

Aus dem Universitäts-Herzzentrum Freiburg-Bad Krozingen

Kardiologie und Angiologie I

Direktor: Prof. Dr. Christoph Bode

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Anatomie des Fachbereiches
Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Einfluss bestimmter *bone morphogenetic proteins* auf die endotheliale Permeabilität

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Alexandra Marielisa Hornstein

Tierärztin

aus Nürtingen

Berlin 2015

Journal-Nr.: 3816

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.- Prof. Dr. Johanna Plendl
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Martin Moser
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Petra Knaus

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

mice, in vitro, inflammation, endothelium, permeability, stimulation, proteins

Tag der Promotion: 18.12.2015

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-689-0

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2015

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2016

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Vaskuläre Erkrankungen	7
1.2	Endothel	8
1.3	Permeabilität	8
1.3.1	<i>Adherens junctions</i>	9
1.3.2	<i>Tight junctions</i>	11
1.3.3	<i>Das Adhäsionsmolekül PECAM1</i>	11
1.4	Bone morphogenetic proteins (BMPs)	12
1.5	BMP-Signaltransduktion	13
1.6	Inflammatorische Auswirkungen der BMPs	14
1.7	Die Auswirkung der BMPs auf die epitheliale Permeabilität	15
1.8	Extrazelluläre BMP-Modulatoren	15
2	Zielsetzung	17
3	Tiere und Material	18
3.1	Tiere	18
3.2	Geräte	18
3.2.1	<i>Gebrauchsmaterialien</i>	19
3.2.2	<i>Zellen</i>	20
3.2.3	<i>Zellmedien</i>	20
3.2.4	<i>Stimulationsreagenzien</i>	21
3.2.5	<i>Reagenzien für in vivo Versuche</i>	22
3.2.6	<i>SiRNA</i>	23
3.2.7	<i>Primer</i>	23
3.2.8	<i>Primärantikörper</i>	23
3.2.9	<i>Sekundärantikörper</i>	24
3.2.10	<i>Zusammensetzung verschiedener Puffer und Gele</i>	24
3.2.11	<i>Sonstige Reagenzien</i>	25
4	Methoden	27
4.1	Zellkultur	27

4.2	Proteinisolation	30
4.3	Bradford Assay	30
4.4	Western Blot	30
4.5	Transfektion mittels SiRNA	33
4.6	Quantitative Real-Time PCR.....	34
4.7	Anfärbung des Zytoskelettbestandteiles Aktin mit Phalloidin im Endothel.....	36
4.8	Immunozytologische Färbung.....	37
4.9	Bestimmung der endothelialen Permeabilität <i>in vitro</i>	37
4.10	Quantifizierung der endothelialen Transmigration von PBMCs <i>in vitro</i>	38
4.11	Analyse der endothelialen und epithelialen Permeabilität <i>in vivo</i> nach Bleomycin induzierter Lungenschädigung.....	39
4.12	Einfluss von BMP4 auf die endotheliale Permeabilität <i>in vivo</i>	40
4.13	Statistische Analysen	41
5	Ergebnisse	42
5.1	Epitheliale und endotheliale Permeabilität nach Gabe von Bleomycin <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	42
5.2	BMPs und die endotheliale Permeabilität <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	44
5.3	BMP4 und die Transmigration von Leukozyten und PBMCs	46
5.4	BMPs und die Expression transmembraner Proteine	48
5.5	BMP9 und die Expression von PECAM1	51
5.6	BMPs und die Zellmorphologie der Endothelzelle	53
5.7	BMP-Modulatoren und die endotheliale Barrierefunktion <i>in vitro</i>	54
6	Diskussion	56
6.1	Bleomycin erhöht die epitheliale und endotheliale Permeabilität <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	56
6.2	BMPs regulieren die endotheliale Permeabilität <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	56
6.3	BMP4 erhöht die Transmigration von Leukozyten und PBMCs	57
6.4	BMPs regulieren die Expression transmembraner Proteine	58
6.5	BMP9 reduziert die Expression von PECAM1	59
6.6	BMPs verändern die Zellmorphologie	60
6.7	BMP-Modulatoren regulieren die endotheliale Barrierefunktion <i>in vitro</i>	60
7	Zusammenfassung.....	62
8	Summary	64

