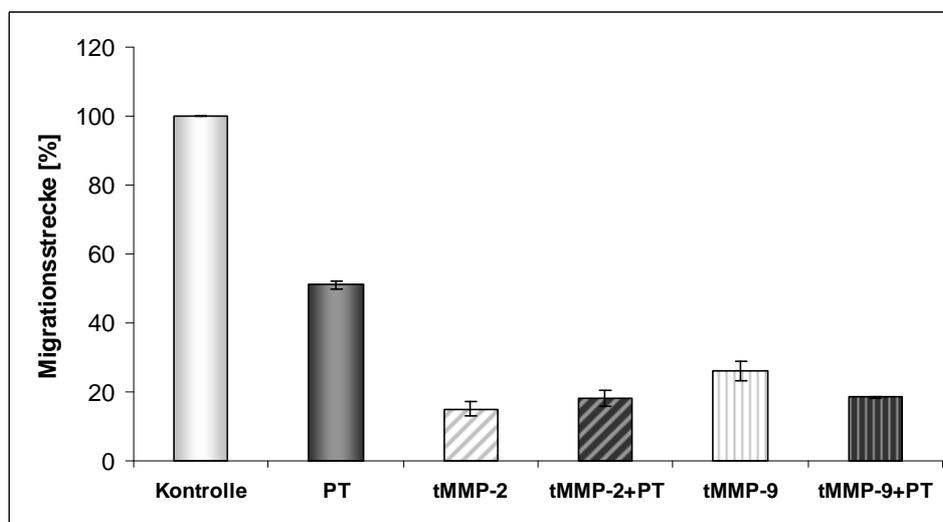


Abb. 5.23: Graphische Darstellung zur Untersuchung der Beteiligung von MMP-2 und MMP-9 an der PT-vermittelten Hemmung der Migration nach Herunterregulierung der Expression der Proteine durch Transfektion. Nach der Transfektion mit den spezifischen siRNAs (s. 4.1.4) wurden 2×10^5 HBMEC der verschiedenen Ansätze und unbehandelten Zellen mit den Zylindern mit Medium sowie mit Medium plus PT inkubiert (s. 4.1.2.1). Die Berechnung der Migrationsstrecken erfolgte bezogen auf die Kontrollzellen mit Hilfe der Aufnahmen vom zellfreien Spalt. Die ermittelte Transfektionseffizienz wurde bei der Auswertung der Migrationsstrecken in die Berechnung einbezogen. Es wurden drei unabhängige Experimente als Dreifachansätze durchgeführt.

Bei den Migrationsversuchen ergibt sich für die nicht transfizierten Zellen nach Zugabe von PT eine Hemmung von $49,1 \pm 1,9\%$. Die transfizierten Zellen zeigen für die Herunterregulierung von MMP-2 (tMMP-2) eine Inhibierung von $84,9 \pm 2,2\%$ und nach Zugabe von PT eine Inhibierung von $82,1 \pm 2,3\%$. Für die Transfektion mit siRNA gegen MMP-9 (tMMP-9) ergeben sich eine Hemmung von $73,9 \pm 2,9\%$ ohne und $81,4 \pm 0,2\%$ mit PT. Diese Ergebnisse bestätigen den Befund einer Beteiligung der MMP-2 und MMP-9 an den Prozessen, die zur Hemmung der Migration führen, auch für HBMEC (Tournier *et al.*, 1999; Quaranta *et al.*, 2000). Beide Proteine können daher bei den Prozessen, die zur Hemmung der Migration führen, eine Rolle spielen.

5.4.7 Einfluss des Pertussis Toxins auf die Expression von PI3K und Rac1

Aus vorangegangenen Untersuchungen geht hervor, dass die PI3K bei der Signaltransduktion, die an der inhibierenden Wirkung von PT auf die Migration von HBMEC beteiligt ist, eine Rolle spielen könnte. Dabei zeigten Migrationsversuche mit Wortmannin, einem selektiven Inhibitor der PI3K, eine starke Hemmung der Migration von HBMEC, die sich bei Koinkubation mit PT noch verstärkte (Schulte, 2007).

Die kleine GTPase Rac spielt bei der Migration von Zellen eine wichtige Rolle, da sie für die Bildung der Lamellipodien, die von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Signalen der Extrazellulären Matrix induziert wird, erforderlich ist (Ridley *et al.*, 1992; Ridley und Hall 1992; Miki *et al.*, 2000). Videomikroskopische Experimente zeigten, dass embryonale Muskelzellen nicht migrieren können, wenn Rac inhibiert wird (Nobes und Hall, 1999; Knight *et al.*, 2000). Die Aktivierung von Rac erfolgt durch Tyrosinkinasen und G-Proteingekoppelte Rezeptoren und ist in beiden Fällen abhängig von der Aktivität der PI3K (Sander *et al.*, 1998; Rickert *et al.*, 2000; Royal *et al.*, 2000), so dass diese beiden Signalmoleküle bei der Migration zusammenspielen könnten.

Mit der Methode der qRT-PCR wurde der Einfluss von Pertussis Toxin auf die Expression von PI3K und Rac1 untersucht. Dafür wurden die Zellen für sechs Stunden mit Medium oder mit Medium plus PT inkubiert, die Gesamt-RNA isoliert und nach der cDNA-Synthese die Expression quantitativ bestimmt (s. 3.11, 4.4.2, 4.4.3 u. 4.4.4). Die Abbildung 5.24 zeigt die Expression für die Proteine PI3K und Rac1.

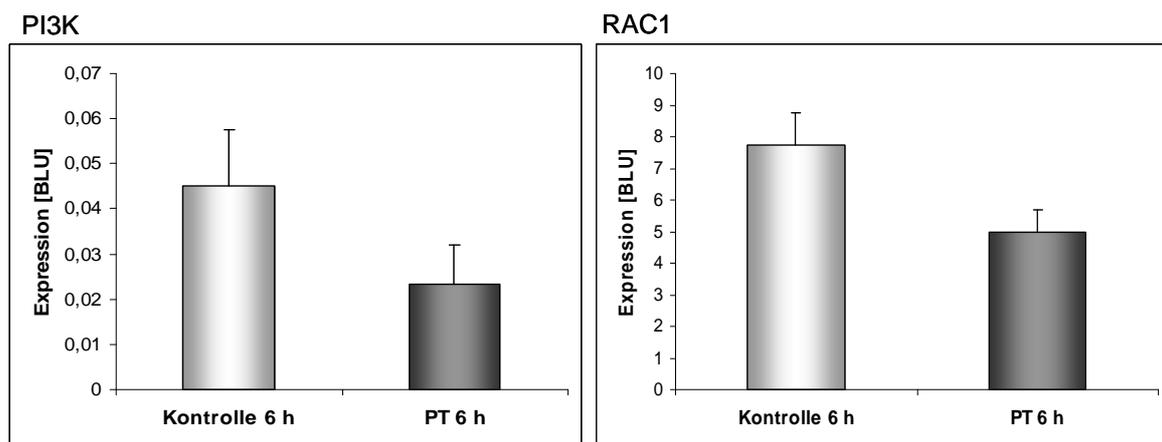


Abb. 5.24: Expression von PI3K bzw. Rac1 in den Kontrollzellen und nach 6-stündiger Inkubation mit PT. Nach 6-stündiger Inkubation mit PT wurde die Gesamt-RNA isoliert, die cDNA synthetisiert und mit der Methode der qRT-PCR die Expression von PI3K und Rac1 quantitativ bestimmt (s. 4.4.2, 4.4.3 u. 4.4.4). Die Versuche wurden mit drei unterschiedlichen cDNAs je dreimal wiederholt.

Es kann sowohl für PI3K und als auch für Rac1 bei Inkubation mit PT eine verringerte Expression festgestellt werden. Für PI3K liegt nach Inkubation der Zellen mit PT eine um 48,2% geringere Expression vor als bei den unbehandelten Kontrollzellen. Die Transkription der mRNA von Rac1 ist im Vergleich zur mRNA der Kontrollzellen nach Toxinbehandlung um 35,5% reduziert. Die Ergebnisse zeigen einen Einfluss von PT auf die Expression von PI3K und Rac1.

5.5 Einfluss des Pertussis Toxins auf die Zellproliferation

Eine effiziente Wundheilung erfordert von den Zellen eine Koordination von zwei Prozessen: der Migration und der Proliferation (Chaudhuri *et al.*, 2006). Bisher konnte ein inhibitorischer Effekt des Pertussis Toxins auf die Migration gezeigt werden. Vorangegangene Ergebnisse mit einem Zellproliferationsassay (Firma Roche) konnten einen Einfluss von PT auf die Proliferation von HBMEC ausschließen (Schulte, 2007).

Um nähere Aufschlüsse über den Verlauf der Proliferation der Zellen in Echtzeit und über einen längeren Zeitraum zu erhalten, wurde der Einfluss des Pertussis Toxins auf die Zellproliferation mit Hilfe des xCELLigence Real-Time Cell Analyzer DP Instrument analysiert. Das System misst über am Boden der E-Platte befindliche Mikroelektroden kontinuierlich elektrische Impedanzen, die sich bei einer Proliferation der Zellen im zeitlichen Verlauf vergrößern und als Zellindex vom System angegeben werden.

Für diese Untersuchungen wurden die HBMEC in zwei unterschiedlichen Zellzahlen (3×10^4 und 6×10^4 Zellen) in 200 μ l Medium und Medium plus PT in die Wells der xCELLigence E-Platte 16 gegeben (s. 4.1.3.2) und die Proliferation der Zellen in Echtzeit dokumentiert. In der folgenden Abbildung 5.25 ist der Verlauf der Messung in den ersten acht Stunden dargestellt. Der vom System angegebene Zellindex dient als Maß für die Zahl sich teilender und vermehrender Zellen.

Die Ansätze, in denen 6×10^4 Zellen verwendet wurden, weisen wie erwartet aufgrund der höheren Ausgangszellzahl einen größeren Zellindex auf als die mit der geringeren Zellzahl von 3×10^4 Zellen. Bei den verschiedenen Zellzahlen ist bei Zugabe von PT kein Unterschied im Zellindex, der in diesem Versuch als Maß für die Proliferation dient, zu verzeichnen. Das Pertussis Toxin nimmt somit im gesamten Verlauf der Messung von acht Stunden keinen Einfluss auf die Zellteilung und die Vermehrung der Zellen.

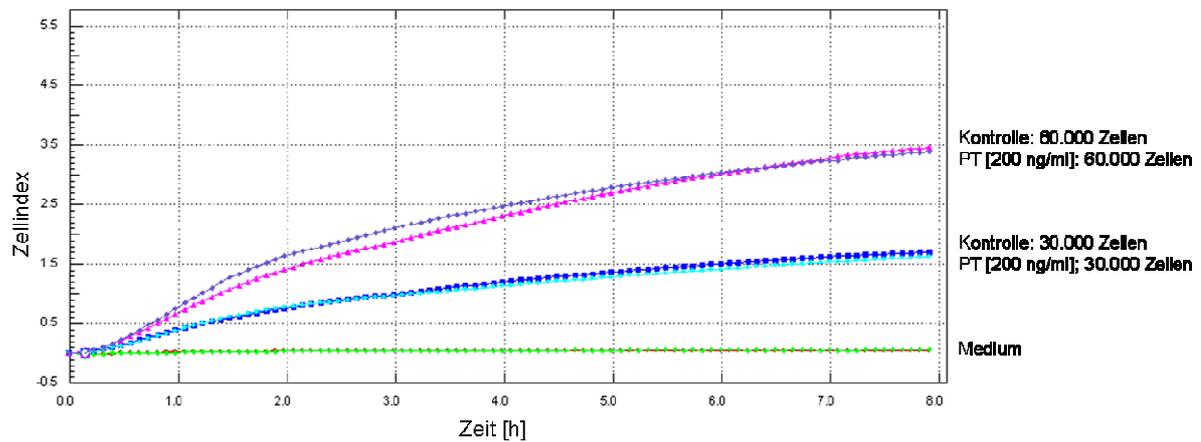


Abb. 5.25: Graphische Darstellung der Messung zum Einfluss von PT auf die Zellproliferation von HBMEC unter Verwendung des xCELLigence Real-Time Cell Analyzer DP Instruments. Es wurden 30.000 und 60.000 Zellen in den Wells der E-Platte in Dreifachbestimmungen ausgesät und mit und ohne PT inkubiert (blau: 30.000 Zellen mit Medium; türkis: 30.000 Zellen mit Medium plus PT; pink: 60.000 Zellen mit Medium; violett: 60.000 Zellen mit Medium plus PT). Als Kontrolle diente Medium (grün). Die Messung erfolgte nach den Angaben des Herstellers (s. 4.1.3.2). Die Graphen zeigen den Verlauf der Messung der ersten acht Stunden.

5.6 Einfluss des Cholera Toxins auf die Migration und Zellproliferation

Ein weiteres bakterielles Toxin neben PT, das ebenfalls aufgrund einer ADP-Ribosyltransferaseaktivität in den Zielzellen den cAMP-Spiegel erhöhen kann, ist das Cholera Toxin (CT).

Es stellt einen Virulenzfaktor des Bakteriums *Vibrio cholerae* dar und weist mit seinem AB₅-Motiv große strukturelle Ähnlichkeiten zum Pertussis Toxin auf. CT besteht wie PT aus einer enzymatisch aktiven A-Untereinheit und einem B-Oligomer, das die Anbindung an den Rezeptor vermittelt. CT katalysiert im Gegensatz zu PT, das heterotrimeren inhibierende GTPasen ADP-ribosyliert, die ADP-Ribosylierung heterotrimerer **stimulierender** GTPasen und vermittelt dadurch die Aktivierung der Adenylatzyklase, was eine starke Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels zur Folge hat. Diese Erhöhung des cAMP-Spiegels kann auch bei einigen Zellen nach Behandlung mit PT festgestellt werden. Vorangegangene Untersuchungen an BCEC-Zellen zeigten jedoch nur bei Inkubation mit CT nicht aber bei PT-Zugabe einen deutlich erhöhten cAMP-Spiegel (Brückener *et al.*, 2003). Bei der Epithelzelllinie MDCK/C7 verhält es sich genau gegensätzlich. Hier erhöht nur die Zugabe von PT den cAMP-Spiegel (Brückener *et al.*, 2003; Daten für CT nicht gezeigt). In parallelen Untersuchungen zur Permeabilisierung von Hirnendothelzellen konnte gezeigt werden, dass das Cholera Toxin im Vergleich zum

Pertussis Toxin keinen Einfluss auf die Permeabilität der Zellbarriere nimmt (Brückener *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit wurde in Migrations- und Proliferationsversuchen der Einfluss von CT auf die Wanderung und Proliferation von HBMEC und MDCK/C7-Zellen untersucht.

5.6.1 Einfluss von CT auf die Migration von HBMEC und MDCK/C7

Für die manuellen Migrationsassays wurden die HBMEC und MDCK/C7-Zellen in 48-Well-Platten mit einem Edelstahlzylinder zur Erzeugung eines definierten, zellfreien Spaltes kultiviert (s. 4.1.2.1). Die Einwanderung der Zellen, die mit Medium oder mit Medium plus PT [200 ng/ml] oder plus CT [1 µg/ml] inkubiert wurden, in den zellfreien Raum wurde durch Aufnahmen vom Spalt dokumentiert. Diese Dokumentation diente zur Bestimmung der im Zeitintervall von 40 h zurückgelegten Migrationsstrecken, die hier bezogen auf die Kontrollen, die zu 100% gesetzt wurden, dargestellt werden (Abb. 5.26 u. 5.27).

Die Abbildung 5.26 zeigt die graphische Auswertung des Effektes von PT und CT auf die Migration von **HBMEC**.

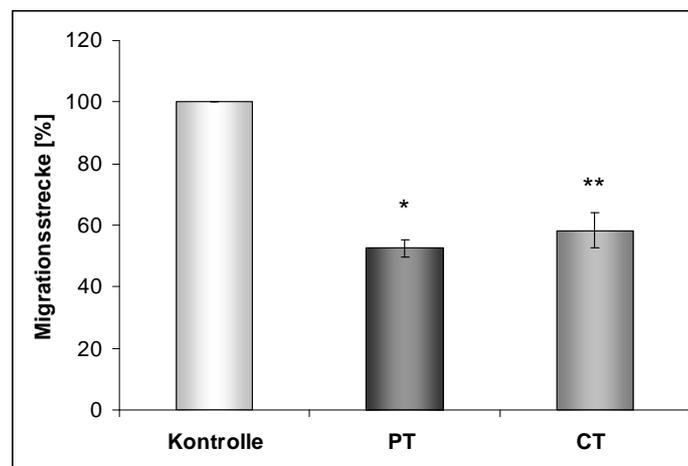


Abb. 5.26: Graphische Darstellung der Wanderungsstrecken der HBMEC nach 43-stündiger Inkubation mit PT oder CT. Es wurden 2×10^5 Zellen in Medium (Kontrolle) und Medium mit PT [200 ng/ml] oder CT [1 µg/ml] in 48-Well-Platten ausgesät. Die Erzeugung eines zellfreien Spaltes erfolgte wie unter 4.1.2.1 beschrieben. Die Wanderungsstrecken nach 40 h wurden mit Hilfe der Aufnahmen vom zellfreien Spalt bestimmt und bezogen auf die Kontrolle in Prozent berechnet. Die Berechnung erfolgte in Dreifachbestimmung aus vier unabhängigen Migrationsversuchen. Die Ergebnisse erweisen sich nach dem Student's t-Test mit $*p=0,027$ für PT als statistisch signifikant und mit $**p=0,006$ für CT als statistisch hoch signifikant.

Bei der Inkubation der Zellen mit PT kann eine Inhibierung der Migration von $47,5 \pm 2,8\%$ und bei Zugabe von CT eine von $41,7 \pm 5,7\%$ im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt werden. Die Ergebnisse erweisen sich nach dem Student's t-Test mit $*p=0,027$ für PT als statistisch signifikant und mit $**p=0,006$ für CT als statistisch hoch signifikant.

Die beiden Toxine zeigen sehr ähnliche Effekte auf die Migration von HBMEC. Migrationsexperimente zum Einfluss von CT in einer Konzentration von 200 ng/ml zeigten die gleiche Inhibierung der Migration wie für CT [1 µg/ml], was vermuten lässt, dass dieser hemmende Effekt nicht konzentrationsabhängig ist (Daten nicht gezeigt).

In der Abbildung 5.27 werden die Untersuchungen zum Einfluss von PT und CT auf das Migrationsverhalten von MDCK/C7-Zellen graphisch dargestellt.

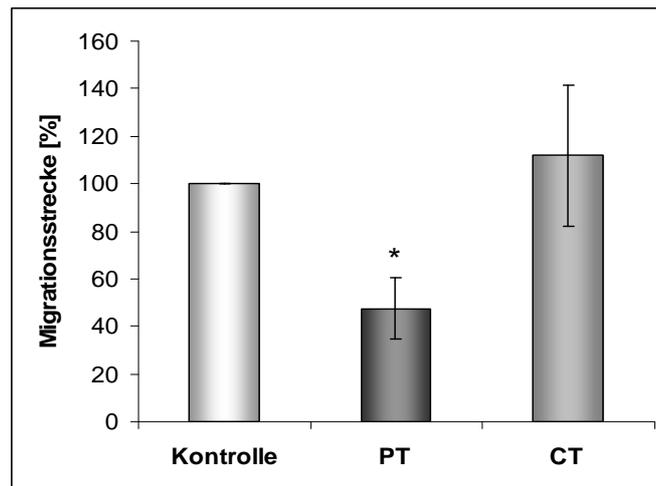


Abb. 5.27: Graphische Darstellung der Wanderungstrecken der MDCK/C7-Zellen nach 43-stündiger Inkubation mit PT oder CT. Es wurden 2×10^5 Zellen in Medium (Kontrolle), in Medium mit PT [200 ng/ml] oder in Medium mit CT [1 µg/ml] in 48-Well-Platten ausgesät. Die Erzeugung eines zellfreien Spaltes erfolgte wie unter 4.1.2.1 beschrieben. Die Wanderungstrecken nach 40 h wurden mit Hilfe der Aufnahmen vom zellfreien Spalt bestimmt und bezogen auf die Kontrolle in Prozent berechnet. Die Berechnung erfolgte in Dreifachbestimmung aus drei unabhängigen Migrationsversuchen. Die Ergebnisse erweisen sich nach dem Student's t-Test mit $*p=0,033$ für PT als statistisch signifikant und mit $p=0,55$ für CT als statistisch nicht signifikant.

Die Inkubation der MDCK/C7-Zellen mit PT führt zu einer Inhibierung der Migration von $47,6 \pm 12,6\%$. Bei Zugabe von CT ergibt sich eine Migration von $111,8 \pm 29,7\%$ im Vergleich zu den Kontrollzellen mit einem Referenzwert von 100%. Die Ergebnisse erweisen sich nach dem Student's t-Test mit $*p=0,033$ für PT als statistisch signifikant und mit $p=0,55$ für CT als statistisch nicht signifikant. Die Migration von MDCK/C7-Zellen wird von CT nicht beeinflusst.

Es liegen somit deutliche Unterschiede im Einfluss von CT auf die Migration einer Endothelzelllinie (HBMEC) und einer Epithelzelllinie (MDCK/C7) vor. Unterschiede konnten auch in der Erhöhung des cAMP-Spiegels festgestellt werden. Bei HBMEC liegt nur bei Inkubation mit CT eine deutlich erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration vor. Bei MDCK/C7-Zellen erhöht sich der cAMP-Spiegel nur bei Behandlung mit PT nicht aber bei Zugabe von CT (Brückener *et al.*, 2003; Daten für CT nicht gezeigt).

5.6.2 Einfluss von CT auf die Proliferation von HBMEC

Für diese Untersuchungen wurden die **HBMEC** für zwei Tage in 96-Well-Platten mit Medium und mit Medium mit CT kultiviert. Der Zellproliferationsassay (*Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)*, Roche Diagnostics, Mannheim), bei dem 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) anstelle von Thymidin in neu synthetisierte DNA sich teilender Zellen eingebaut wird, wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (s. 4.1.3.1). Die Menge des eingebauten BrdU kann photometrisch bestimmt werden und dient als Maß für die Menge neu synthetisierter DNA und somit der Anzahl sich teilender Zellen. Die Abbildung 5.28 zeigt die Auswertung der gemessenen Extinktionen für die Kontrollzellen ohne CT-Behandlung und für die Zellen, die mit CT inkubiert wurden.

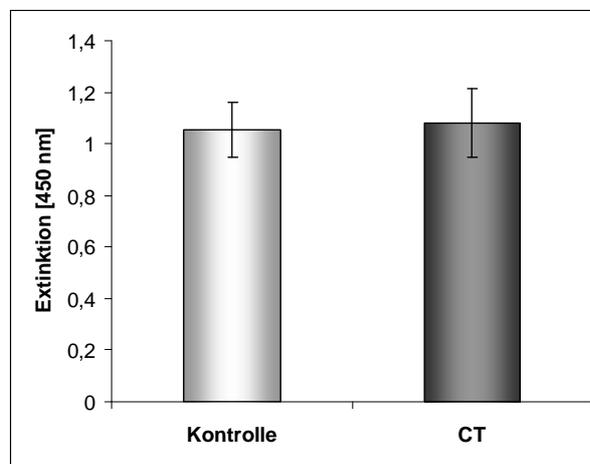


Abb. 5.28: Einfluss des Cholera Toxins auf die Zellproliferation von HBMEC. Es wurde ein Zellproliferationsassay (*Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)*, Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt, bei dem 7×10^4 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte in 100 μ l Medium mit und ohne CT angezogen wurden (s. 4.1.3.1). Nach zwei Tagen erfolgte die Durchführung des Versuches nach den Angaben des Herstellers. Der Test beruht auf dem Einbau von BrdU anstelle von Thymidin in neu synthetisierte DNA sich teilender Zellen. Der monoklonale Antikörper Anti-BrdU-POD aus Maus bindet an das eingebaute BrdU. Diese Komplexe können aufgrund einer durch Zugabe weiterer Chemikalien hervorgerufenen Farbreaktion mit einem im ELISA-Reader bei 450 nm quantifiziert werden. Die Farbentwicklung und somit die gemessenen Extinktionen korrelieren direkt mit der Menge an synthetisierter DNA und damit auch mit der Anzahl sich teilender Zellen. Die Absorptionen wurden bezogen auf die Kontrolle berechnet. Die Berechnung erfolgte aus drei unabhängigen Proliferationsversuchen. Die Werte wurden bezogen auf die Kontrolle, die zu 1 gesetzt wurde, berechnet. Die Ergebnisse weisen nach dem Student's t-Test keine statistische Signifikanz auf. Die Berechnung erfolgte in Dreifachbestimmung aus drei unabhängigen Versuchen.

Es kann kein signifikanter Unterschied der Extinktion der Zellen, die mit dem Cholera Toxin inkubiert wurden, im Vergleich zu der der Kontrollzellen festgestellt werden. Die Ergebnisse weisen nach dem Student's t-Test keine statistische Signifikanz auf. Das Cholera Toxin hat demzufolge keinen Einfluss auf die Proliferation von HBMEC, was den Ergebnissen zum Einfluss von PT auf die Proliferation von HBMEC entspricht.

5.6.3 Einfluss von CT auf die Proliferation von MDCK/C7

Zur Untersuchung zum Einfluss von CT auf die Proliferation von MDCK/C7-Zellen wurden 7×10^4 Zellen für zwei Tage in 96-Well-Platten mit Medium und mit Medium plus CT kultiviert und anschließend ein Zellproliferationsassay von Roche nach Angaben des Herstellers durchgeführt (s. 4.1.3.1 u. 5.6.2).

Die Abbildung 5.29 zeigt die Auswertung der gemessenen Extinktionen für die unbehandelten Kontrollzellen und für die Zellen, die mit CT inkubiert wurden. Dabei wurden die Werte der CT-behandelten Zellen auf die Werte der Kontrollzellen, die zu 1 gesetzt wurden, bezogen.

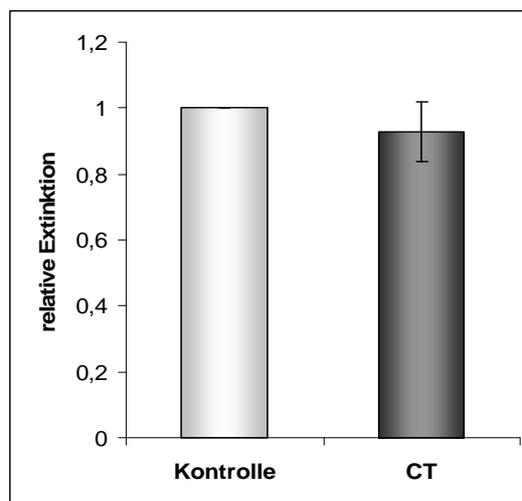


Abb. 5.29: Einfluss des Cholera Toxins auf die Zellproliferation von MDCK/C7. Für den Zellproliferationsassay (Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), Roche Diagnostics, Mannheim) wurden 7×10^4 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte in 100 μ l Medium mit und ohne CT [1 μ g/ml] angezogen (s. 4.1.3.1). Nach zwei Tagen erfolgte die Durchführung des Versuches nach den Angaben des Herstellers. Der Test beruht auf dem Einbau von BrdU anstelle von Thymidin in neu synthetisierte DNA sich teilender Zellen. Der monoklonale Antikörper Anti-BrdU-POD aus Maus bindet an das eingebaute BrdU. Diese Komplexe können aufgrund einer durch Zugabe weiterer Chemikalien hervorgerufenen Farbreaktion mit einem im ELISA-Reader bei 450 nm quantifiziert werden. Die Farbentwicklung und somit die gemessenen Extinktionen korrelieren direkt mit der Menge an synthetisierter DNA und damit auch mit der Anzahl sich teilender Zellen. Die Absorptionen wurden bezogen auf die Kontrolle berechnet. Die Berechnung erfolgte aus drei unabhängigen Proliferationsversuchen. Die Werte wurden bezogen auf die Kontrolle, die zu 1 gesetzt wurde, berechnet. Die Ergebnisse weisen nach dem Student's t-Test keine statistische Signifikanz auf. Die Berechnung erfolgte in Dreifachbestimmung aus drei unabhängigen Versuchen.

Die mit CT-inkubierten MDCK/C7-Zellen zeigen nur eine geringfügig niedrigere Absorption als die Kontrollzellen. Das Cholera Toxin hat bei Einbeziehung der Standardabweichung einen nur sehr geringen oder gar keinen Einfluss auf die Zellproliferation der MDCK/C7. Die Ergebnisse weisen nach dem Student's t-Test keine statistische Signifikanz auf. Auch in seiner Wirkung auf die Proliferation von epithelialen MDCK/C7-Zellen entspricht das Cholera Toxin der der Pertussis Toxins.

5.7 Einfluss von Brefeldin A auf die Migration und Proliferation

Neuere Untersuchungen bestätigten die Notwendigkeit der endozytotischen Aufnahme und des retrograden Transports des PT entlang des sekretorischen Weges vor der Abgabe der S1-Untereinheit ins Zytoplasma (El Bayâ *et al.*, 1997; Veithen *et al.*, 2000). PT wurde in elektronenmikroskopischen Aufnahmen in endozytotischen Kompartimenten nachgewiesen und die Passage durch den Golgi-Apparat (GA) als wichtiger Schritt zur Intoxikation beschrieben. Brefeldin A (BFA) induziert unter anderem den Zusammenbruch des Golgi-Apparates, womit der retrograde Transportweg von der Plasmamembran zum Endoplasmatischen Retikulum gestört wird. Die Aufnahme des Toxins bis hin zum Erreichen seiner Zielproteine sind bisher jedoch nur unzureichend verstanden.

Die Behandlung von CHO- und HIT-T15-Zellen mit BFA blockierte die PT-vermittelte ADP-Ribosylierung der $G\alpha$ -Untereinheiten vollständig, wohingegen diese bei BFA-resistenten MDCK-Zellen nicht beeinflusst wurde (El Bayâ *et al.*, 1997).

5.7.1 Einfluss von BFA auf die Migration

In manuellen Migrationsexperimenten wurden die eukaryotischen Zelllinien HBMEC und MDCK/C7 in 48-Well-Platten unter Erzeugung eines zellfreien Spaltes kultiviert (s. 4.1.2.1). Die Zellen wurden in An- und Abwesenheit von PT [200 ng/ml], BFA [1 μ g/ml] sowie PT und BFA in einem Ansatz kultiviert und die Einwanderung in den zellfreien Spalt mikroskopisch verfolgt und dokumentiert. Die nach 43 h gemessene Wanderung wurde in Bezug zur Kontrolle in Prozent berechnet.

In der Abbildung 5.30 ist das Ergebnis der Migrationsexperimente graphisch dargestellt. Bei der Inkubation der **HBMEC** mit PT kann eine Inhibierung der Migration von $47,5 \pm 2,8\%$, bei Zugabe von BFA eine von $80,3 \pm 6,5\%$ und bei gleichzeitiger Inkubation mit PT und BFA eine Hemmung von $82,8 \pm 2,8\%$ im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt werden. Die Ergebnisse erweisen sich nach dem Student's t-Test mit $**p=0,0017$ für PT und $**p=0,0022$ für BFA als statistisch hoch signifikant und mit $***p=0,0002$ für PT und BFA als statistisch höchst signifikant.

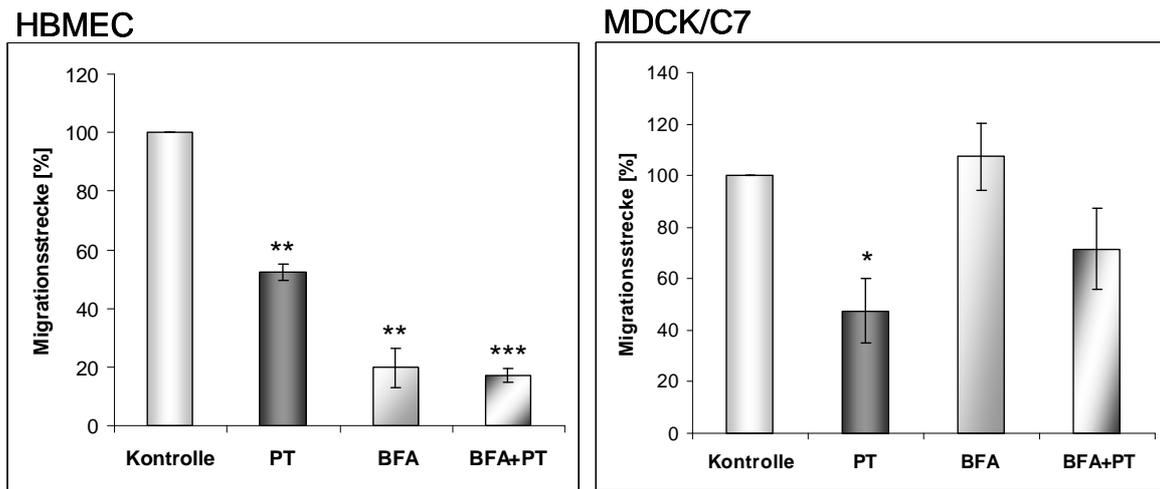


Abb. 5.30: Graphische Darstellung der Wanderungstrecken der HBMEC und MDCK/C7 nach 43-stündiger Inkubation mit PT, BFA sowie PT und BFA. Es wurden 2×10^5 Zellen in Medium (Kontrolle), in Medium mit PT [200 ng/ml], in Medium mit BFA [1 μ g/ml] und in Medium mit PT und BFA gemeinsam in 48-Well-Platten ausgesät. Die Erzeugung eines zellfreien Spaltes erfolgte wie unter 4.1.2.1 beschrieben. Die Wanderungstrecken nach 43 h wurden mit Hilfe der Aufnahmen vom zellfreien Spalt bestimmt und bezogen auf die Kontrolle in Prozent berechnet. Die Berechnung erfolgte aus drei unabhängigen Migrationsversuchen. Die Ergebnisse für HBMEC erweisen sich nach dem Student's t-Test mit $**p=0,0017$ für PT und $**p=0,0022$ für BFA als statistisch hoch signifikant und mit $***p=0,0002$ für PT und BFA als statistisch höchst signifikant. Die Ergebnisse für die MDCK/C7-Zellen erweisen sich nach dem Student's t-Test mit $*p=0,033$ für PT als statistisch signifikant. Für BFA und PT plus BFA zeigt sich keine statistische Signifikanz.

Für die **MDCK/C7-Zellen** ergibt sich ein anderes Bild. Bei Inkubation mit PT wurde eine Hemmung von $52,4 \pm 12,5\%$ gemessen. Bei Zugabe von BFA wird im Vergleich zur Kontrolle eine um $7,3 \pm 13,8\%$ erhöhte Migration erreicht. Bei gleichzeitiger Inkubation mit PT und BFA ist die Migration um $28,5 \pm 15,8\%$ inhibiert. Die Ergebnisse erweisen sich nach dem Student's t-Test mit $*p=0,033$ für PT als statistisch signifikant. Für BFA und PT plus BFA zeigt sich keine statistische Signifikanz.

Diese Untersuchungen zum Einfluss von BFA auf die Migration von HBMEC und MDCK/C7-Zellen zeigen nur für die Endothelzellen nicht aber für die Epithelzellen eine Inhibierung der Migration.

5.7.2 Einfluss von BFA auf die Proliferation

Zur Untersuchung des Einflusses von BFA auf die Zellproliferation von HBMEC bzw. MDCK/C7-Zellen wurden 7×10^4 Zellen für zwei Tage in 96-Well-Platten mit und ohne BFA kultiviert. Anschließend wurde ein Proliferationsassay von Roche nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (s. 4.1.3.1).