9	Anhang	66
9.1	Abkürzungsverzeichnis	66
9.2	Tabellenverzeichnis	68
9.3	Abbildungen	69
9.4	Ergebnisse	70
9.5	Literaturverzeichnis	71
9.6	Publikationsverzeichnis.....	75
9.7	Danksagung	76
9.8	Selbständigkeitserklärung	77

1 Einleitung

1.1 Vaskuläre Erkrankungen

Endotheliale Permeabilität ist ein entscheidender Faktor bei einer Vielzahl von vaskulären Erkrankungen. Endotheliale Hyperpermeabilität führt zu einer vermehrten Durchlässigkeit von Leukozyten und immunrelevanten Zellen, welche inflammatorische Prozesse auslösen und Gewebsentzündungen verursachen können.¹ Sepsis, Schock, Gewebsödeme, Entzündungen und Arteriosklerose² sind schwerwiegende Krankheitsprozesse, die ihren Ursprung in einer endothelialen Dysfunktion haben.³ Entscheidend für eine gesunde Homöostase zwischen Blutbahn und umliegendem Gewebe ist eine intakte endotheliale Barrierefunktion. Durch die vermehrte endotheliale Durchlässigkeit können Plasmaproteine aus der Blutbahn in das umliegende Gewebe gelangen. Die Folgen sind über den hydrostatischen Druck induzierte Ödeme, Ischämie und Hypoxie des Gewebes.⁴ Der Zusammenbruch der endothelialen Barrierefunktion ist ein Schlüsselereignis in der Entstehung diverser vaskulärer Erkrankungen. Infolge einer Abnahme der endothelialen Zell-Zellkontakte und Veränderungen des endothelialen Zytoskelettes tritt eine Dysfunktion der endothelialen Barrierefunktion auf. Die molekularen Mechanismen, die diese Schädigung des Endothels auslösen bzw. verhindern können sind vielfältig und weitestgehend unbekannt.

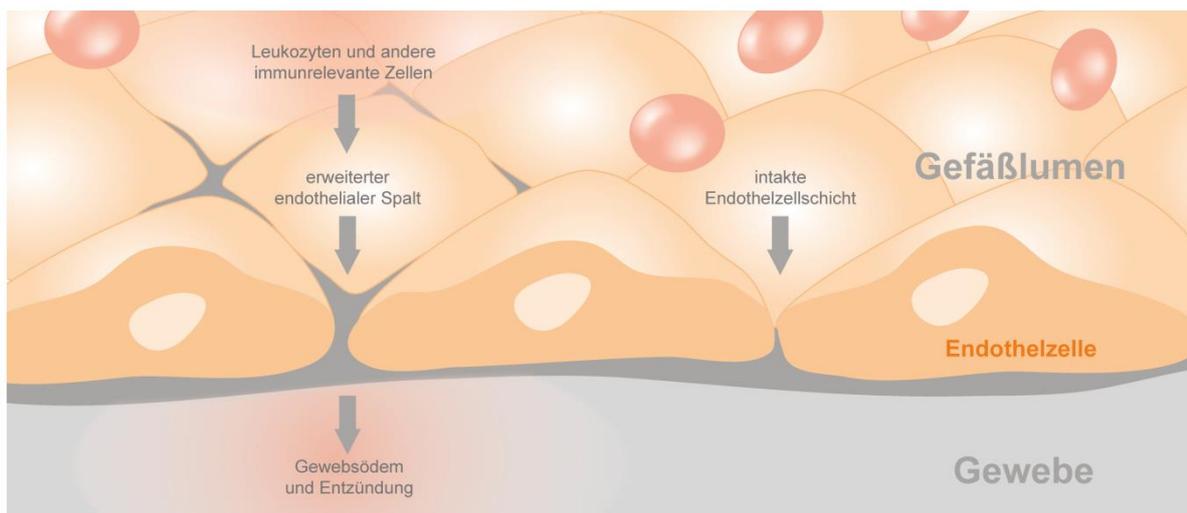


Abbildung 1.1 Gegenüberstellung eines erweiterten endothelialen Spaltes und einer intakten Endothelzellschicht¹ (Lee WL, 2010, modifiziert).

Erweitert sich der Spalt zwischen zwei benachbarten Endothelzellen, können vermehrt Leukozyten und andere immunrelevante Zellen durch die Endothelzellschicht diffundieren und im Gewebe Ödeme oder Entzündungen verursachen.

1.2 Endothel

Das Endothel ist ein einschichtiges Plattenepithel, das die Gefäße auskleidet und einer Basalmembran aufliegt. Es ist nicht nur eine einfache Begrenzung der Gefäßwand, sondern erfüllt eine Vielzahl physiologischer Funktionen. Dazu gehört neben verschiedenen Stoffwechsellleistungen auch die Regulation des Blutdruckes durch die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO). Es ist in der Lage, die Fließfähigkeit des Blutes zu erhalten und spielt eine wichtige Rolle in der Hemmung und Aktivierung von Gerinnungsprozessen. Außerdem ist das Endothel sowohl bei der Angiogenese als auch bei Entzündungsprozessen durch die Bildung inflammatorischer Moleküle beteiligt.⁵

Zusätzlich fungiert das Endothel als eine semipermeable Barriere, die den Durchfluss von Flüssigkeiten, Lösungen und Plasmaproteinen zwischen der Blutbahn und den umliegenden Geweben reguliert.⁶ Die Schicht aus Endothelzellen hat außerdem eine wichtige Barrierefunktion zum umliegenden Gewebe und verhindert das Einströmen der im Blut zirkulierenden Zellen des Immunsystems in das Gewebe.⁷

1.3 Permeabilität

Die Permeabilität des Endothels wird über zwei Wege reguliert: der transzelluläre Weg durch die Endothelzelle und der parazelluläre Weg zwischen zwei Endothelzellen.^{8, 9} Die transendothelialen Transportvorgänge lassen sich einteilen in:

- Passive Diffusion: Hierbei können vor allem niedermolekulare Substanzen wie O₂ und CO₂ passiv durch die Endothelbarriere diffundieren.
- Transporterproteine/Carrier: Es handelt sich um Proteine, die in der Zellmembran verankert sind, stationär in der Zellmembran sitzen und den Transport durch die Zellmembran passiv oder aktiv durch ATP Verbrauch bewerkstelligen.
- Transzytose: Hierbei werden gelöste Stoffe in mikropinozytischen Bläschen durch das Zytoplasma geschleust. Dieser transzelluläre Weg ist in der Regel an spezifische Rezeptoren gebunden.
- Adsorptive Transzytose/ Endozytose: So wird die Aufnahme von zellfremdem Material durch Vesikel, die aus abgeschnürten Einstülpungen der Zellmembran entstehen, bezeichnet.

Alternativ gibt es druckabhängige Transportvorgänge. Als Filtration wird ein Vorgang bezeichnet, der vor allem in Kapillaren durch den hydrostatischen Druck reguliert wird und kleine Moleküle in das umliegende Bindegewebe gelangen lässt. Resorption findet hauptsächlich in venennahen Kapillarabschnitten statt und bezeichnet die Aufnahme von gelösten Stoffen zurück in die Vene durch den kolloidosmotischen Druck.