Für die **HBMEC** konnte bei Inkubation mit BFA praktisch keine Proliferation der Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass BFA mit

seiner Wirkung auf den GA bei HBMEC die Prozesse der Zellteilung und der Vermehrung stark beeinflusst.

In der folgenden Abbildung 5.31 werden die Ergebnisse des Proliferationsassays der MDCK/C7-Zellen bei Inkubation mit BFA graphisch zusammengefasst. Für diese Darstellung wurde die gemessene Extinktion der Kontrollzellen zu 1 gesetzt und dazu die Extinktionswerte des Ansatzes der MDCK/C7-Zellen, die mit BFA inkubiert wurden, in Bezug gesetzt. Die Ergebnisse zeigen nach dem Student's t-Test keine statistische Signifikanz.

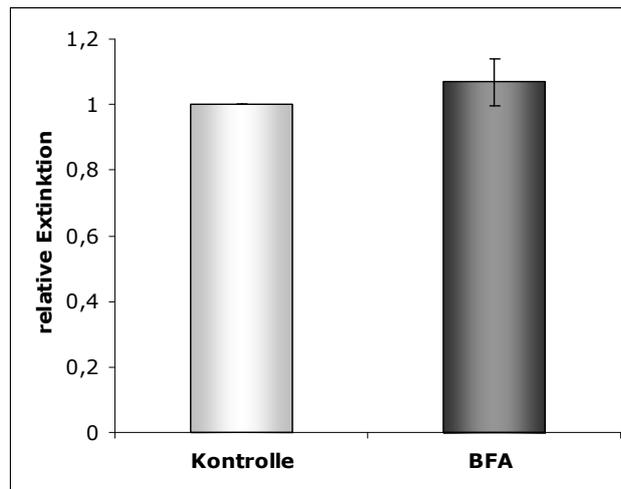


Abb. 5.31: Einfluss von BFA auf die Zellproliferation von MDCK/C7-Zellen. Für den Zellproliferationsassay (Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), Roche Diagnostics, Mannheim) wurden 7×10^4 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte in 100 μ l Medium mit und ohne BFA [1 μ g/ml] angezogen (s. 4.1.3.1). Nach zwei Tagen erfolgte die Durchführung des Versuches nach den Angaben des Herstellers. Der Test beruht auf dem Einbau von BrdU anstelle von Thymidin in neu synthetisierte DNA sich teilender Zellen. Der monoklonale Antikörper Anti-BrdU-POD aus Maus bindet an das eingebaute BrdU. Diese Komplexe können nach Zugabe weiterer Reagenzien aufgrund einer dabei hervorgerufenen Farbreaktion im ELISA-Reader bei 450 nm quantifiziert werden. Die Farbentwicklung und somit die gemessenen Extinktionen korrelieren direkt mit der Menge an synthetisierter DNA und damit auch mit der Anzahl sich teilender Zellen. Die Absorptionen wurden bezogen auf die Kontrolle berechnet. Die Berechnung erfolgte aus drei unabhängigen Proliferationsversuchen. Die Werte wurden bezogen auf die Kontrolle, die zu 1 gesetzt wurde, berechnet. Die Ergebnisse zeigen nach dem Student's t-Test keine statistische Signifikanz.

Bei Inkubation der MDCK/C7-Zellen mit BFA ist eine leicht verstärkte Proliferation im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen zu erkennen. Diese ist aber bei Einbeziehung der Standardabweichung zu vernachlässigen.

6 Diskussion

Das Pertussis Toxin (PT) spielt für die Pathogenese von Keuchhusten als Hauptvirulenzfaktor des human-pathogenen Erregers *Bordetella pertussis* eine entscheidende Rolle (Weiss und Hewlett, 1986). Das bakterielle Exotoxin entspricht in seinem Aufbau einer typischen AB₅-Struktur mit einer enzymatisch aktiven A-Untereinheit, die die ADP-Ribosylierung der α -Untereinheiten inhibitorischer G-Proteine vermittelt, und einem B-Oligomer, das die Anbindung des Toxins an die Zielzelle ermöglicht (Tamura *et al.*, 1983). Diese Modifizierung der G α -Untereinheiten durch das Toxin zeigt Auswirkungen auf verschiedene Signaltransduktionswege in der Zelle (West *et al.*, 1985).

6.1 Einfluss des Pertussis Toxins auf die Migration von Zellen

Der Prozess der Zellmigration stellt einen sehr wichtigen Aspekt für die Entwicklung mehrzelliger Organismen dar (Weijer C. J., 2009). Die Migration von Zellen spielt bei komplexen Vorgängen wie der Embryonalentwicklung, der Wanderung von Immunzellen bei der Immunantwort und der Wundheilung von verletztem Gewebe wie z.B. Blutgefäßen eine bedeutende Rolle (Pollard *et al.*, 2000). Infektionen mit Bakterien führen häufig zu einem verzögerten Schließen einer Wunde. Diese inhibierte Wundheilung kann auf hohe Bakterienzahlen in den verletzten Geweben oder auf eine Sekretion von Toxinen vor dem Eindringen der Bakterien in das Gewebe zurückgeführt werden (Ovington, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des von *B. pertussis* sezernierten Pertussis Toxins auf die Migration der humanen Hirnendothelzellen HBMEC untersucht.

6.1.1 Inhibierung der Migration von HBMEC durch Pertussis Toxin

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Dokumentation der Migration von Zellen zwei unterschiedliche Untersuchungsmethoden verwendet. Zum einen wurden dafür manuelle Migrationsexperimente, bei denen mit einem Steg versehene Edelstahlzylinder zur Erzeugung eines definierten zellfreien Spaltes eingesetzt wurden, durchgeführt. Zum anderen dienten automatisierte Echtzeitmessungen mit dem xCELLigence System Real-Time Cell Analyzer DP Instrument der Firma Roche zur Bestimmung der Wanderungsfähigkeit der Zellen.

In den durchgeführten Untersuchungen ergibt sich bei der Verwendung der Edelstahlzylinder eine Hemmung der Zellwanderung um etwa 40% (s. Abb. 5.1 und 5.2) und bei der Echtzeitmessung eine Reduktion der Migration um etwa 50% (s. Abb. 5.3 und 5.4). Diese Abweichungen der Inhibierung können auf die unterschiedlichen Bedingungen und Messgenauigkeiten einer manuellen und automatisierten Methode zurückgeführt werden. Für beide Untersuchungsmethoden zeigte sich jedoch eine Inhibierung der Migration von humanen zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen (HBMEC) bei Zugabe des Pertussis Toxins in einer Konzentration von 200 ng/ml im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Weitere Migrationsexperimente zeigten, dass PT die Migration der HBMEC nicht vollständig blockiert, sondern die Einwanderung der Zellen deutlich verlangsamt. Nach etwa 72 Stunden ist der zellfreie Raum durch einen PT-behandelten Zellrasen wieder vollständig geschlossen. PT verlangsamt oder blockiert vermutlich einige für die Migration der Zellen essentielle Reaktionen nicht vollständig, aber mit inhibierenden Auswirkungen.

Weitere Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten eine direkte Korrelation zwischen der Inhibierung der Migration und der eingesetzten Konzentration des PT. Die Hemmung nimmt mit geringer werdenden Konzentrationen des Toxins von 1 µg/ml bis 10 ng/ml ab (s. Abb. 5.5). Bei 10 ng/ml ist die Reduzierung mit 17,5% eher gering. Bei 100 ng/ml beträgt die Inhibierung 45% und bei 200 ng/ml 50%. Die Zellen weisen zwar mit 60% bei der höchsten verwendeten Konzentration die stärkste Hemmung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen auf, behalten aber noch ihre Migrationsfähigkeit. Ähnliche Konzentrationsabhängigkeiten wurden in früheren Untersuchungen zum Einfluss des Toxins auf die Permeabilität und den transendothelialen Widerstand eines zerebralen Endothelzelllayers beobachtet. Dabei waren die Effekte einer erhöhten Permeabilität und eines niedrigen transendothelialen Widerstandes bei Konzentrationen zwischen 10 ng/ml und 200 ng/ml am größten (Brückener *et al.*, 2003).

Das Pertussis Toxin verfügt über eine AB₅-Struktur bestehend aus der A-Untereinheit mit einer ADP-Ribosyltransferaseaktivität und dem enzymatisch inaktiven B-Oligomer. Der PT-vermittelte Effekt auf die Migration von HBMEC beruht ausschließlich auf der enzymatischen Aktivität der A-Untereinheit, da Untersuchungen mit dem B-Oligomer mit 200 ng/ml keine statistisch signifikante Hemmung der Migration zeigten (Schulte, 2007).

Die A-Untereinheit ist auch für die Erhöhung der Permeabilität und die Abnahme des transendothelialen Widerstandes von HBMEC verantwortlich (Brückener *et al.*, 2003;

Kügler *et al.*, 2007). Das B-Oligomer vermittelt bei den gezeigten Effekten offenbar nur die Anbindung des Toxins an die Zielzelle.

Die S1-Untereinheit des Pertussis Toxins ADP-ribosyliert die α -Untereinheiten heterotrimerer inhibitorischer G-Proteine. Durch diese Modifikation wird die Interaktion der heterotrimeren inhibitorischen G-Proteine mit ihrem Rezeptor unterbunden und so ihre Aktivierung verhindert (West *et al.*, 1985; Conklin *et al.*, 1993). Heterotrimere G-Proteine wurden in der Literatur stets als membranständig beschrieben. In den letzten Jahren wurde aber die Lokalisation mehrerer $G\alpha$ -Untereinheiten innerhalb der *tight junctions* (TJ) kultivierter Epithelzellen gezeigt (Denker *et al.*, 1996a; Saha *et al.*, 1998). Zudem scheint $G\alpha_{i-2}$ wichtig für die Entwicklung und Aufrechterhaltung von TJ in Epithelzellen zu sein (Denker und Nigam, 1998; Saha *et al.*, 1998). Weiterhin konnte die Lokalisation verschiedener G-Proteinuntereinheiten an den Membranen intrazellulärer Organellen wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und des Golgi-Apparates (GA) dokumentiert werden (Stow *et al.*, 1991; Denker *et al.*, 1996b). Auch in Endothelzellen wurde $G\alpha_{i-3}$ mittlerweile innerhalb der TJ-Region nachgewiesen (Böcker, 2007). Die Effekte von PT auf die $G\alpha$ -Untereinheiten der heterotrimeren inhibierenden G-Proteine könnten demnach eine Veränderung der Entwicklung und Aufrechterhaltung von TJ auslösen, das einen Einfluss auf die Migration der Zellen annehmen lässt, da die Zellkontakte nicht mehr intakt sind und infolgedessen eine kollektive Migration erschwert wird.

Gleichzeitig führt die ADP-Ribosylierung der α -Untereinheiten heterotrimerer inhibitorischer G-Proteine zu einer Aktivierung der membranständigen Adenylatzyklase, was in manchen Zelltypen zu einem unkontrollierten Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels führt (Katada und Ui, 1982a, b; Brückener *et al.*, 2003). Für Hirnendothelzellen wie z.B. den HBMEC konnte bei einer Inkubation mit PT dieser Effekt einer deutlichen Erhöhung des cAMP-Spiegels nicht bestätigt werden (Brückener *et al.*, 2003). Ein Anstieg des intrazellulären cAMPs wurde jedoch für epitheliale MDCK/C7-Zellen gezeigt (Daten nicht gezeigt). Diese durch die ADP-Ribosylierung hervorgerufenen Veränderungen können sich auf einige Signalmoleküle und somit auf einige Signaltransduktionswege in der Zelle auswirken, was ebenfalls einen inhibierenden Effekt auf die Wanderung der Zellen ausüben kann.

Nach einer *in vitro* Verwundung wird die Migration von Endothelzellen verschiedener Spezies durch die Zugabe exogener Wachstumsfaktoren wie dem Epidermiswachstumsfaktor (EGF, *epidermal growth factor*) und dem Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF, *fibroblast growth factor*) angeregt. Diese Stimulierung der Zellwanderung durch FGF-2

wird durch PT-sensitive GTP-bindende Proteine vermittelt. Die ADP-Ribosylierung dieser G-Proteine durch PT stört die durch die Wachstumsfaktoren vermittelte Stimulierung, was in der Folge zu einer Inhibierung der Migration der Zellen führt (Rieck *et al.*, 2001). Bei der gerichteten Migration von Keimzellen des Zebrafisches sind inhibitorische G-Proteine ebenfalls von essentieller Bedeutung (Dumstrei *et al.*, 2004).

Die Auswirkungen der PT-vermittelten ADP-Ribosylierung der G α -Untereinheiten auf einige Signalmoleküle und Regulationswege können die Ursache für die beobachtete Hemmung der Migrationsfähigkeit der HBMEC und weiterer untersuchter Zellen darstellen.

6.1.2 Einfluss des Pertussis Toxins auf die Migration anderer Zelltypen

Bisher wurde in Vorarbeiten der inhibierende Effekt des PT bei der Migration von Hirnendothelzellen aufgeklärt (Schulte, 2007). Zur Untersuchung, ob die PT-vermittelte Inhibierung der Migration von HBMEC zelllinienspezifisch ist oder auch bei weiteren Zelllinien auftritt, wurden Migrationsstudien zum Einfluss von PT mit Zelllinien, die sich in einigen Eigenschaften und ihrem Ursprung unterscheiden, durchgeführt. Es wurden hCMEC/D3 als weitere humane Hirnendothelzelllinie, U373MG als eine humane Glioblastomzelllinie, MDCK/C7 als epitheliale Zelllinie aus dem Hund und A549-Zellen aus humanem Bronchialkarzinomgewebe mit typisch epithelialen Eigenschaften verwendet. Dabei zeigte sich auch für die vier verwendeten Zelllinien eine Hemmung der Migration bei Zugabe von PT. Für die Hirnendothelzelllinie hCMEC/D3 ergibt sich eine Inhibierung um 59%, für die U373MG-Zellen eine Reduktion der Migration um 54%, für die epitheliale Zelllinie MDCK/C7 eine Inhibierung um 47% und für die A549-Zellen eine Hemmung um 49%. Die Inhibierung der Migration durch PT verläuft bei allen Zelllinien ähnlich stark.

Der PT-vermittelte Effekt auf die Migration tritt sowohl bei Endothel- als auch Epithelzellen auf und ist offenbar nicht zelllinienspezifisch für Hirnendothelzellen wie HBMEC. Dieses Ergebnis stellt einen Unterschied zu den Effekten des PT auf die Permeabilisierung dar. Dabei konnte für einen Layer aus epithelialen *Plexus chorioideus*-Zellen der Blut-Liquor-Schranke im Gegensatz zu Hirnendothelzellen keine Erhöhung der Permeabilität nach einer Inkubation mit PT festgestellt werden (Brückener *et al.*, 2003). Diese Befunde sind besonders interessant, da alle möglichen Zielproteine in allen untersuchten Zelltypen von PT innerhalb von etwa 120 min vollständig ADP-ribosyliert werden (El Bayâ *et al.*, 1997). Eine vollständige ADP-Ribosylierung konnte auch für die

G α_{i-2} - und G α_{i-3} -Untereinheiten inhibitorischer G-Proteine, die ebenfalls auch an den Membranen intrazellulärer Organellen lokalisiert sind, in epithelialen *Plexus chorioideus*-Zellen, in HBMEC und in MDCK/C7-Zellen gezeigt werden (Brückener *et al.*, 2003; Kügler *et al.*, 2007; Schulte, 2007; Böcker, 2007).

Diese Resultate deuten darauf hin, dass die generelle Hemmung der Migration, die bei Endothel- und Epithelzellen auftritt, und die Erhöhung der Permeabilität endothelialer Zelllayer auf verschiedenen Signaltransduktionswegen mit unterschiedlichen Regulationsmechanismen beruhen.

6.1.3 Einfluss von PT auf Signaltransduktionswege

Um Aufschlüsse zu erhalten, welche Signaltransduktionswege an der Hemmung der Migration durch das Pertussis Toxin und an den unterschiedlichen Effekten auf die Permeabilisierung und Migration bei Endothel- und Epithelzellen beteiligt sein können, wurde zunächst der Einfluss einer Inhibierung bzw. Aktivierung verschiedener Proteine auf das Wanderungsverhalten von HBMEC betrachtet. Es wurden folgende Proteine, denen eine Beteiligung an den Wanderungsprozessen zugeschrieben wird (vgl. 2.3.3), näher untersucht: die **Proteinkinase C** mit H-7 als selektivem Inhibitor und Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) als Aktivator, die **Proteinkinase A** mit H-89 als Inhibitor, die **Phospholipase C** mit U-73122 als Inhibitor und die **Adenylatzyklase** mit Cholera Toxin als Aktivator. Frühere Ergebnisse zeigten eine Reduzierung des PT-induzierten Effektes auf die Permeabilisierung eines BCEC-Monolayers bei gleichzeitiger Aktivierung der PKC durch PMA. Cholera Toxin hingegen bewirkte keine Veränderungen der Permeabilität eines BCEC-Monolayers, was einen Unterschied zum PT-Effekt einer erhöhten Permeabilisierung darstellt (Brückener *et al.*, 2003). CT löst in Hirnendothelzellen im Vergleich zu PT eine Zunahme des intrazellulären cAMP-Spiegels aus, was die unterschiedlichen Effekte der Toxine erklären kann (Brückener *et al.*, 2003)

Die Migrationsuntersuchungen unter Verwendung des selektiven Inhibitors H-7 der **Proteinkinase C** zeigten mit 79% eine deutliche Inhibierung der Migration von HBMEC. Dieser Effekt veränderte sich nicht bei gleichzeitiger Koinkubation mit PT und H-7 (s. Abb. 5.8). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass H-7 mit der PKC einen möglichen Angriffspunkt für das Pertussis Toxin oder einige Proteine der Signalweiterleitung ausschaltet. Da der Migrationsprozess sehr komplex ist und ein koordiniertes Zusammenspiel vieler verschiedener Proteine erfordert, wurde die Migration der HBMEC

bei Inhibierung eines beteiligten Proteins wahrscheinlich nicht unbedingt vollständig blockiert.

Der Aktivator PMA der Proteinkinase C stimulierte das Wanderungsverhalten, was zu einer verstärkten Migration um 60% im Vergleich zu den Kontrollzellen führte. Bei Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) vermindert eine Inhibierung der PKC durch Chelerythrin die Fähigkeit sich anzuheften, zu proliferieren und zu migrieren. Eine Herunterregulierung der PKC durch Zugabe eines Phorbolesters reduziert ebenfalls die Anheftung und Migration der Zellen, zeigt jedoch keinen Effekt auf deren Verteilung (Kent, 1995). Die Aktivierung von PKC durch PMA erhöht die Anheftung, Verbreitung und Migration von HUVEC. Western Blot-Analysen von HUVECs, in denen die PKC herunterreguliert wurde, zeigten eine stark reduzierte Expression der PKC-Isoformen α und ϵ , was ihre Beteiligung an den Anheftungs- und Migrationsprozessen vermuten lässt (Kent, 1995). Die gezeigten Ergebnisse können einen Hinweis darauf geben, dass die PKC an den Signaltransduktionswegen der Migration von Hirnendothelzellen beteiligt ist. Ein ähnlicher Effekt erschließt sich aus dem Einfluss des Inhibitors und Aktivators der PKC auf die Permeabilisierung. Eine Inhibierung mit H-7 führte zu einer drastischen Erhöhung des PT-vermittelten Effektes, d. h. die Permeabilität der BCEC-Monolayer für HRP stieg weiter an (Brückener *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu zeigte eine Aktivierung der PKC durch PMA eine starke Verringerung der PT-induzierten erhöhten Permeabilität und somit eine fast vollständige Aufhebung des PT-induzierten Effekts auf den Monolayer.

In humanen zerebralen Endothelzellen werden von den elf bekannten PKC-Isoformen nur die Isoformen α , δ , ϵ und ζ exprimiert. Diese Isoformen können von Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃), einem Produkt der **Phosphatidylinositol 3-Kinase** (PI3K), aktiviert werden. Ebenso wie die Inhibierung der PKC zeigte auch die Inhibierung der PI3K durch Wortmannin einen Effekt auf die Migration von HBMEC. Dabei wird die Migration von HBMEC bei Inkubation mit PT um 41% und bei Zugabe von Wortmannin um 64% gehemmt. Eine gleichzeitige Koinkubation der Zellen mit PT und Wortmannin erhöht den inhibitorischen Effekt auf 78%. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen vermuten, dass die PI3K in die Signaltransduktionswege der PT-vermittelten Inhibierung der Migration involviert ist (Schulte, 2007). Im Zebrafisch werden funktionale PI3K für eine optimale Migration der Keimzellen benötigt, da sie den Zellen Beweglichkeit vermitteln. Eine Inhibierung der PI3K resultiert in einer verlangsamten Migration der Keimzellen, was mit einer untypischen Zellmorphologie und einer reduzierten Filopodienstabilität korreliert (Dumstrei *et al.*, 2004). Eine Aktivierung des PI3K-Signalweges führte bei primären

Astrozyten aus Ratten zu einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts und zu einer Migration der Astrozyten (Machide *et al.*, 2000). Welcher Effektor der PI3K die Aktivierung der Aktinpolymerisation vermittelt, die für die Migration notwendig ist, konnte bislang nicht geklärt werden (Primo *et al.*, 2007).

In der Literatur wird eine mögliche rezeptorvermittelte Aktivierung der γ -Isoform der PI3K durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine beschrieben, zu denen auch PT sensitive G-Proteine wie G_i zählen (Lopez-Illasaca *et al.*, 1997; Vanhaesebroeck *et al.*, 1997; Murga *et al.*, 1998; Takeda *et al.*, 1999). Die S1-Untereinheit des Pertussis Toxins vermittelt die ADP-Ribosylierung der α -Untereinheiten heterotrimerer inhibitorischer G-Proteine und damit die Entkopplung dieser G-Proteine vom Rezeptor, was wiederum die Dissoziation des $\beta\gamma$ -Komplexes blockiert. Dieser liegt demzufolge nicht frei vor, so dass die PI3K und auch die PKC, als nachrangiges Enzym der PI3K (Farese *et al.*, 1997), nicht aktiviert werden können. Mit der Methode der qRT-PCR wurde der Einfluss des Pertussis Toxins auf die mRNA Transkription von PI3K in HBMEC untersucht und dabei eine Verringerung der Transkription um etwa 50% festgestellt (s. Abb. 5.24). Dieses Ergebnis bestätigt, dass das Pertussis Toxin die PI3K direkt beeinflusst. Es gibt also offensichtlich einen regulatorischen Zusammenhang zwischen dem Pertussis Toxin, der PI3K und der PKC.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde die Beteiligung der verschiedenen in humanen zerebralen Endothelzellen vorkommenden **PKC-Isoformen** α , δ , ϵ und ζ an den PT-vermittelten Effekten auf die Migration von Hirnendothelzellen untersucht. Immunfluoreszenzanalysen zur Lokalisierung der Isoformen der PKC in migrierenden Zellen zeigten für die α - und ζ -Isoformen eine verstärkte Akkumulation an den Zellrändern, die zum zellfreien Raum und somit in die Richtung der Migration weisen, die in den Zellen aus dem konfluenten Zelllayer nicht zu beobachten war (s. Abb. 5.12 u. 5.13). Diese Akkumulationen im Leitsaum migrierender Zellen deuten auf eine Beteiligung dieser Proteine an der Migration hin. In den Immunfluoreszenzanalysen konnten jedoch keine Unterschiede in der Lokalisation der Isoformen bei Zugabe von PT beobachtet werden. Für die Isoformen δ und ϵ konnten keine Differenzen in der Lokalisierung in den Zellen im Zelllayer und im Leitsaum festgestellt werden.

Weitere Aufschlüsse zur Beteiligung der α - und ζ -Untereinheiten an dem von PT beeinflussten Signaltransduktionsweg sollten Transfektionsanalysen mit spezifischer siRNA ermöglichen. Diese Untersuchungen zeigten eine starke Inhibierung der Migration bei Herunterregulierung der α - und ζ -Isoformen. (s. Abb. 5.18). Die starke Reduzierung

der Migration nach Transfektion intensiviert sich weiter, wenn die Zellen zusätzlich mit PT inkubiert wurden. Die beschriebene Inhibierung ist bei den Ansätzen mit siRNA gegen PKC α mit 85% und gleichzeitiger Zugabe von PT mit 94% geringfügig größer als die der Ansätze, in denen PKC ζ herunterreguliert wurde. Hier ergibt sich eine Inhibierung von 66% ohne PT-Zugabe und eine von 83% nach PT-Behandlung. Untersuchungen zur Transfektionseffizienz zeigten, dass bei der Transfektion nicht die Expression aller Proteine herabgesetzt werden konnte, da nicht alle Zellen die siRNA aufgenommen haben. Die bestimmte Transfektionseffizienz von 50% für PKC α und PKC ζ wurde bei der Zusammenstellung der Ergebnisse in die graphische Darstellung einbezogen (s. Abb. 5.18). Bei einem möglichen direkten Einfluss von PT auf die PKC-Isoformen kann die weitere Reduzierung der Migration der transfizierten Zellen bei Zugabe von PT mit der nicht 100%-igen Transfektionsrate erklärt werden. Einen weiteren Grund für die stärkere Hemmung bei Inkubation mit PT stellt der generelle gezeigte PT-vermittelte Effekt auf die Migration durch den Einfluss des Toxins auf weitere Signalproteine, die ebenfalls am Migrationsprozess beteiligt sein können, dar (vgl. 6.1). Die Transfektionsrate von etwa 50% erklärt auch die noch schwachen Banden in den Transfektiosansätzen im Western Blot und die noch vorliegende geringe mRNA Transkription in der qRT-PCR (s. Abb. 5.14 u. 5.15). Diesen Ergebnissen zufolge können die beiden PKC Isoformen α und ζ an den Signaltransduktionswegen, die zur Hemmung der Migration führen, beteiligt sein.

Ein Einfluss von PKC α und PKC ζ auf die Proliferation von HBMEC konnte ausgeschlossen werden (s. Abb. 5.19). Studien an HUVECs beschreiben PKC α als notwendige Komponente am Signaltransduktionsweg der Migration, Adhäsion und Angiogenese. Sie zeigen bei einer Verringerung der Expression von PKC α durch Transfektion mit einem spezifischen Oligonukleotid eine Hemmung der Migration von 64% (Ware *et al.*, 2002). PKC ζ lässt nach Herunterregulierung durch Transfektion eine Inhibierung der Migration von Mausmelanomzellen erkennen (Rotenberg *et al.*, 2001) und erfüllt offenbar eine notwendige Funktion im Prozess der Migration von Makrophagen (Zhang *et al.*, 2009).

Frühere Ergebnisse lassen bereits eine Beteiligung von PKC α und PKC ζ an der PT-induzierten Wirkung auf die Permeabilisierung vermuten. In der Literatur wird eine Beteiligung von PKC α an der Regulation der Permeabilität und der Zellkontakte beschrieben (Fasano *et al.*, 1995; Rosson *et al.*, 1997). Dabei wurde ein Zusammenhang der transienten Zunahme der *tight junction*-Permeabilität mit der Herunterregulierung von PKC α hergestellt (Clarke *et al.*, 2000).

In vorangegangenen Untersuchungen wird bei Toxinbehandlung die Expression der α -Isoform reduziert und eine Umverteilung des membranständigen Proteins in das Zytosol bewirkt (Böcker, 2007). In der Literatur wurde ein Zusammenhang der transienten Zunahme der TJ-Permeabilität mit der Herunterregulierung von PKC α hergestellt (Clarke *et al.*, 2000). Es konnte jedoch noch keine Erklärung für die veränderte Lokalisation der PKC α in das Zytosol nach PT-Inkubation gefunden werden. Für PKC ζ hingegen wird unter PT-Einfluss die Umverteilung von einer eher zytosolischen zu einer membranständigen Lokalisation beobachtet. Zudem wird die Expression dieser PKC-Isoform bei Inkubation mit PT hochreguliert (Böcker, 2007). Dieser Befund entspricht Ergebnissen, die bei EPEC- (enteropathogene *Escherichia coli*) Infektionen in Epithelzellen beobachtet wurden (Tomson *et al.*, 2004; Zyrek *et al.*, 2007). Die PT-induzierten Effekte auf die Expression und die Lokalisation der beiden PKC-Isoformen deuten an, dass diese in den Zellen unterschiedliche Funktionen erfüllen. Im Migrationsprozess könnte die Reduzierung der mRNA Transkription von PKC α bei Zugabe von PT zu den gezeigten Ergebnissen einer Hemmung der Migration nach Herunterregulierung der Expression durch Transfektion mit siRNA übereinstimmen. PKC α kann nach diesen Befunden eines der Signalproteine darstellen, auf das PT einen direkten Einfluss hat, und das am PT-vermittelten Effekt auf die Migration beteiligt ist. Wie der beschriebene Einfluss von PT einer Hochregulierung der mRNA Transkription von PKC ζ sich auf die Migration auswirkt, konnte nicht geklärt werden und müsste noch näher untersucht werden. Auf regulatorischer Ebene zeigen sich bei Toxinbehandlung unterschiedliche Effekte auf die Expression der Isoformen α und ζ .

Die Inhibierung der **Phospholipase C** (PLC) sollte weitere Aufschlüsse über eine Beteiligung des Proteins am PT-vermittelten Effekt im Migrationsprozess liefern. Die PLC bildet neben Inositoltriphosphat das Diacylglycerol, das alle PKC-Isoformen bis auf ζ und λ aktiviert. Migrationsversuche mit dem PLC-spezifischen Inhibitor U-73122 zeigten mit 70% eine starke Hemmung der Wanderung von HBMEC im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (s. Abb. 5.8). Dieser Effekt veränderte sich bei gleichzeitiger Zugabe von PT allerdings nicht, was bedeuten könnte, dass durch die Hemmung der PLC gleichzeitig nachrangige Proteine, die an der Migration beteiligt sind, inhibiert werden oder der Zyklus der Migration an einem frühen Schritt blockiert wird. Die PLC könnte somit ein bedeutendes Signalmolekül im Migrationsprozess darstellen.

In früheren Arbeiten konnte ein Einfluss der PLC auf die Permeabilität von Endothelzellbarrieren bereits ausgeschlossen werden (Brückener *et al.*, 2003). Die Phospholipase C stellte somit möglicherweise eines der Proteine dar, das am

Signaltransduktionsweg des PT-induzierten Effekts auf die Migration, nicht aber an der vermutlich über einen anderen Prozess regulierten PT-vermittelten Änderung der Permeabilität beteiligt ist.

Für die **Proteinkinase A** (PKA) konnte ebenfalls kein Effekt auf die Permeabilisierung eines Endothelzelllayers beobachtet werden (Brückener *et al.*, 2003). Eine Inhibierung von PKA durch Zugabe des Inhibitors H-89 bewirkte ebenfalls keine Veränderungen im Migrationsverhalten von HBMEC (s. Abb. 5.10), was darauf hindeutet, dass die PKA an den Prozessen der Migration nicht beteiligt ist. Die PKA wird durch einen erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel aktiviert. Dieser kann aufgrund einer Aktivierung der Adenylatzyklase durch die Pertussis Toxin-vermittelte ADP-Ribosylierung der α -Untereinheiten heterotrimerer inhibitorischer G-Proteine in manchen Zellen vorliegen. In der in den Migrationsexperimenten verwendeten PT-Konzentration von 200 ng/ml konnte für HBMEC jedoch kein erhöhter cAMP-Spiegel gemessen werden (Brückener *et al.*, 2003).

Der cAMP/PKA-Signalweg induziert in migrierenden Zellen am Leitsaum mit der Bildung von Lamellipodien und Filopodien, der Zusammensetzung von Mikrofilamenten sowie der Aktivierung von Rac und Cdc42 Ereignisse, die zur Migration notwendig sind (Feoktistov *et al.*, 2000; O'Connor und Mercurio, 2001; Whittard und Akiyama, 2001b; Nishiya *et al.*, 2005; Ginsberg *et al.*, 2008). Aufgrund dieser in der Literatur beschriebenen Ergebnisse wäre eine Veränderung im Migrationsverhalten der Zellen bei der Inhibierung der PKA zu erwarten gewesen. Mögliche Gründe für den nicht vorhandenen Effekt können darin bestehen, dass der Inhibitor H-89 in der verwendeten Konzentration die Aktivität der PKA nicht eingeschränkt hat, oder aber weitere Proteine die Funktionen der PKA übernommen haben.

Untersuchungen an RhoGTPasen zeigten, dass diese verschiedene für die Zellmigration relevante Prozesse wie z.B. die Zell-Substrat-Adhäsion, die Zell-Zell-Adhäsion und die Proteinsekretion regulieren (Ridley *et al.*, 1992).

Die kleine RhoGTPase **Rac** spielt im Prozess der Migration von Zellen eine wichtige Rolle, da sie für die Bildung der Lamellipodien, die von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Signalen der Extrazellulären Matrix induziert wird, sowie die Zell-Substrat-Adhäsion erforderlich ist (Ridley *et al.*, 1992; Ridley und Hall 1992; Miki *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2008). So zeigten Videomikroskopische Experimente die Notwendigkeit von Rac, dass

embryonale Muskelzellen nicht migrieren können, wenn Rac inhibiert wird (Nobes und Hall, 1995; Knight *et al.*, 2000).

Mit der Methode der qRT-PCR wurde der Einfluss von Pertussis Toxin auf die mRNA Transkription von Rac1 untersucht (Abb. 5.24). Dabei wurde eine Verringerung der Transkription bei Zugabe von PT festgestellt, was auf die Toxin-vermittelte ADP-Ribosylierung von G-Proteinen zurückgeführt werden kann. Dieses Ergebnis gibt einen Hinweis darauf, dass Rac1 direkt von PT beeinflusst wird und somit an den Signaltransduktionswegen, die zur Inhibierung der Migration durch PT führen, beteiligt ist.

Die Aktivierung von Rac erfolgt durch Tyrosinkinasen und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und ist in beiden Fällen abhängig von der Aktivität der PI3K (Sander *et al.*, 1998; Rickert *et al.*, 2000; Royal *et al.*, 2000). Zusätzlich scheinen die Produkte der PI3K Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat und Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat im Leitsaum migrierender Neutrophile eine verstärkte Anhäufung zu zeigen (Haugh *et al.*, 2000; Servant *et al.*, 2000), was hier eine spezielle Aktivierung vermuten lässt. Die kleine RhoGTPase Rac ist mit der PI3K aufgrund der PI3K-vermittelten Aktivierung regulatorisch verbunden.

G-Proteinuntereinheiten wie die **G α -Untereinheiten** der heterotrimeren inhibitorischen G-Proteine konnten unter anderem im Golgi-Apparat (GA), im Endoplasmatischen Retikulum (ER) oder in sekretorischen Granulae lokalisiert werden (Leyte *et al.*, 1992; Denker *et al.*, 1996a; Le-Niculescu *et al.*, 2005; Böcker, 2007; Kügler *et al.*, 2007). Diese intrazelluläre Verteilung lässt auf eine Beteiligung der Proteine an zahlreichen zellulären Funktionen, wie der Regulation des Aktinzytoskeletts, der Regulation der Biogenese und Aufrechterhaltung von *tight junctions* (TJ) sowie dem Vesikeltransport, schließen (Denker *et al.*, 1996a; Denker *et al.*, 1996b; Saha *et al.*, 1998; Le-Niculescu *et al.*, 2005). Es konnte bereits eine direkte Beteiligung der **G α_{i-2} -** und **G α_{i-3} -Untereinheiten** an der Permeabilisierung von HBMEC durch PT gezeigt werden (Böcker, 2007). Hierfür wurde die Expression der G α_{i-2} - und G α_{i-3} -Untereinheiten durch Transfektion mit spezifischer siRNA herabgesetzt, was zu einer Erhöhung der Permeabilisierung und somit dem PT-induzierten Effekt führte.