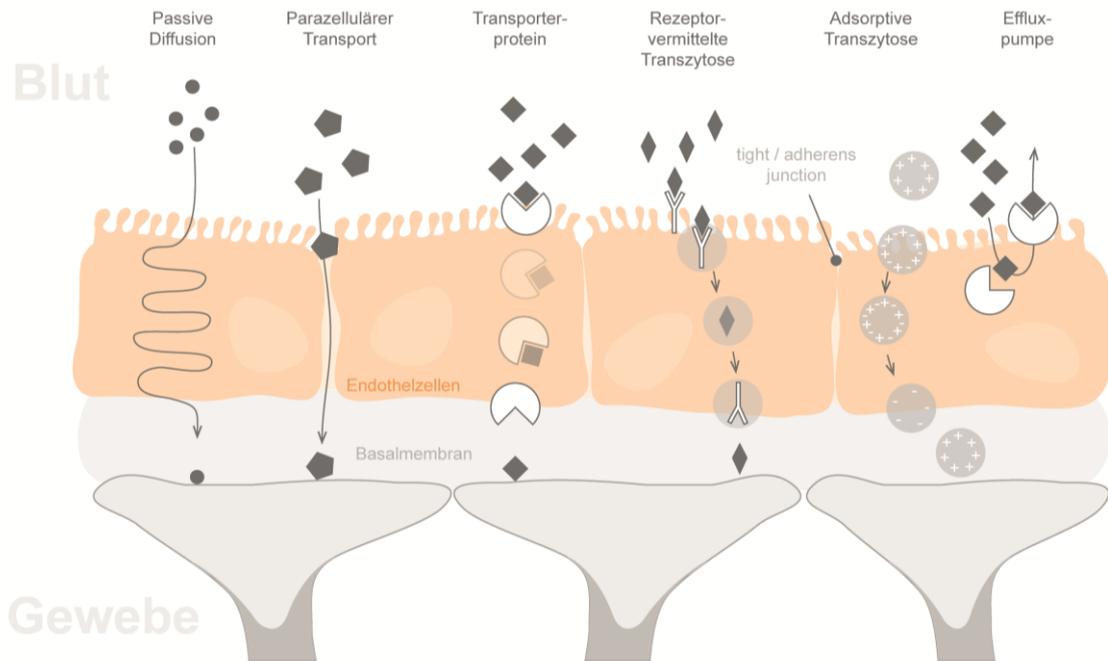


Abbildung 1.2 Verschiedene Transportvorgänge durch das Endothel¹⁰ (Heuvel M, 2013, modifiziert)

Die Abbildung zeigt eine intakte Schicht Endothelzellen, die einer Basalmembran aufliegt. Dargestellt sind unterschiedliche physiologische Transportvorgänge durch die Endothelzellen in das Gewebe.

Zwischen zwei Endothelzellen können interzelluläre Lücken entstehen, die zu einer parazellulären Permeabilität führen. Makromoleküle ab einer Größe von 3 nm können diesen Weg nicht mehr passieren.¹¹ Eine Vielzahl verschiedener transmembraner Proteine stellt die Verbindung der Endothelzellen untereinander dar. Dazu gehören Occludin, Cadherine, PECAM1, Integrin, Connexin und Desmoplakin.^{12, 13} Diese Zell-Zellkontaktproteine haben eine wichtige Rolle in der Instandhaltung der endothelialen Barrierefunktion. Die transmembranen Proteine lassen sich in tight junctions (Dichte Zellkontakte) und adherens junctions (Adhäsionsverbindungen) einteilen. Dynamische Interaktionen zwischen den transmembranen Proteinen und dem Zytoskelett sind wichtige Prozesse, die sich auf die endotheliale Permeabilität auswirken.