Ähnliche Ergebnisse zeigen sich bei den Untersuchungen in dieser Arbeit zum Einfluss der Untereinheiten G α_{i-2} und G α_{i-3} auf die PT-induzierte Inhibierung der Migration. Dafür wurde die Expression der beiden Untereinheiten gleichzeitig mittels Transfektion mit siRNA verringert. Untersuchungen mit getrennten Ansätzen zeigten, dass offenbar die nicht-transfizierte Untereinheit die Funktionen der jeweils weniger

exprimierten Untereinheit übernimmt, so dass keine Effekte auf die Migration zu verzeichnen sind (Daten nicht gezeigt). Daraus kann abgeleitet werden, dass die beiden $G\alpha_{i-2}$ - und $G\alpha_{i-3}$ -Untereinheiten mit Bezug auf die Zellmigration ähnliche Aufgaben übernehmen. Anders verhielt es sich, als beide $G\alpha$ -Untereinheiten gleichzeitig herunterreguliert wurden. Hier zeigen die transfizierten Zellen eine deutliche Hemmung der Migration, die sich bei Zugabe von PT noch um etwa 15% verstärkt (s. Abb. 5.20). Diese zusätzliche Inhibierung der Migration bei den transfizierten Zellen durch PT-Zugabe ist darauf zurückzuführen, dass bei der Transfektionsmethode nur etwa 70% der Zellen siRNA aufnehmen und somit in den Transfektionsansätzen noch unveränderte $G\alpha_{i-2}$ / $G\alpha_{i-3}$ -Untereinheiten vorliegen.

Bei Zugabe von PT werden diese durch die A-Untereinheit des Toxins in der Nähe des C-Terminus der α -Untereinheit ADP-ribosyliert (West *et al.*, 1985; Kaziro *et al.*, 1991). Da die Rezeptor erkennende Domäne im C-Terminus der α -Untereinheit liegt, wird durch die ADP-Ribosylierung die Interaktion der G-Proteine mit ihrem Rezeptor unterbunden und so ihre Aktivierung verhindert (Conklin *et al.*, 1993). Gleichzeitig bewirkt die ADP-Ribosylierung eine Aktivierung der Adenylatzyklase und daraus resultierend in manchen Zellen eine Erhöhung des cAMP-Spiegels. Die unterbundene Aktivierung der G-Proteine und die erhöhte cAMP-Konzentration führen zu einer Beeinflussung verschiedener Signalproteine (Katada und Ui, 1982a, b; Brückener *et al.*, 2003) und damit verbunden zu einer weiteren Inhibierung der Migration. Messungen zur Bestimmung der Menge an intrazellulärem cAMP nach einer Behandlung der Zellen mit PT in der in den Migrationsversuchen verwendeten Konzentration von 200 ng/ml zeigten allerdings nur für MDCK/C7-Zellen und nicht für HBMEC eine deutliche Erhöhung des cAMP-Spiegels (Brückener *et al.*, 2003; Daten für MDCK/C7 nicht gezeigt).

Die Western Blot-Analyse zeigt eine deutlich geringere Expression von $G\alpha_{i-2}$ und $G\alpha_{i-3}$ in den transfizierten Zellen verglichen mit den Kontrollzellen (s. Abb. 5.16). Dieses Ergebnis veranschaulicht, dass durch die Transfektionsmethode nicht jede Zelle siRNA aufnimmt, so dass in den Transfektionsansätzen noch jeweils schwache Banden zu erkennen sind. Aufgrund der inhibierenden Effekte auf die Migration nach Herunterregulierung von $G\alpha_{i-2}$ / $G\alpha_{i-3}$ ist für beide Proteine eine Beteiligung an den Prozessen, die zur PT-vermittelten Reduzierung führen, naheliegend. Die PT-induzierte ADP-Ribosylierung der Untereinheiten $G\alpha_{i-2}$ und $G\alpha_{i-3}$ resultiert in einer Inhibierung bestimmter Signalwege, wodurch zelluläre Funktionen gestört werden können (Denker *et al.*, 1996a; Denker *et al.*, 1996b; Saha *et al.*, 1998; Le-Niculescu *et al.*, 2005). Diese

Effekte werden offenbar durch die Verringerung der Expression der Untereinheiten ebenfalls erreicht.

Um die Rolle der *tight junction* Proteine **Claudin-1** und **Occludin** bei der Zellmigration zu untersuchen, wurde deren Lokalisation in der Zelle und das Migrationsverhalten von HBMEC nach Herunterregulierung der Expression mittels Transfektion untersucht. Claudin-1 und Occludin sind Transmembranproteine und als *tight junction* Proteine an der Barrierebildung beteiligt, wobei eine Störung der Expression von Occludin diese Funktion nicht beeinflusst (Saitou *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2005).

Zur Bestimmung der Verteilung von Claudin-1 und Occludin in der Zelle wurden Immunfluoreszenzanalysen von migrierenden HBMEC durchgeführt. Claudin-1 ist als typisches *tight junction* Protein an den Zellrändern der Zellen lokalisiert. Occludin zeigt nicht nur an den Zellgrenzen, sondern auch an den Zellrändern, die am Leitsaum zum zellfreien Raum und somit in die Richtung der Migration weisen, eine verstärkte Akkumulation (s. Abb. 5.11). Daten mehrerer Experimente zur Lokalisierung von Occludin in migrierenden MDCK zeigen, dass Occludin vorzugsweise an der Membran des Leitsaums, an dem eine Vielzahl von Signalprozessen zur Regulation der Zellmigration ablaufen, akkumuliert (Ridley *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2010).

Bei den Untersuchungen zum Migrationsverhalten von HBMEC nach Reduktion der Expression von Claudin-1 und Occludin zeigten die transfizierten Zellen für beide Proteine eine Inhibierung der Migration, die sich bei Zugabe von PT für tClaudin-1 um 10% und für tOccludin um 20% verstärkt (s. Abb. 5.21). Diese zusätzliche Hemmung beruht möglicherweise auf der ADP-Ribosyltransferaseaktivität und dem daraus resultierenden Einfluss des Toxins auf andere Signalproteine und entspricht dem generellen PT-vermittelten Effekt auf die Migration (vgl. 6.1). Zudem hat bei der durchgeführten Transfektion mit einer ermittelten Transfektionsrate von etwa 60% nicht jede Zelle siRNA aufgenommen, so dass PT möglicherweise auch einen Einfluss auf die Funktion oder Expression von Claudin-1 und Occludin in den nicht erfolgreich transfizierten Zellen haben kann.

Die Western Blot-Analyse zeigte eine deutlich geringere Expression von Claudin-1 und Occludin in den transfizierten Zellen als in den nicht-transfizierten Kontrollzellen (s. Abb. 5.17). Da bei der Transfektionsmethode nicht alle Zellen siRNA aufnehmen, sind bei den transfizierten Zellen noch schwache Banden zu erkennen.

Chen *et al.* (2010) konnten zeigen, dass Occludin ein entscheidender Regulator bei der epithelialen Migration darstellt und eine Herunterregulierung der Expression in MDCK-

Zellen zu einem verlangsamten Schließen einer Wunde führt (Chen *et al.*, 2010). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Occludin an der Aktinorganisation beteiligt ist (Atsumi Si *et al.*, 1999), so dass eine Verminderung der Expression die reduzierte Bildung von Lamellipodien, einem entscheidenden Prozess der Migration, erklären kann. Da weiterhin Experimente an Occludin-Null-Mäusen zeigten, dass die Mutation nicht letal ist (Chen *et al.*, 2010), ist eine Kompensation des Fehlens von Occludin durch andere TJ-Proteine wie z.B. unterschiedliche Claudine oder *junctional adhesion molecules* (JAMs) in kritischen Prozessen anzunehmen. Auf der anderen Seite begünstigt eine PKC-regulierte Überexpression von Claudin-1 die Zellmigration während der Wundheilung (Leotlela *et al.*, 2007).

In Untersuchungen an MDCKII-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von Occludin mit der Lokalisation von aPKC - PAR-3 am Leitsaum migrierender Zellen korreliert, da sich bei einer Herunterregulierung der Occludinexpression die Akkumulation von aPKC - PAR-3 verringert (Chen *et al.*, 2010). Bei der Migration reguliert die atypische PKC zusammen mit PAR-6 und PAR-3 die Polarisierung am Leitsaum von MDCKII-Zellen (Shin *et al.*, 2007). Der PAR-3 – aPKC – PAR-6 - Komplex wird in Endothel- und Epithelzellen von den Transmembranproteinen der *tight junctions* rekrutiert und spielt bei der apikal-basalen Polarität eine bestimmende Rolle (Joberty *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000). Diese Zusammenhänge zwischen der Expression von Occludin und der Lokalisation von aPKC – PAR-3 am Leitsaum in migrierenden Zellen sowie der Rekrutierung des PAR-3 – aPKC – PAR-6 - Komplexes durch die Transmembranproteine der *tight junctions* könnten eine weitere Erklärung für die verringerte Migration der HBMEC bei Herunterregulierung von Occludin und Claudin-1 darstellen.

Um die Beteiligung der beiden PAR-Proteine **PAR-3** und **PAR-6** am PT-induzierten Effekt auf die Migration von HBMEC zu untersuchen, wurden Transfektionen mit spezifischer siRNA gegen PAR-3 und PAR-6 durchgeführt. Die anschließenden Migrationsassays zeigten eine deutliche Inhibierung der Migration, die bei Inkubation mit PT um ungefähr 12% verstärkt wurde (s. Abb. 5.22). Diese Ergebnisse scheinen einen additiven Effekt bei Zugabe von PT zu den transfizierten Zellen aufzuweisen, was darauf hindeutet, dass PAR-3 und PAR-6 direkt an den PT-vermittelten Effekten auf die Migration beteiligt sein könnten, da sie von PT beeinflusst werden könnten. Einen Grund für die stärkere Hemmung bei Zugabe von PT könnte auch der gezeigte PT-vermittelte Effekt auf die Migration darstellen, da das Toxin durch die ADP-Ribosyltransferaseaktivität weitere Signalproteine, die ebenfalls am Migrationsprozess beteiligt sein können, beeinflusst

(vgl. 6.1). Zusätzlich kann PT auch einen Einfluss auf die PAR-3 und PAR-6 Proteine haben, die aufgrund der nicht vollständigen Transfektion mit einer Effizienz von nur etwa 50% nicht herunterreguliert wurden, das wiederum die mögliche Additivität des Effektes bestärkt.

Parallele Untersuchungen zur qRT-PCR Transkriptionsanalyse ergaben eine reduzierte mRNA Transkription für PAR-6, wenn die Zellen mit PT behandelt wurden. Die Transkription der mRNA von PAR-3 nach Behandlung mit dem Toxin war im Vergleich zu mRNA aus unbehandelten Kontrollzellen signifikant erhöht (Seidel, 2010). PT hat somit einen Einfluss auf den Komplex aus PAR-3 und PAR-6. Der Effekt einer verringerten mRNA Transkription für PAR-6 bei Behandlung mit PT kann im Zusammenhang mit der Toxin-vermittelten Inhibierung der Migration aufgrund der dadurch ausgelösten Veränderungen am Polaritätskomplex stehen. Diese Ergebnisse deuten an, dass PAR-3 und PAR-6 an den Regulationsmechanismen der PT-vermittelten Inhibierung der Migration beteiligt sein können.

Untersuchungen am epithelialen Zellpolaritätskomplex PAR-3 – aPKC – PAR-6 unter Verwendung dominant-negativer Mutanten und durch eine siRNA-vermittelte Herunterregulierung einzelner Komponenten des Komplexes resultierten in Veränderungen in der Anordnung von *tight junctions* und der Zellpolarität, was Auswirkungen auf das Migrationsverhalten hatte (Suzuki und Ohno, 2006). Eine verringerte Ansammlung des Komplexes am Leitsaum stört die Prozesse zur Organisation der Polarisierung der Zelle und die Bildung des Netzwerkes der Mikrotubuli (Shin *et al.*, 2007). Die PAR-Proteine sind an einem Signaltransduktionsweg beteiligt, der sich mit vielen anderen, die zur Polarisierung migrierender Zellen führen, überschneidet. Es ist nicht näher bekannt, wie das genaue Zusammenspiel zwischen diesen Proteinen aussieht (Macara und Goldstein, 2007).

Weitere Proteine, die auf ihre Beteiligung an den Prozessen der Migration untersucht wurden, stellen die Matrix Metalloproteinase 2 (MMP-2) und Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) dar. Mittels Transfektion wurde die Expression von **MMP-2** und **MMP-9** herunterreguliert und anschließend das Migrationsverhalten der transfizierten HBMEC im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen in An- und Abwesenheit von PT dokumentiert. Die transfizierten Zellen zeigen nach Herunterregulierung von MMP-2 und MMP-9 eine vergleichbare Inhibierung, die sich durch Zugabe von PT nur geringfügig ändert (s. Abb. 5.23). Diese zusätzliche Hemmung durch PT kann auf die gezeigten PT-vermittelten Effekte auf die Migration zurückgeführt werden, da noch weitere Proteine an den

Migrationsprozessen beteiligt sind und eventuell zusätzlich von PT beeinflusst werden (vgl. 6.1). Außerdem haben bei einer Transfektionseffizienz von etwa 60% nicht alle Zellen siRNA gegen MMP-2 bzw. MMP-9 aufgenommen, so dass die nicht herunterregulierten Proteine von PT beeinflusst werden könnten und die zusätzliche Reduzierung der Migration bedingen. Die Ergebnisse der Transfektionsversuche zeigen, dass beide Proteine an den Prozessen, die zur Hemmung der Migration führen, eine Rolle spielen können.

Beobachtungen von Tournier *et al.* (1999) bestätigen diese Resultate, da MMP-9 aktiv an der Migration von humanen bronchialen Epithelzellen (HBEC) beteiligt ist. Dabei wurde MMP-9 nur in migrierenden HBEC detektiert und ist auf der Extrazellulären Matrix sowie in den Lamellipodien, die die Richtung der Wanderung vorgeben, lokalisiert. Die Expression von MMP-9 korreliert mit der Migrationsgeschwindigkeit. Eine Blockierung der Aktivierung oder Aktivität von MMP-9 resultiert in einer reduzierten Migration der Zellen (Tournier *et al.*, 1999). Bei Zugabe von aktivierter MMP-2 wird die Migration von Brust-Epithelzellen auf dem extrazellulären Matrixsubstrat Laminin 5 stimuliert (Quaranta *et al.*, 2000).

6.1.4 Zusammenfassende Diskussion zum Zusammenspiel der Signalmoleküle

In dieser Arbeit wurden deutliche Hinweise für die Beteiligung einiger Proteine an den Regulationsmechanismen der Wanderungsprozesse gefunden. Eine Inhibierung von PKC und PLC resultierte in einer Hemmung der Migration von HBMEC. Eine Herunterregulierung der Expression der PKC α und PKC ζ , G α_{i-2} und G α_{i-3} , Claudin-1 und Occludin, PAR-3 und PAR-6 sowie MMP-2 und MMP-9 führte zu einer Inhibierung der Migration. Die mit den Migrationsprozessen in Verbindung stehenden Proteine PKC α , PAR-6, PI3K und Rac1 zeigten eine verringerte Expression bei Inkubation mit PT.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise auf einen möglichen regulatorischen Zusammenhang zwischen Pertussis Toxin, G α_{i-2} und G α_{i-3} , der PI3K und der PKC. PT vermittelt die ADP-Ribosylierung der α -Untereinheiten der inhibitorischen heterotrimeren G-Proteine und verhindert dadurch die Dissoziation des $\beta\gamma$ -Komplexes der G-Proteine sowie als weitere Folge die daraus resultierende Aktivierung der PI3K und der PKC als nachrangiges Enzym. Die PLC bildet unter anderem Diacylglycerol, das alle PKC-Isoformen bis auf ζ und λ aktiviert und somit regulatorisch im Zusammenhang mit PKC α sowie weiteren Isoformen stehen kann. Die Abbildung 6.1 fasst diese regulatorischen

Zusammenhänge von PT, $G\alpha_{i-2}$ und $G\alpha_{i-3}$, PLC, PI3K und PKC schematisch zusammen (Rappuoli und Montecucco, 2001).

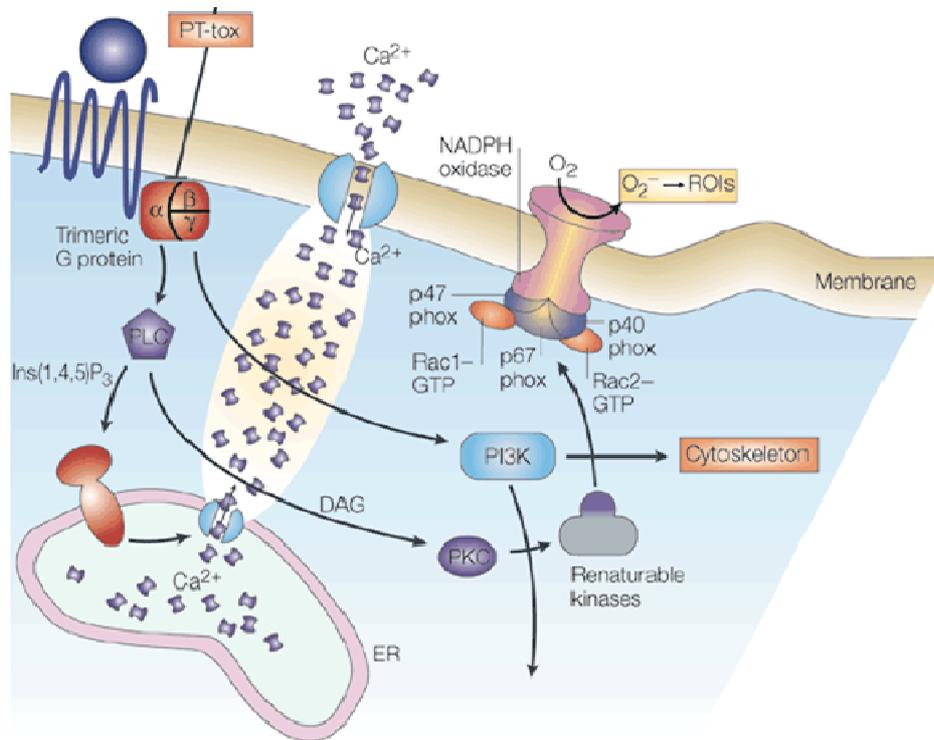


Abb. 6.1: Zusammenspiel einiger an der Migration beteiligter Signalproteine (heterotrimerer G-Proteine, Phospholipase C (PLC), Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), Proteinkinase C (PKC)) sowie mögliche Auswirkungen unter Einfluss des Pertussis Toxins. Die Abbildung zeigt schematisch den möglichen Einfluss des Pertussis Toxins (PT-tox) auf das Zusammenspiel der an der Migration beteiligten Signalproteine Phospholipase C (PLC), Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und der Proteinkinase C (PKC) (Rappuoli und Montecucco, 2001).

Untersuchungen zeigten zudem, dass eine PKC-regulierte Überexpression von Claudin-1 die Zellmigration während der Wundheilung begünstigt (Leotlela *et al.*, 2007), so dass das *tight junction* Protein und möglicherweise auch weitere TJ in der Regulation mit der PKC in Verbindung stehen könnten. Chen *et al.* zeigten eine Korrelation der Expression von Occludin mit der Lokalisation von aPKC - PAR-3 am Leitsaum migrierender MDCKII-Zellen, da eine Herunterregulierung der Expression von Occludin eine Verringerung der Akkumulation von aPKC - PAR-3 bewirkt (Chen *et al.*, 2010). Beim Migrationsprozess reguliert die atypische PKC (z.B. PKC ζ) zusammen mit PAR-6 und PAR-3 die Polarisierung am Leitsaum von MDCKII-Zellen (Shin *et al.*, 2007), was ein regulatorisches Zusammenwirken von aPKC, PAR-3 und PAR-6 aufzeigt.

MMP-2 und MMP-9 sowie Rac1 geben ebenfalls Hinweise auf eine Beteiligung am Migrationsprozess. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht geklärt werden, mit welchen

Proteinen sie in einem direkten regulatorischen Zusammenhang stehen. Rac1 kann vom cAMP/PKA-Signalweg aktiviert werden (Ridley *et al.*, 1992; Ridley und Hall 1992; Miki *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Beteiligung der PKA an der Migration jedoch nicht bestätigt werden.

Bei der Zellmigration handelt es sich um einen sehr komplexen Prozess, an dessen Regulationsmechanismen viele verschiedene Proteine beteiligt sind, so dass die vollständigen Signaltransduktionswege noch nicht aufgeklärt werden konnten.

6.1.5 Fluoreszenzmikroskopische Analysen migrierender HBMEC

Weitere Aufschlüsse über die Beteiligung einiger Proteine an den Signaltransduktionswegen, die zur Hemmung der Migration durch PT führen, sollten immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Hirnendothelzellen, die sich im Migrationsprozesses befinden, liefern. Dabei wurde die Lokalisation der *tight junction* Proteine Claudin-1, Claudin-5 und Occludin, der α -Untereinheiten inhibitorischer G-Proteine $G\alpha_{i-2}$ und $G\alpha_{i-3}$, der α -, δ -, ϵ - und ζ -Untereinheit der Proteinkinase C, der Polaritätsproteine PAR-3 und PAR-6, der Matrix Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 sowie der PI3K am Rand des zellfreien Spaltes und im konfluenten Zelllayer miteinander verglichen.

Das *tight junction* Protein Occludin sowie die α - und ζ -Untereinheiten der Proteinkinase C zeigen an den Zellrändern migrierender Zellen, die zum zellfreien Raum und somit in die Richtung der Migration weisen, eine verstärkte Akkumulation, die in den Zellen im konfluenten Zelllayer nicht zu beobachten ist (s. Abbildung 5.11, 5.12 u. 5.13). Diese Akkumulationen am Leitsaum migrierender Zellen deuten auf eine Beteiligung dieser Proteine an der Migration hin (s. 5.2.6). Die weiteren untersuchten Proteine Claudin-1, Claudin-5, $G\alpha_{i-2}$ und $G\alpha_{i-3}$, die δ - und ϵ -Untereinheit der Proteinkinase C, PAR-3 und PAR-6, MMP-2 und MMP-9 sowie PI3K zeigen keine Unterschiede in Bezug auf ihre Lokalisation, das eine Beteiligung dieser Proteine an der möglichen Signaltransduktion jedoch nicht ausschließt. Schließlich weisen andere Ergebnisse auf eine Beteiligung dieser Proteine an den Regulationsmechanismen hin. So zeigte die Inhibierung der PI3K durch Wortmannin einen hemmenden Effekt auf die Migration von HBMEC (Schulte, 2007). Eine Herunterregulierung der *tight junction* Proteine Claudin-1 und Occludin, der α -Untereinheiten inhibitorischer G-Proteine $G\alpha_{i-2}$ und $G\alpha_{i-3}$, der α - und ζ -Untereinheit der Proteinkinase C, der Polaritätsproteine PAR-3 und PAR-6 und der Matrix

Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 führte zu einer reduzierten Fähigkeit der HBMEC zu migrieren (s. 5.4).

6.2 Einfluss des Pertussis Toxins auf die Zellproliferation

Der Prozess der Wundheilung erfordert zum effizienten Schließen der Wunde ein koordiniertes Zusammenspiel zwischen der Migration und Verteilung der Zellen am Rand der Wunde sowie der Proliferation und Angiogenese (Chaudhuri *et al.*, 2006). Dabei wandern Endothelzellen aus bereits bestehenden Blutgefäßen, proliferieren und bilden zusammen mit vaskulären glatten Muskelzellen und Perizyten ein neues kapillares Netzwerk (Davis und Senger, 2005; Lamalice *et al.*, 2007).

Der inhibitorische Effekt des Pertussis Toxins auf die Wundheilung von endothelialen Zellen kann somit auf zwei verschiedenen Prozessen beruhen. Zum einen könnte das Toxin die Migration der Zellen und zum anderen aber auch die Zellproliferation beeinflussen.

Vorangegangene Untersuchungen mit dem Zellproliferationsassay von Roche konnten einen Einfluss von PT auf die Proliferation ausschließen. Durch Zellproliferationsassays mit dem xCELLigence System konnte die Vermehrung der Zellen fortlaufend in Echtzeit über einen längeren Zeitraum untersucht werden. Auch bei diesen Messungen konnte ein Einfluss des Pertussis Toxins auf die Proliferation von HBMEC ausgeschlossen werden (s. Abb. 5.25). Die inhibitorischen Effekte der Wundheilung durch das PT beruhen daher ausschließlich auf der Hemmung der Migration nicht aber auf einem Einfluss auf die Zellproliferation.

6.3 Einfluss des Cholera Toxins auf die Migration und Proliferation

Das Cholera Toxin (CT) vermittelt die ADP-Ribosylierung der GTP gebundenen α -Untereinheiten **stimulierender** heterotrimerer G-Proteine. Durch diese Veränderung wird der aktive Zustand der G-Proteine beibehalten, so dass diese ihrerseits die Adenylatzyklase aktivieren, was einen starken Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels zur Folge hat. Dieser Effekt der CT-vermittelten Erhöhung der cAMP-Konzentration konnte allerdings nur für die Hirnendothelzelllinie HBMEC nicht aber für die Epithelzelllinie MDCK/C7 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Migrationsexperimente zur Untersuchung des Einflusses von CT auf das Wanderungsverhalten von HBMEC zeigten den gleichen inhibierenden Effekt auf die Migration wie bei einer Inkubation mit PT (s. Abb. 5.26). Vorangegangene

Untersuchungen zur Permeabilisierung von Hirnendothelzellbarrieren führten zu dem Ergebnis, dass CT im Vergleich zur PT-vermittelten Erhöhung keinen Einfluss auf die Permeabilität nimmt (Brückener *et al.*, 2003). Dieses Ergebnis der CT-vermittelten Inhibierung der Migration stellt einen Unterschied zur unveränderten Permeabilisierung von Hirnendothelzellbarrieren bei Zugabe von CT dar. Die Prozesse der Migration und Permeabilisierung können bei Hirnendothelzellen folglich zwei unterschiedlichen Regulationsprozessen unterliegen.

Die epithelialen MDCK/C7-Zellen zeigten bei Inkubation mit CT im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen keine Unterschiede im Migrationsverhalten (s. Abb. 5.27). Bei Inkubation mit PT wurde die Migration dieser Epithelzellen hingegen inhibiert (s. Abb. 5.7).

Diese Ergebnisse der teilweise unterschiedlichen PT- und CT-vermittelten Hemmung der Migration lassen vermuten, dass der inhibierende Effekt unabhängig vom cAMP-Spiegel ist, da ein Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels für HBMEC nur bei Inkubation mit CT und für MDCK/C7-Zellen nur bei Inkubation mit PT festgestellt werden konnte. Im adulten Molch konnte sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* eine Inhibierung der Migration durch cAMP gezeigt werden (Donaldson und Dunlap, 2005). cAMP agiert *downstream* der kleinen GTPase Rac und inhibiert die Migration von MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) durch Beeinträchtigung der Rac-induzierten Bildung von Lamellipodien, einem entscheidenden Schritt in der Zellmigration (Huang *et al.*, 2008).

Vorangegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe lassen vermuten, dass die PT-bedingte Erhöhung der Permeabilität zerebraler Endothelzelllayer nicht durch eine Erhöhung des cAMP-Spiegels hervorgerufen wird (Brückener, 1999), was mit den Ergebnissen zu den PT-vermittelten Effekten auf die Migration übereinstimmt und die Hypothese unterstützt.

In Untersuchungen zum Einfluss von CT auf die Proliferation von HBMEC und MDCK/C7-Zellen konnten keine Unterschiede im Proliferationsverhalten der Toxin-behandelten Zellen zu den unbehandelten Kontrollzellen beobachtet werden (s. Abb. 5.28 u. 5.29). Der gezeigte CT-vermittelte inhibierende Effekt im Migrationsexperiment beruht auf der Wanderung und nicht auf der Proliferation der HBMEC. Auch für das Pertussis Toxin konnte kein Einfluss auf die Proliferation der beiden Zelllinien festgestellt werden, was bedeuten kann, dass die Regulationsmechanismen der Effekte von PT und CT der Proliferation ähnlich sind. Der cAMP-Spiegel hat scheinbar auf die Proliferation von

Zellen offenbar keinen Einfluss, da keine Unterschiede zwischen den Ergebnissen zur Zellvermehrung für die HBMEC und MDCK/C7-Zellen festzustellen sind. Untersuchungen an Endothelzellen aus Mikrogefäßen der Haut zeigten eine verstärkte Proliferation bei Inkubation mit CT und 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), was sich in Proliferationsuntersuchungen an humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen nicht bestätigen ließ (Karasek und Davison, 1981). In humanen Epithelzellen aus Zysten der Niere konnte wiederum gezeigt werden, dass cAMP die Proliferation *in vitro* stimuliert (Grantham *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Stimulierung der Proliferation durch cAMP zelltypspezifisch ist.

6.4 Einfluss von Brefeldin A auf die Migration und Proliferation

Untersuchungen zum intrazellulären Transport bestätigten die Notwendigkeit der endozytotischen Aufnahme und des retrograden Transports von PT entlang des sekretorischen Weges vor der Abgabe der S1-Untereinheit in das Zytoplasma (El Bayâ *et al.*, 1997; Veithen *et al.*, 2000). Dabei konnte zum einen das Toxin mit Hilfe elektronenmikroskopischer Methoden in endozytotischen Kompartimenten nachgewiesen werden (El Bayâ *et al.*, 1997). Zum anderen wurde auch die Passage durch den Golgi-Apparat (GA) als wichtiger Schritt zur Intoxikation des Toxins beschrieben. Die Behandlung von CHO- und HIT-T15-Zellen mit Brefeldin A (BFA) blockierte die PT-vermittelte ADP-Ribosylierung der G α -Untereinheiten vollständig, wohingegen BFA-resistente MDCK-Zellen nicht beeinflusst wurden (El Bâya *et al.*, 1997). Untersuchungen zum Einfluss von BFA auf die Migration von HBMEC und MDCK/C7-Zellen zeigten nur für die Endothelzellen nicht aber für die Epithelzellen eine Inhibierung der Migration (s. Abb. 5.30). BFA induziert den Zusammenbruch des GA, womit einer der retrograden Transportwege von der Plasmamembran zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) gestört und somit die PT-vermittelte ADP-Ribosylierung der G α -Untereinheiten bei den HBMEC blockiert wird. BFA hat indes nur bei endothelialen Zellen einen Effekt auf den GA, während MDCK/C7-Zellen geschützt sind (El Bâya *et al.*, 1997). Beide Zelltypen zeigen aber eine PT-induzierte Hemmung der Migration, was wichtige Rückschlüsse zulässt. Zum einen kann der retrograde Transport des Pertussis Toxins für den inhibierenden Effekt auf die Migration von großer Bedeutung sein, da PT durch die ADP-Ribosylierung der α -Untereinheiten heterotrimerer inhibierender G-Proteine diese inaktiviert und ferner Reaktionen auch auf weitere Signalproteine und -weiterleitungen in der Zelle auslöst, die im Zusammenwirken die PT-vermittelte Hemmung auslösen. Zum

anderen können Proteine, die über den GA retrograd transportiert werden, an den PT-induzierten Effekten beteiligt sein. Diese können bei Inkubation mit BFA nur bei den BFA-resistenten Epithelzellen nicht jedoch bei Endothelzellen über den GA retrograd transportiert werden, was eine Hemmung der Migration auslösen kann, da die betroffenen Proteine ihre Endziele nicht erreichen und somit ihre Funktionen im Migrationsprozess nicht ausüben können.

Proliferationsversuche mit MDCK/C7-Zellen zum Einfluss von BFA zeigen für die Zellen, die mit BFA inkubiert wurden, eine leicht verstärkte Vermehrung der Zellen (s. Abb. 5.31). Bei Einbeziehung der Standardabweichung liegen annähernd gleiche Werte für die Absorption vor und folglich nimmt BFA keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da BFA den GA von Epithelzellen nicht beeinflusst.

Bei den HBMEC konnte im Vergleich zu den Kontrollzellen nach Inkubation der Zellen mit BFA näherungsweise keine Vermehrung beobachtet werden, was an der Blockierung des GA liegen kann (Daten nicht gezeigt) und vermuten lässt, dass der retrograde Transport von Proteinen für die Proliferation von Bedeutung ist.

6.5 Ausblick

In dieser Arbeit wurden deutliche Hinweise auf die Beteiligung einiger Proteine an den Regulationsmechanismen der Wanderungsprozesse gefunden. Eine Herunterregulierung der Expression der PKC α und PKC ζ , G α_{i-2} und G α_{i-3} , Claudin-1 und Occludin, PAR-3 und PAR-6 sowie MMP-2 und MMP-9 führte zu einer Reduzierung der Migration. Welchen Einfluss das Pertussis Toxin auf die Expression von Claudin-1 und Occludin sowie MMP-2 und MMP-9 hat, konnte bisher nicht geklärt werden. Mit der Methode der qRT-PCR können Aufschlüsse über den Einfluss von PT auf die mRNA Transkription während des Migrationsprozesses gewonnen werden, und die Regulationsmechanismen, die zur PT-vermittelten Inhibierung führen, näher aufgeklärt werden.

Weitere Proteine mit Hinweisen auf eine Beteiligung an der Migration sind die Phospholipase C, die Proteinkinase A, die Phosphatidylinositol 3-Kinase und die kleine Rho-GTPase Rac1. Transfektionsversuche mit spezifischer siRNA zur Herunterregulierung der Expression dieser Proteine sowie ihre Aktivierung und/oder Inhibierung können fundiertere Erkenntnisse zur Beteiligung an den Signaltransduktionswegen der Migration

und dem PT-vermittelten Effekt liefern. Mit der Methode der qRT-PCR kann der Einfluss des PT auf die mRNA Transkription untersucht werden.

Eine Untersuchung der Anhäufung der Folgeprodukte der PI3K, Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat und Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat, am Leitsaum migrierender Zellen sowie der Einfluss des Pertussis Toxins auf deren Bildung können weitere Aufschlüsse über die Beteiligung der PI3K sowie einen Einfluss auf die von ihnen vermittelte Aktivierung von Rac1 an dem PT-vermittelten Effekt auf Migration liefern.

Wie in der Literatur beschrieben sind die kleinen Rho-GTPasen Rac1, Cdc42 und Rho, als zentrale Regulatoren des Zytoskeletts weitere Proteine, die zur Aufklärung der Regulationsmechanismen der PT-Effekte auf die Migration beitragen können (Nobes und Hall 1995; Ridley, 2001). Die kleine Rho-GTPase Cdc42 ist beim Migrationsprozess für die Ausbildung von Aktinstrukturen wie z.B. den Filopodien von essentieller Bedeutung (Allen *et al.*, 1998; Cory *et al.*, 2002), und die GTPase Rho steuert unter anderem die Kontraktion des nachwandernden Zellteils im Migrationszyklus (Chrzanowska-Wodnicka und Burridge 1996). Aufgrund dieser Hinweise sollten eine Beteiligung von Cdc42 und der GTPase Rho am Migrationsprozess und der Einfluss von PT auf ihre Expression untersucht werden.