1.3.1 Adherens junctions

Adhäsionsverbindungen (adherens junctions) machen die Mehrzahl der Zell-Zellkontakte zwischen den Endothelzellen aus.⁶ VE-Cadherin ist eines der wichtigsten Mitglieder der Adhäsionsmoleküle.¹⁴ Es handelt sich um ein endothelspezifisches Cadherin. VE-Cadherin besteht aus einer extrazellulären Domäne, die sich mit der extrazellulären Domäne der gegenüberliegenden Zelle verbindet, und somit den Zell-Zellkontakt herstellt. Die intrazellulären Domänen sind über die Moleküle P-120-Catenin, β - und α -Catenin mit dem Aktinzytoskelett der Zelle verbunden.¹⁵ Dabei reguliert das Molekül P-120 die Interaktion

zwischen Cadherin, Kinasen, Phosphatasen und RhoGTPasen und ist durch die Verbindung von Cadherin und Catenin der wahrscheinlich wichtigste Faktor in der Stabilität der Adhäsionsverbindungen.^{6, 16}

Die dicht angeordneten extrazellulären Proteinkomplexe von VE-Cadherin stellen den Kontakt zwischen zwei Endothelzellen dar und verhindern die Migration von Leukozyten und die Auswanderung von Plasmaproteinen aus der Blutbahn in anliegende Gewebe. Kontraktionen des Aktinzytoskelettes führen zu einer zentripedalen Kraft, welche VE-Cadherin ins Zellinnere zieht. Dadurch werden die Cadherine voneinander gelöst.¹⁷

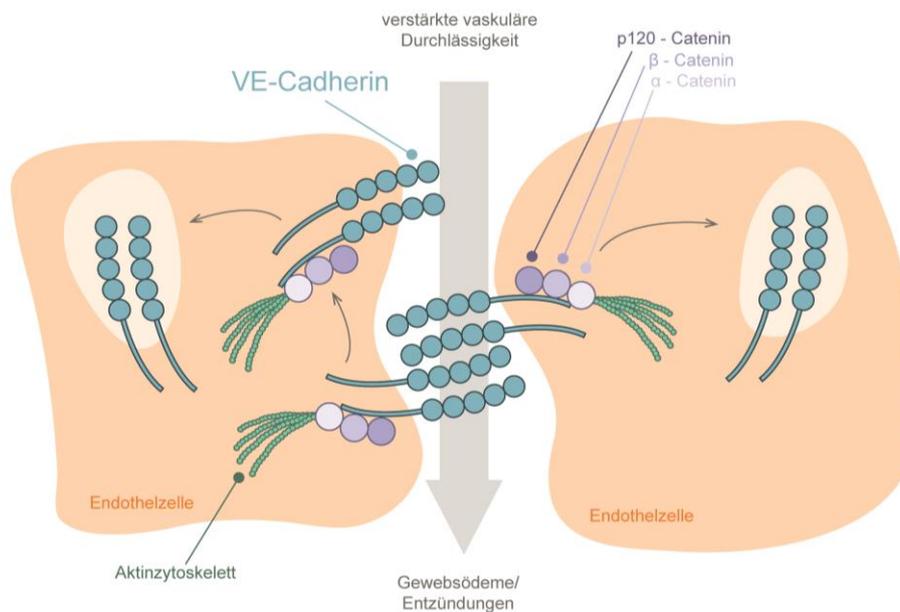


Abbildung 1.3 VE-Cadherin und dessen Verbindung zum Aktinzytoskelett¹ (Lee WL, 2010, modifiziert)

Zentripedale Kräfte können bei einer Zellkontraktion VE-Cadherin durch seine Verbindung zum Aktinzytoskelett ins Zellinnere ziehen. VE-Cadherin ist über P120-Catenin, α und β Catenin mit dem Aktinzytoskelett der Zelle verbunden. Kommt es zu einer Irritation der Zelle, kontrahiert sich diese und die zwei gegenüberliegenden Domänen von VE-Cadherin werden durch ihre Verbindung zum Aktinzytoskelett auseinander gezogen. Dadurch erweitert sich der Spalt zwischen zwei Endothelzellen, was zu einer verstärkten vaskulären Durchlässigkeit führt.

Das Umsetzen von VE-Cadherin aus der Zellmembran ins Zellinnere verursacht Lücken zwischen den Endothelzellen und führt zu einer erhöhten Permeabilität. Verstärkte parazelluläre Durchlässigkeit verursacht Gewebsödeme und Migration von Leukozyten.¹⁸

Diese beiden Kennzeichen einer Entzündungsreaktion konnten in Versuchen bestätigt werden, bei denen VE-Cadherin durch blockierende Antikörper inhibiert wurde.^{19, 20}

Passend zu dieser Beobachtung sind VE-Cadherin defiziente Mäuse nicht in der Lage, ein voll entwickeltes Gefäßsystem auszubilden.²¹ Daraus lässt sich die unentbehrliche Rolle von VE-Cadherin in der Regulation der endothelialen Barrierefunktion ableiten.

1.3.2 Tight junctions

Tight junctions machen ca. 1/5 aller Zellverbindungen im Endothel aus.⁶ Es handelt sich um schmale Bänder aus Membranproteinen, die gürtelartig die Zelle umgeben. Ihre extrazellulären Anteile verbinden sich mit den extrazellulären Anteilen der gegenüberliegenden Zelle durch sogenannte „kissing points“.²² Es wurde eine Vielzahl von molekularen Komponenten der tight junctions entdeckt. Dazu gehören die transmembranen Proteine Occludin, Cadherine, JAMs (junctional Adhäsionsmoleküle) und Tricellulin.²³ Occludin ist ein transmembranes Protein mit zwei extrazellulären Schleifen und einer N- und C-terminalen zytoplasmatischen Domäne.²⁴ Die C-terminale Domäne bindet direkt an die Zona occludens. Zonula occludens 1-3 sind intrazelluläre Komponenten der tight junctions, welche mit dem Aktinzytoskelett der Zelle verbunden sind.^{25, 26}

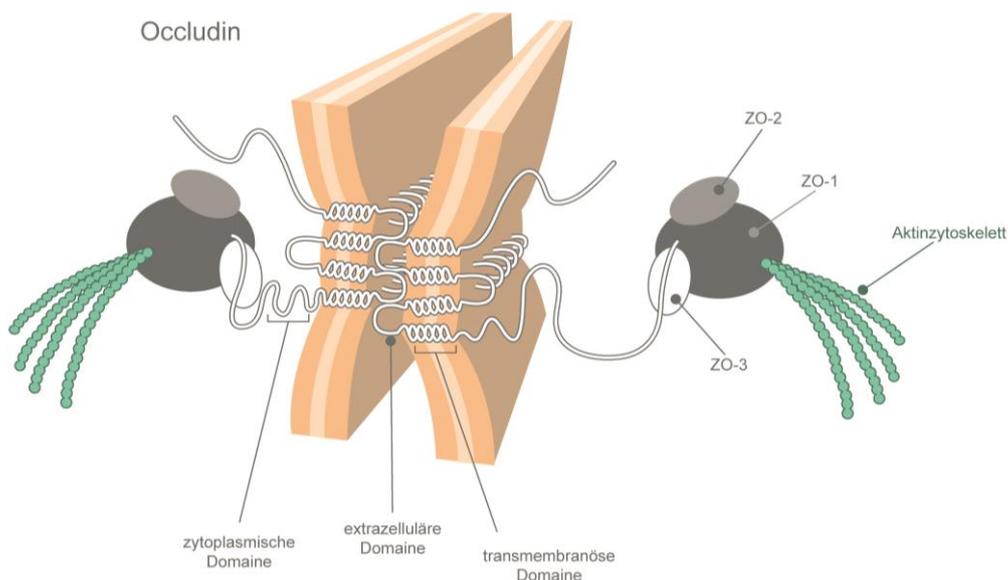


Abbildung 1.4 Occludin²⁷ (Meek B, 2012, modifiziert)

Dargestellt sind zwei Endothelzellmembranen, die gürtelartig über die extrazelluläre und die transmembrane Domäne von Occludin verbunden sind. Die extrazelluläre Domäne ist über Zonula occludens 1-3 mit dem Aktinzytoskelett der Endothelzelle verbunden.