Das Überleben von Occludin-Null-Mäusen lässt eine Kompensation des Fehlens von Occludin durch andere TJ Proteine wie Claudine oder JAMs vermuten (Chen *et al.*, 2010). Untersuchungen zur Beteiligung weiterer *tight junction* Proteine an den Migrationsprozessen können nähere Aufschlüsse über die Regulationsmechanismen und den inhibierenden Effekt des Pertussis Toxins bringen.

Immunfluoreszenzanalysen nach Herunterregulierung von Proteinen, die an der Organisation und Ausbildung von Aktinstrukturen beteiligt sein sollen, können Unterschiede der Aktinakkumulation und eine Funktion im Zellmigrationszyklus aufzeigen.

Die Migration von Endothelzellen verschiedener Spezies kann nach einer *in vitro* Verwundung durch die Zugabe von exogenen Wachstumsfaktoren wie z.B. FGF (*fibroblast growth factor*) angeregt werden. Diese stimulierte Zellwanderung wird durch PT-sensitive G-Proteine vermittelt. Bei ADP-Ribosylierung der G-Proteine durch PT wird diese Stimulierung gestört, und die Migration der Zellen inhibiert (Rieck *et al.*, 2001). Dieser Befund kann in Migrationsexperimenten mit HBMEC und MDCK/C7-Zellen bei Inkubation mit PT, FGF oder EGF sowie PT und FGF bzw. EGF in einem Ansatz

überprüft werden, um weitere Aufschlüsse über die PT-vermittelte Inhibierung der Migration zu gewinnen.

Eine Behandlung migrierender HBMEC und MDCK/C7-Zellen mit Forskolin, einem Aktivator der Adenylatzyklase, kann die Auswirkungen des erhöhten cAMP-Spiegels auf die Lamellipodienausbildung aufzeigen. Außerdem können so fundiertere Hinweise über eine Beteiligung von cAMP an den Regulationsmechanismen der Migration gewonnen werden. Migrationsexperimente mit weiteren Endothelzellen (hCMEC/D3) und Epithelzellen (A549) zum Einfluss von CT auf die Migration sowie Untersuchungen zum cAMP-Spiegel nach Inkubation mit PT und CT können die Beteiligung von cAMP am Migrationsprozess näher aufklären.

Um die Bedeutsamkeit des retrograden Transportes von PT auf den Zellmigrationsprozess zu untersuchen, sollten weitere Migrationsversuche mit HBMEC und MDCK/C7-Zellen koinkubiert mit BFA und PT durchgeführt werden. Zudem können Migrationsexperimente mit HBMEC und MDCK/C7-Zellen, in denen an der Zellwanderung beteiligte Proteine überexprimiert wurden, Rückschlüsse über die Bedeutung des retrograden Transportes dieser Proteine für den Migrationsprozess gewonnen werden, indem diese mit BFA inkubiert werden.

7 Literatur

- AEPFELBACHER, M., Essler, M., Huber, E., Sugai, M., Weber, P. C.**, 1997. Bacterial Toxine Block Endothelial Wound Repair. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17: 1623–1629.
- ALLEN, W. E., Zicha, D.**, 1998. A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J Cell Biol*, 141 (5): 1147–57.
- AMIEL, S. A.**, 1976. The effect of *Bordetella pertussis* vaccine on cerebral vascular permeability. *Br. J. Exp. Pathol.*, 57: 653–662.
- ATSUMI Si, S., Kokai, Y., Tobioka, H., Kuwahara, K., Kuwabara, H., Takakuwa, Y., Sasaki Ki, K., Sawada, N., Mitaka, T., Mochizuki, Y.**, 1999. Occludin modulates organization of perijunctional circumferential actin in rat endothelial cells. *Med. Electron Microsc.*, 32: 11–19.
- BABU, M. M., Bhargavi, J., Saund R. S., Singh, S. K.**, 2001. Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Current Science*, 80 (12): 1512–1522.
- BALLABH, P., Braun, A., Nedergaard, M.**, 2004. The blood-brain barrier: an overview Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.*, 16: 1–13.
- BEN-NUN, A., Mendel, I., Kerlero de Rosbo, N.**, 1997. Immunomodulation of murine experimental autoimmune encephalomyelitis by Pertussis Toxin: The protective activity, but not the disease-enhancing activity, can be attributed to the nontoxic B-oligomer. *Proc. Ass. Am. Physiol.*, 109: 120–125.
- BÖCKER, K.**, Dissertation, 2007. Zellbiologische Aspekte der Intoxikation zerebraler endothelialer Barrieren durch Pertussis Toxin.
- BLOOM, K., Pearson, C. G.**, 2004. Dynamic microtubules lead the way for spindle positioning. *Nrmicro*, 5: 481–492.
- BOLAG, U., Matter, L.**, 1992. Pertussis in der Praxis – Kritische Betrachtung von Diagnose und Epidemiologie. *Schweiz. Med. Wschr.*, 12: 1530–1535.
- BORDET, J., Gengou, U.**, 1906. Le microbe de la coqueluche. *Ann. Inst. Pasteur*, 20: 731.

- BOURDOULOUS, S., Lemichez, E., Lecuit, M., Nassif, X.,** 2010. Breaking the wall: targeting of the endothelium by pathogenic bacteria. *Nrmicro*, 8: 93–104.
- BRADFORD, M. M.,** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- BRÜCKENER, K. E.,** Dissertation, 1999. Eukaryotische Zielzellen von Pertussis Toxin: Interaktion mit cerebralen Endothelzellen
- BRÜCKENER, K. E., el Bayâ, A., Galla, H.-J., Schmidt, M. A.,** 2003. Permeabilization in a cerebral endothelial barrier model by pertussis toxin involves the PKC effector pathway and is abolished by elevated levels of cAMP. *J. Cell. Sci.*, 116: 1837–1846.
- CELLMIGRATION GATEWAY:** www.cellmigration.org.
- CHAUDHURI, V., Potts, B. R., Karasek, M. A.,** 2006. Mechanisms of microvascular wound repair I. Role of mitosis, oxygen tension, and I-kappa B In Vitro. *Cell Dev Biol Anim.*, 42: 308–13.
- CHAUDHURI, J. D.,** 2000. Blood brain barrier and infection. *Med. Sci. Monit.*, 6 (6): 1213-1222.
- CHEN. Z., Du, D., Xu, F., Yu, L., Zhang, C., Lu, X., Yuan, H., Huang, Q., Zhang, F., Boa, H., Jia, L., Wu, X., Zhu, X., Zhang, X., Zhang, Z.,** 2010. The Tight Junction Protein, Occludin, Regulates the Directional Migration of Epithelial Cells. *Developmental Cell*, 18: 52–63.
- CHERRY, J. D.,** 2005. The epidemiology of pertussis: A comparison of the epidemiology of the disease pertussis with the epidemiology of *Bordetella pertussis* infection. *Pediatrics*, Vol.115 No. 5: 1422–1427.
- CHRZANOWSKA-WODNICKA, M., Burridge, K.,** 1996. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol*, 133 (6): 1403–15.
- CLARKE, N., Ginanni, K. V., Laughlin, J. B., Pettit, G. R., Mullin, J. M.,** 2000. The transient increase of tight junction permeability induced by bryostatin 1 correlates with rapid downregulation of Protein Kinase C- α . *Experimental Cell Research*, 261: 239–249.

- CONE, T. C.**, 1970. Whooping cough is first described as a disease *sui generis* by Baillou in 1640. *Pediatrics*, 46: 522.
- CONKLIN, B. R., Farfel, Z., Lustig, K. D., Julius, D., Bourne, H. R.**, 1993. Substitution of three amino acids switches receptor specificity of Gq alpha to that of Gi alpha. *Nature*, 363: 274–276.
- DAVIS, G. E., Senger, D. R.**, 2005. Endothelial extracellular matrix: Biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ. Res.*, 97: 1093–1107.
- DENKER, B. M., Saha, C., Khawaja, S., Nigam, S. K.**, 1996a. Involvement of a heterotrimeric G protein alpha subunit in tight junction biogenesis. *J Biol Chem.*, 271: 25750–25753.
- DENKER, S. P., McCaffery, J. M., Palade, G. E., Insel, P. A., Farquhar, M. G.**, 1996b. Differential distribution of alpha subunits and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on Golgi membranes of the exocrine pancreas. *J Cell Biol.*, 133: 1027–1040.
- DENKER, B. M., Nigam, S. K.**, 1998. Molecular structure and assembly of the *tight junction*. *Am J Physiol.*, 274: F1–9.
- DONALDSON, D. J., Dunlap, M. K.**, 2005. Effect of cAMP and related compounds on newt epidermal cell migration both in vivo and in vitro. *J. Exp Zool.*, 212: 13–19.
- DUMSTREI, K., Mennecke, R., Raz, E.**, 2004. Signalling pathways controlling primordial germ cell migration in zebrafish. *J. Cell. Sci.*, 117: 4787–4795.
- EBNET, K., Iden, S., Rehder, D., August, B., Suzuki, A., Wolburg-Buchholz, K., Wolburg, H., Ohno, S., Behrens, J., Vestweber, D.**, 2006. A distinct PAR complex associates physically with VE-cadherin in vertebrate endothelial cells. *EMBO*. 7: 1239-1246.
- EL BAYÂ, A., Brückener, K., Schmidt, M. A.**, 1997. Nonrestricted Differential Intoxication of Cells by Pertussis Toxin. *Infect. Immun.*, 69: 433–435.
- EL BAYÂ, A., Linnemann, R., von Olleschik-Elbheim, L., Robeneck, H., Schmidt, M. A.**, 1997. Endocytosis and retrograde transport of Pertussis Toxin to the Golgi complex as a prerequisite for cellular intoxication. *Eur. J. Cell Biol.*, 73: 40–48.

- FARESE, R. V., Standaert, M. L., Galloway, L., Karnam, P., Bandyopadhyay, G., Moscat, J.,** 1997. Protein Kinase C- ζ as a Downstream Effector of Phosphatidylinositol 3-Kinase during Insulin Stimulation in Rat Adipocytes. *JBC*, 272 (48): 30075–30082.
- FARKAS, E., Luiten, P. G.,** 2001. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.*, 64: 575–611.
- FASANO, A., Fiorentini, C., Donelli, G., Uzzau, S., Kaper, J. B., Margaretten, K.,** 1995. Zonula occludens toxin modulates tight junctions through protein kinase C-dependent actin reorganization, in vitro. *J Clin Invest.*, 96: 710–720.
- FENSTERMACHER, J., Gross, P., Sposito, N., Acuff, V., Pettersen, S., Gruber, K.,** 1988. Structural and functional variations in capillary systems within the brain. *Ann. NY Acad. Sci.*, 529: 21–30.
- FEOKTISTOV, I., Goldstein, A. E., Biaggioni, I.,** 2000. Cyclic AMP and protein kinase A stimulate Cdc 42, role of A (2) adenosine receptors in human mast cells. *Mol. Pharmacol.*, 58: 903–910.
- FRY, N. K., Duncan, J., Malnick, H., Warner, M., Smith, A. J., Jackson, M. S., Ayoub, A.,** 2005. *Bordetella petrii* clinical isolate. *Emerg. Infect. Dis.*, 11 (7): 1131–1133.
- GERLACH, G., von Wintzingerode, F., Middendorf, B., Gross, R.,** 2001. Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. *Micinf.*, 3: 61–72.
- GINSBERG, M. H., Lim, C. L., Kain, K. H., Tkachenko, E., Goldfinger, L. E., Gutierrez, E., Allen, M. D., Groisman, A., Zhang, J.,** 2008. Integrin-mediated Protein Kinase A Activation at the Leading Edge of Migrating Cells. *Mol Biol Cell*, 19 (11): 4930–4941.
- GLOOR, S. M., Wachtel, M., Bolliger, M. F., Ishihara, H., Landmann, R., Frei, K.,** 2001. Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier. *Brain Res Rev*, 36: 258–264.
- GOODNOW, R. A.,** 1980. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol. Rev.*, 44: 722–738.

- GRANTHAM, J. J., Yamaguchi, T., Pelling, J. C., Ramaswamy, N. T., Eppler, J. W., Wallace, D. P., Nagao, S., Rome, L. A., Sullivan, L. P.**, 2000. cAMP stimulates the in vitro proliferation of renal cyst epithelial cells by activating the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Kidney International*, Vol. 57: 1460–1471.
- GUIO, N.**, 2005. Is *Bordetella pertussis* changing? *ASM News.*, 71 (5): 230–234.
- HALL, A.**, 1998. Rho-GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279:509–514.
- HAHN, H., Falke, D., Kaufmann, S. H. E., Ullmann, U.**, 2005. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, 5. Auflage, *Springer Medizin Verlag*, Heidelberg.
- HAUGH, J. M., Codazzi, F., Teruel, M., Meyer, T.**, 2000. Spatial sensing in fibroblasts mediated by β phosphoinositides. *J. Cell Biol.*, 151: 1269–1280.
- HAWKINS, B. T., Davis, T. P.**, 2005. The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. *Pharmacol. Rev.*, 57: 173–185.
- HEPLER, J. R., Gilman, A. G.**, 1992. G proteins. *Trends Biochem Sci.*, 17: 383–387.
- HSIA, J. A., Moss, J., Hewlett, E. L., Vaughan, M.**, 1984. ADP-ribosylation of adenylate cyclase by Pertussis Toxin: effects of inhibitory agonist. *J. Biol. Chem.*, 259: 1086–1090.
- HUANG, X.-Y., Chen, L., Zhang J.**, 2008. cAMP inhibits cell migration by interfering with Rac-induced lamellipodium formation. *J. Biol. Chem.*, 283: 13799–13805.
- JACKWOOD, M. W., McCarter, S. M., Brown, T. P.**, 1995. *Bordetella avium*: an opportunistic pathogen in leghorn chickens. *Avian-Dis.*, 39: 360–367.
- JOBERTY, G., Petersen, C., Gao, L., Macara, I. G.**, 2000. The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat. Cell Biol.*, 2: 531–539.
- KARASEK, M. A., Davison, P. M.**, 1981. Human Dermal Microvascular Endothelial Cells In Vitro: Effect of Cyclic AMP on Cellular Morphology and Proliferation Rate. *J. Cellular Physiology*, 106: 253–258.
- KATADA, T., Ui, M.**, 1982a. Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-activating protein due to ADP-ribosylation of a membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79: 3129–3133.

- KATADA, T., Ui, M.**, 1982b. ADP-ribosylation of the specific membrane protein of C6 cells by islet-activating protein associated with modification of adenylate cyclase activity. *J Biol Chem*, 257: 7210–7216.
- KAZIRO, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M., Satoh, T.**, 1991. Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu Rev Biochem.*, 60: 349–400.
- KEMLER, R.**, 1993. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.*, 9: 317–321.
- KENT, C. K., Yamamura, S., Nelson, P. R.**, 1995. Role of Protein Kinase C in Attachment, Spreading, and Migration of Human Endothelial Cells. *J. Surgical Research*, 63: 349–354.
- KNIGHT, B., Laukaitis, C., Akhtar, N., Hotchin, N. A., Edlund, M., Horwitz, A. R.** 2000. Visualizing muscle cell migration in situ. *Curr. Biol.*, 10: 576–585.
- KÜGLER, S., Böcker, K., Heusipp, G., Greune, L., Kim, K. S., Schmidt, M. A.**, 2007. Pertussis Toxin Transiently Affects Barrier Integrity, Organelle Organization, and Transmigration of Monocytes in a Human Brain Microvascular Endothelial Cell Barrier Model. *Cell. Microbiol.*, 1–14.
- LAMALICE, L., Le Boeuf, F., Huot, J.**, 2007. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ. Res.*, 100: 782–794.
- LAEMMLI, U. K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227: 680–685.
- LAUFFENBURGER, D. A., Horwitz, A. F.**, 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell.*, 84: 359–369.
- LEHMANN, D., Ben-Nun, A.**, 1992. Bacterial agents protect against autoimmune disease. I. Mice pre-exposed to Bordetella pertussis or Mycobacterium tuberculosis are highly refractory to induction of experimental autoimmune encephalomyelitis *J Autoimmun.* 5: 675–90.
- LE-NICULESCU, H., Niesman, I., Fischer, T., Devries, L., Farquhar, M. G.**, 2005. Identification and characterization of GIV, a novel Galpha i/s interacting protein found on COPI, ER-Golgi transport vesicles. *J Biol Chem.*, 4: 4.

- LEOTLELA, P. D., Wade, M. S., Duray, P. H., Rhode, M. J., Brown, H. F., Rosenthal, D. T., Dissanayake, S. K., Earley, R., Indig, F. E., Nickoloff, B. J., 2007.** Claudin-1 overexpression in melanoma is regulated by PKC and contributes to melanoma cell motility. *Oncogene*, 26: 3846–3856.
- LEYTE, A., Barr, F. A., Kehlenbach, R. H., Huttner, W. B., 1992.** Multiple trimeric Gproteins on the trans-Golgi network exert stimulatory and inhibitory effects on secretory vesicle formation. *Embo J.*, 11: 4795–4804.
- LIN, D., Edwards, A. S., Fawcett, J. P., Mbamalu, G., Scott, J. D., Pawson, T., 2000.** A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat. Cell Biol.*, 2: 540–547.
- LOPEZ-ILASACA, M., Crespo, P., Pellici, P. G., Gutkind, J. S., Wetzker, R., 1997.** Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science*, 275: 394–397.
- LOTTSPREICH, F., Zorbas, H., 1998.** Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg.
- LINTHICUM, D. S., Munoz, J. J., Blaskett, A., 1982.** Acute experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Cell Immun.*, 73: 299–310.
- MACARA, I. G., Goldstein, B., 2007.** The PAR Proteins: Fundamental Players in Animal Cell Polarization. *Devcel.*, 609–622.
- MACHIDE, M., Kamitori, K., Kohsaka, S., 2000.** Hepatocyte growth factor-induced differential activation of phospholipase cgamma 1 and phosphatidylinositol 3-kinase is regulated by tyrosine phosphatase SHP-1 in astrocytes. *J. Biol. Chem.*, 275: 31392–31398.
- MATTOO, S., Cherry, J. D., 2005.** Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* Subspecies *Clin Microbiol Rev.*, 18: 326–82.
- MCINTYRE, P., Amin, J., Gidding, H., Hull, B., Torvaldsen, S., Tucker, A., 2000.** Vaccine preventable diseases and vaccination coverage in Australia, 1993-1998. *Commun Dis Intell. Suppl.*: v-83.

- MENKES, J. H., Kinsbourne, M.**, 1990. Workshop on neurologic complications of pertussis and pertussis vaccination. *Neuropediatrics.*, 21: 171–6.
- MIKI, H., Yamaguchi, H.**, 2000. IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature*, 408 (6813): 732–5.
- MILLS, K. H. G.**, 2001. Immunity to *Bordetella pertussis*. *Micinf.*, 3: 655–677.
- MUNOZ, J. J.**, 1985. Biological activities of pertussigen (Pertussis Toxin). In *Pertussis Toxin* (ed. R.D. Sekura, J. Moss, M. Vaughan), 1-18. New York. Academic Press.
- MURGA, C., Laguinge, L., Wetzker, R., Cuadrado, A., Gutkind, J. S.**, 1998. Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. A role for alpha and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinase gamma. *J Biol Chem.*, 273: 19080–19085.
- NISHIYA, N., Kiosses, W. B., Han, J., Ginsberg, M. H.**, 2005. An alpha4 integrin-paxillin-Arf-GAP complex restricts Rac activation to the leading edge of migrating cells. *Nat. Cell Biol.*, 7: 343–352.
- NOBES, C. D., Hall, A.**, 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81 (1): 53–62.
- NORDHEIM, A.**, 2008. Vorlesung Zellbiologie II “Zellmigration / Zellmotilität”. www.uni-tuebingen.de/.../V_ZBII_Migration_SS08-online_000.pdf.
- O'CONNOR, K. L., Mercurio, A. M.**, 2001. Protein kinase A regulates Rac and is required for the growth factor-stimulated migration of carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 276: 47895–47900.
- OHNO, S., Mishima, A., Suzuki, A., Enaka, M., Hirose, T., Mizuno, K., Ohnishi, T., Mohri, H., Ishigatsubo, Y.**, 2002. Over-expression of PAR-3 suppresses contact-mediated inhibition of cell migration in MDCK cells. *Genes to Cells*, 7: 581–596.
- OLDENDORF, W. H., Cornford, M. W., Brown, W. J.**, 1977. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann. Neurol.*, 1: 409–417.

- OVINGTON, L., 2003. Bacterial toxins and wound healing. *Ostomy wound manage*, 49: 8–12
- PINHEIRO, E. M., Montell, D. J., 2004. Requirement for Par-6 and Bazooka in *Drosophila* border cell migration development. *The Company of Biologists*, 131: 5243–5251.
- POLLARD, T. D., Blanchoin, L., Mullins, R. D., 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*, 29: 545–576.
- PRIMO, L., di Blasio, L., Roca, C., Droetto, S., Piva, R., Schaffhausen, B., 2007. Essential role of PDK1 in regulating endothelial cell migration. *J. Cell. Biol.*, 176 (7): 1035–1047.
- QUARANTA, V., Koshikawa, N., Giannelli, G., Cirulli, V., Miyazaki K., 2000. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over Laminin-5. *J. Cell Biol.*, 148 (3): 615–624.
- RAPPUOLI, R., Montecucco, C., 2001. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach, *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2, 457–466.
- REESE, T. S., Karnovsky, M. J., 1967. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase, *J. Cell Biol.*, 208: 207–217.
- REHM, H., 1996. Der Experimentator: Proteinbiochemie, *Gustav Fischer*.
- REINHART-KING, C. A., 2008. Endothelial cell adhesion and migration. *Methods in Enzymology*, 443: 45–64.
- RICKERT, P., Weiner, O. D., Wang, F., Bourne, H. R., Servant, G., 2000. Leukocytes navigate by compass: roles of PI3Kg and its lipid products. *Trends Cell Biol.* 10, 466–473.
- RIDLEY, A. J., Hall, A., 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 70 (3): 389–99.
- RIDLEY, A. J., Paterson, H. F., 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, 70 (3): 401–10.

- RIDLEY, J. R.**, 2001. Rho GTPases and cell migration. *J. Cell. Sci.*, 114: 2713–2722.
- RIDLEY, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T., Horwitz, A. R.**, 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 302: 1704–1709.
- RIECK, P. W., Cholidis, S., Hartmann, C.**, 2001. Intracellular Signalling Pathway of FGF-2-modulated Corneal Endothelial Cell Migration during Wound Healing in vitro. *Exp. Eye Res.*, 73: 639–650.
- ROSSON, D., O'Brien, T. G., Kampherstein, J. A., Szallasi, Z., Bogi, K., Blumberg, P. M., Mullin, J. M.**, 1997. Protein kinase C- α activity modulates transepithelial permeability and cell junctions in the LLC-PK1 epithelial cell line. *J Biol Chem.*, 272: 14950–14953.
- ROTENBERG, S. A., Sanz-Navares, E., Fernandez, N., Kazanietz, M. G.**, 2001. Atypical protein kinase C ζ suppresses migration of mouse melanoma cells. *Cell Growth & Differentiation*, Vol. 12: 517–524.
- ROYAL, I., Lamarche-Vane, N., Lamorte, L., Kaibuchi, K., Park, M.**, 2000. Activation of cdc42, rac, PAK, and rho-kinase in response to hepatocyte growth factor differentially regulates epithelial cell colony spreading and dissociation. *Mol. Biol. Cell* 11, 1709–1725.
- SANDER, E. E., van Delft, S., ten Klooster, J. P., Reid, T., van der Kammen, R. A., Michiels, F., Collard, J. G.**, 1998. Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Cell Biol.*, 143, 1385–1398.
- SAHA, C., Nigam, S. K., Denker, B. M.**, 1998. Involvement of Galphai2 in the maintenance and biogenesis of epithelial cell tight junctions. *J Biol Chem.*, 273: 21629-21633.
- SAITOU, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J. D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., Tsukita, S.**, 2000. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell*, 11, 4131–4142.

- SAMSON, T., Smyth, N., Janetzky, S., Wendler, O., Muller, J.M., Schule, R.,** 2004. The LIM-only proteins FHL2 and FHL3 interact with alpha- and beta-subunits of the muscle alpha7beta1 integrin receptor. *J Biol Chem.* 279: 28641–28652.
- SCHMITT, C. K., Meysick, K. C., O'Brien, A. D.,** 1999. Bacterial Toxins: Friends or Foes? www.cdc.gov.
- SCHNEEBERGER, E. E., Lynch, R. D.,** 2004. The tight junction: a multifunctional complex, *Am. J. Physiol.*, 286: C1213–C1228.
- SCHULTE, J.,** Diplomarbeit, 2007. Untersuchungen zum Einfluss von Pertussis Toxin auf die Translokation pathogener Bakterien durch endotheliale Barrieren.
- SCHUPPER, A., Shuper A.,** 2007. Neurological morbidity and the pertussis vaccine: an old story revisited. *Scand J Infect Dis.*, 39: 83–6.
- SEDLAKOVA, R., Shivers, R. R., Del Maestro, R. F.,** 1999. Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 31: 149–161.
- SEIDEL, G.,** Dissertation, 2010. Molekulare Mechanismen der Permeabilisierung von Endothelzellbarrieren durch Pertussis Toxin.
- SELDEN, S. C., Schwartz, S. M.,** 1979. Cytochalasin B inhibition of endothelial proliferation at wound edges in vitro. *J Cell Biol.*, 81: 348–354.
- SERVANT, G., Weiner, O. D., Herzmark, P., Balla, T., Sedat, J. W., Bourne, H. R.,** 2000. Polarization of chemoattractant receptor signalling during neutrophil chemotaxis. *Science*, 287: 1037–1040.
- SHIN, K., Wang, Q., Margolis, B.,** 2007. PATJ regulates directional migration of mammalian epithelial cells. *EMBO Rep.*, 8: 158–164.
- SKOWRONSKI, D. M., De Serres, G., MacDonald, D., Wu, W., Shaw, C., Macnabb, J.,** 2002. The changing age and seasonal profile of pertussis in Canada. *J Infect Dis.*, 185: 1448–1453.
- SUZUKI, A., Ohno, S.,** 2006. The PAR–aPKC system: lessons in polarity. *J Cell Sci.*, 119: 979–987.

- STEIN, P. E., Boodhoo, A., Armstrong, G. D., Cockle, S. A., Klein, M. H., Read, R. J.,** 1994. The crystal structure of pertussis toxin. *Structure*, 2: 45–57.
- STEINMAN, L., Weiss, A., Adelman, N., Lim, M., Zuniga, R., Oehlert, J., Hewlett, E., Falkow, S.,** 1985. Pertussis toxin for pertussis vaccine encephalopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82: 8733–8736.
- STIBITZ, S., Yang, M-S.,** 1997. Genomic fluidity of *Bordetella pertussis* assessed by a new method for chromosomal mapping. *J Bacteriol.*, 179: 5820–5826.
- STINS, M. F., Gilles, F., Kim, K. S.,** 1997. Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells. *J. Neuroimmunol.*, 76: 81–90.
- STOW, J. L., de Almeida, J. B., Narula, N., Holtzman, E. J., Ercolani, L., Ausiello, D. A.,** 1991. A heterotrimeric G protein, $G\alpha_{i-3}$, on Golgi membranes regulates the secretion of a heparin sulfate proteoglycan in LLC-PK₄ epithelial cells. *J. Cell Biol.*, 114: 1113–1124.
- STRATHMANN, M. P., Simon, M. I.,** 1991. G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci*, 88: 5582–5586.
- TAKEDA, H., Matozaki, T., Takada, T., Noguchi, T., Yamao, T., Tsuda, M.,** 1999. PI3-kinase gamma and protein kinase C-zeta mediate RAS-independent activation of MAP kinase by a Gi protein-coupled receptor. *Embo J.*, 18: 386–395.
- TAMURA, M., Nogimori, K., Murai, S., Yajima, M., Ito, K., Katada, T., Ui, M., Ishii, S.,** 1982. Subunit structure of islet-activation protein, Pertussis toxin, in conformity with the A-B Model. *Biochemistry*, 21: 5516–5522.
- TANAKA, M., Vitek, C. R., Pascual, F. B., Bisgard, K. M., Tate, J. E., Murphy, T. V.,** 2003. Trends in pertussis among infants in the United States, 1980–1999. *Jama.*, 290: 2968–2975.
- TOKER, A.,** 1998. Signalling through protein kinase C. *Front Biosci.* 3: D1134–1147.
- TOMSON, F. L., Koutsouris, A., Viswanathan, V. K., Turner, J. R., Savkovic, S. D., Hecht, G.,** 2004. Differing roles of protein kinase C-zeta in disruption of tight junction barrier by enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Gastroenterology*. 127: 859–869.

- TOURNIER, J. M., Legrand, C., Gilles C., Zahm J. M., Polette M., Buison A. C., Kaplan H., Birembaut, P.**, 1999. Airway Epithelial Cell Migration Dynamics: MMP-9 Role in Cell-Extracellular Matrix Remodeling. *J Cell Biol*, 146 (2): 517–529.
- VANDESOMPELE, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F.**, 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 3: RESEARCH0034.
- VANHAESEBROECK, B., Leever, S. J., Panayotou, G., Waterfield, M. D.**, 1997. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci.*, 22: 267–272.
- VEITHEN, A., Raze, D., Locht, C.**, 2000. Intracellular trafficking and membrane translocation of pertussis toxin into host cells. *Int J Med Microbiol.*, 290: 409–413.
- WARE, J. A., Wang, A., Nomura, M., Patan, S.**, 2002. Inhibition of Protein Kinase C prevents endothelial cell migration and vascular tube formation in vitro and myocardial neovascularization in vivo. *Circ Res.*, 90: 609–616.
- WEIJER, C. J.**, 2009. Collective cell migration in development. *J Cell Sci.*, 122: 3215–3223.
- WEISS, A. A., Hewlett, E. L.**, 1986. Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Annu Rev Microbiol.*, 40: 661–86.
- WEKSLER, B. B., Subileau, E. A., Perriere, N., Charneau, P., Holloway, K., Leveque, M., Tricoire-Leignel, H., Nicotra, A., Bourdoulous, S., Turowski, P., Male, D. K., Roux, F., Greenwood, J., Romero, I. A., Couraud, P. O.**, 2005. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *Faseb J.*, 1:1.
- WEST, R. E., Moss, J., Vaughan, M., Liu, T., Liu, T. Y.**, 1985. Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of transducin. Cysteine 347 is the ADP-ribose acceptor site. *J Biol – Chem.*, 260: 14428–30.
- WEIJER, C. J.**, 2009. Collective cell migration in development. *J. Cell Sci.*, 122: 3215–3223.
- WHITTARD, J. D., Akiyama, S. K.**, 2001b. Positive regulation of cell-cell and cell-substrate adhesion by protein kinase A. *J. Cell Sci.*, 114: 3265–3272.

- WHO**, 2005. Weekly epidemiological record. 4 (80): 29–40.
- WOESSNER J. F., Nagase, H.**, 1999. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.*, 274 (31): 21491–21494.
- WOLF, K., Friedl, P.**, 2009. Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev.*, 28:129–135.
- YONG, T., Meininger, G. A., Linthicum, D. S.**, 1993. Enhancement of histamin-induced vascular leakage by Pertussis toxin in SJL/J mice but not BALB/c mice. *Neuroimmunol.*, 45: 47–52.
- YU, A. S., McCarthy, K. M., Francis, S. A., McCormack, J. M., Lai, J., Rogers, R. A., Lynch, R. D., Schneeberger, E. E.**, 2005. Knockdown of occluding expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 288: C1231–C1241.
- ZALLEN, J. A., Blankenship, J. T.**, 2008. Multicellular dynamics during epithelial elongation. *Cell Dev. Biol.*, 19: 263–270.
- ZHANG, N., Guo, H., Ma, Y., Zhang, B., Sun, B., Niu, R., Ying, G.**, 2009. Pivotal Advance: PKC ζ is required for migration of macrophages, *J. Leukoc. Biol.*, 85: 911–918.
- ZYREK, A. A., Cichon, C., Helms, S., Enders, C., Sonnenborn, U., Schmidt, M. A.**, 2007. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC ζ redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell Microbiol.*, 9: 804–816.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. M. Alexander Schmidt am Institut für Infektiologie am Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung (ZMBE) in der Zeit von September 2007 bis Dezember 2010 angefertigt.

Wissenschaftliche Beiträge

Publikation

SEIDEL, G., Böcker, K., Schulte, J., Wewer, C., Greune, L., Humberg, V., Schmidt, M. A., 2010. Pertussis Toxin permeabilization enhances the traversal of *Escherichia coli* K1, macrophages, and monocytes in cerebral endothelial barrier model in vitro. *Journal of Medical Microbiology*.

Vortrag

SCHULTE, J., Seidel, G., Schmidt, M. A., 2010. Pertussis Toxin-induzierte Permeabilisierung zerebraler Endothelzellbarrieren und mögliche Konsequenzen für die Wundheilung. BHS 2010: 12.Treffen der Blut-Hirn-Schranke-Experten und Caco-2-Anwender, Bad Herrenalb Mai 2010.

Poster

SCHULTE, J., Böcker, K., Seidel, G., Schmidt, M. A., Pertussis Toxin Inhibits the Migration of Human Brain Microvascular Endothelial Cells Potentially Resulting in Reduced Barrier Repair and Wound Healing. BHS 2010: 8.Treffen der Blut-Hirn-Schranke-Experten und Caco-2-Anwender, Bad Herrenalb, Mai 2008.

SCHULTE, J., Böcker, K., Seidel, G., Schmidt, M. A., Pertussis Toxin Inhibits the Migration of Human Brain Microvascular Endothelial Cells Potentially Resulting in Reduced Barrier Repair and Wound Healing. Signal Transduction in the Blood-Brain Barriers, Amsterdam, September 2008.

SCHULTE, J., Böcker, K., Seidel, G., Schmidt, M. A., Pertussis Toxin Inhibits the Migration of Human Brain Microvascular Endothelial Cells Potentially Resulting in Reduced Barrier Repair and Wound Healing. BHS 2010: 9.Treffen der Blut-Hirn-Schranke-Experten und Caco-2-Anwender, Strassbourg, Mai 2009.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Dabei habe ich keine weiteren Quellen und Hilfsmittel als die in der Arbeit angegebenen verwendet. Aus anderen Arbeit übernommene Ergebnisse und Abbildungen sind als solche gekennzeichnet.

Münster, den _____

Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Alexander Schmidt danke ich für die interessante Themenstellung, seine Unterstützung während meiner Promotion, die vielen gestalterischen Freiräume, aber auch wissenschaftlichen Anregungen, die zum Fortgang dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Martin Bähler bedanke ich mich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Klaus Ebnet danke ich für die Übernahme des dritten Mitgliedes des Promotionskomitees.

Bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Infektiologie möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft bei jeder Art von Fragen und die sehr schöne und freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Vielen Dank an alle Korrekturleser für ihre Mühe bei der kritischen Durchsicht dieser Arbeit und ihre konstruktiven Verbesserungsvorschläge. Sandy, Dir danke ich für die große Hilfe beim Formatieren.

Bei Eva möchte ich mich für die sehr wertvolle und ehrliche Freundschaft bedanken. Du bist was ganz Besonderes für mich.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern sowie an Vanessa und Mike. Vielen Dank für eure unbegrenzte Unterstützung bei der Verwirklichung meiner Vorhaben, das Vertrauen und einfach dafür, dass ich jederzeit auf euch zählen kann. Es ist schön, eine derart wundervolle Familie zu haben.

Andreas, ich danke Dir für Dein Verständnis, Deine Hilfe und Deine Liebe. Es tut gut, zu wissen, dass Du immer für mich da bist. Ich bin sehr, sehr glücklich mit Dir und bald für immer bei Dir.