Tight junctions haben unterschiedliche Aufgaben. Zum einen bewahren sie die endotheliale Barrierefunktion, zum andern verhindern sie die Durchmischung von Membranproteinen der apikalen und basolateralen Zellmembran.²⁸

1.3.3 Das Adhäsionsmolekül PECAM1

Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1, CD31) ist ein Mitglied der Immunglobulin (Ig)- Superfamilie und ein Adhäsionsrezeptor. PECAM1 ist in großen Mengen im Endothel exprimiert. Dort ist es ein wichtiger Bestandteil der interzellulären Verbindungen in einem konfluenten Endothelzellrasen.²⁹ Es tritt auf der Oberfläche der meisten Zellen, der hämatopoetischen Zelllinie auf, wie z.B. Thrombozyten, Monozyten,

neutrophile Granulozyten und Lymphozyten.³⁰ PECAM1 ist ein transmembranes Glycoprotein mit einem extrazellulären Anteil, welcher aus 6 homologen Ig-Domänen besteht sowie einer transmembranen Domäne und einem intrazellulären Anteil, der im Zytoplasma endet.³¹ PECAM1 werden unterschiedliche Funktionen zugesprochen. Zum einen proinflammatorische Funktionen, indem es die transendotheliale Migration von Leukozyten vermittelt.³² Zum anderen wurden bei PECAM1 auch anti-inflammatorische Funktionen entdeckt. Durch seine dämpfende Wirkung auf proinflammatorische Zytokine unterdrückt PECAM1 die Leukozytenaktivierung.³³ Wird die Expression von PECAM1 im Endothel gehemmt, werden Entzündungsreaktionen unterdrückt durch die verminderte TNF- α und Zytokin Sekretion und die reduzierte Monozyten Adhäsion am Endothel.³⁴ Deshalb ist PECAM1 ein wichtiger Regulator der endothelialen Inflammation.

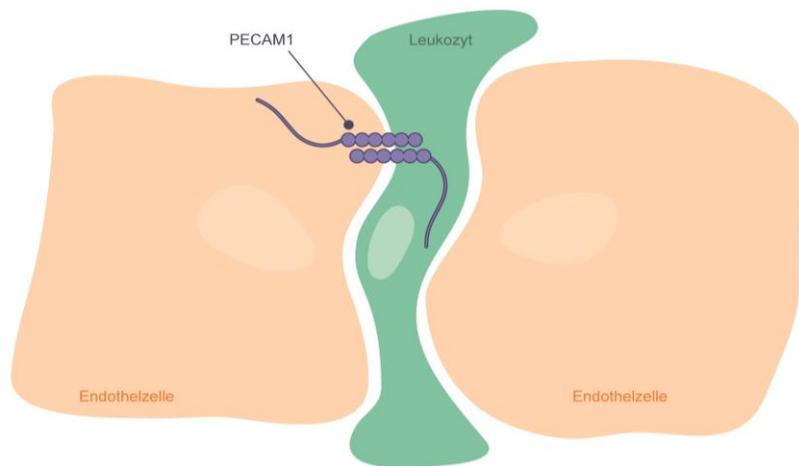


Abbildung 1.5 PECAM1²⁸ (Dejana E, 2004, modifiziert)

Das Adhäsionsmolekül PECAM1 stellt den Kontakt zwischen einem Leukozyten und einer Endothelzelle her.

1.4 Bone morphogenetic proteins (BMPs)

Bone morphogenetic proteins (BMPs) gehören zu der Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Familie. Zum ersten Mal wurden BMPs 1965 beschrieben, ihr Name entstand aufgrund ihrer Fähigkeit der Osteoinduktion bei Versuchstieren.³⁵ Es handelt sich um extrazelluläre Proteine von denen über 20 Mitglieder der BMP Superfamilie bekannt sind. Die BMPs können in verschiedene Subgruppen eingeteilt werden. So gehören BMP 2/4, BMP 5/6/7/8 und BMP 9/10 zusammen, aufgrund ihrer unterschiedlichen Bindungsaffinität am bone morphogenetic proteins Rezeptor.^{36, 37} BMP2 und BMP4 weisen eine Übereinstimmung von bis zu 86% in ihrer Aminosäuresequenz auf.³⁸

BMPs sind multifunktionelle Zellregulatoren, die Wachstum, Differenzierung und Apoptose von verschiedenen Organsystemen beeinflussen.^{36, 39} So wurden sie bei Vorgängen wie der Angiogenese, Chondrogenese⁴⁰ und Ossifikation beschrieben. Die Mitglieder der bone

morphogenetic proteins Familie sind extrazelluläre Proteine, die bei Inflammation vermehrt gebildet werden und Entzündungen im Gewebe auslösen können, indem sie die Leukozytenadhäsion am Endothel steigern.^{41, 42} Da die endotheliale Inflammation neben der Transmigration von Leukozyten auch mit einer Zunahme der endothelialen Permeabilität einhergeht, legen diese Effekte eine Rolle von BMPs in der Regulation der endothelialen Permeabilität nahe.

Zellkulturergebnisse haben nahe gelegt, dass BMPs differentiell unterschiedlich die Expression von transmembranen Proteinen beeinflussen und somit einen Einfluss auf die Zell-Zellkontakte der Endothelzellen haben.⁴³

1.5 BMP-Signaltransduktion

BMPs binden zunächst an den membranständigen Serin/Threonin-Kinase abhängigen bone morphogenetic proteins Rezeptor II (BMPRII), wodurch eine Ankopplung an den bone morphogenetic proteins Rezeptor I (BMPRI) ermöglicht wird. Der BMPRI wird phosphoryliert und aktiviert Smad Proteine im Zytosol. Diese können in drei Gruppen eingeteilt werden. Rezeptorregulierende R-Smads (Smad1/5/8), inhibitorische Smads (I-Smad) und koregulierende co-Smads (Smad4). Nach Smad-Aktivierung wandern diese in den Zellkern und interagieren dort mit den Transkriptionsfaktoren und lösen eine Expression BMP-abhängiger Gene aus. Am BMPRI wurden für die unterschiedlichen Subgruppen der BMPs verschiedene Bindungspräferenzen festgestellt. Eine frühere Studie konnte zeigen, dass vor allem BMP9 mit einer hohen Affinität ALK-1 bindet⁴⁴ (actin receptor-like kinase), welches Smad1 und oder Smad 5 phosphoryliert.⁴⁵ Mitglieder der BMP2 und 4 Gruppe binden bevorzugt ALK 2, 3, 6 und können alle R-Smads aktivieren.³⁶

Phosphoryliertes Smad 1/5 aktiviert die Expression des BMP-Markers Id1 (inhibitor of differentiation 1). Anhand der Id1 Expression ist es möglich, die BMP-Aktivität zu quantifizieren.⁴⁶ Es gibt einen Smad unabhängigen Signalweg über MAP Kinasen (MAPK). Die aktivierten MAP Kinasen gelangten in den Zellkern und phosphorylieren dort eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, die im Zellkern Gentranskription auslösen.⁴⁷

Funktionell spielt der BMPRII eine fundamentale Rolle in der Aufrechterhaltung der endothelialen Barrierefunktion. Mutationen des BMPRII sind häufig die Ursache von pulmonaler arterieller Hypertension (PAH). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Verminderung des BMPRII zu einer gesteigerten Permeabilität und zu einer gesteigerten Transmigration von Leukozyten führt. *In vivo* wurde festgestellt, dass bei BMPRII defizienten Mäusen die vaskuläre Permeabilität zunimmt und die Migration der Leukozyten in der Lunge erhöht war.⁷

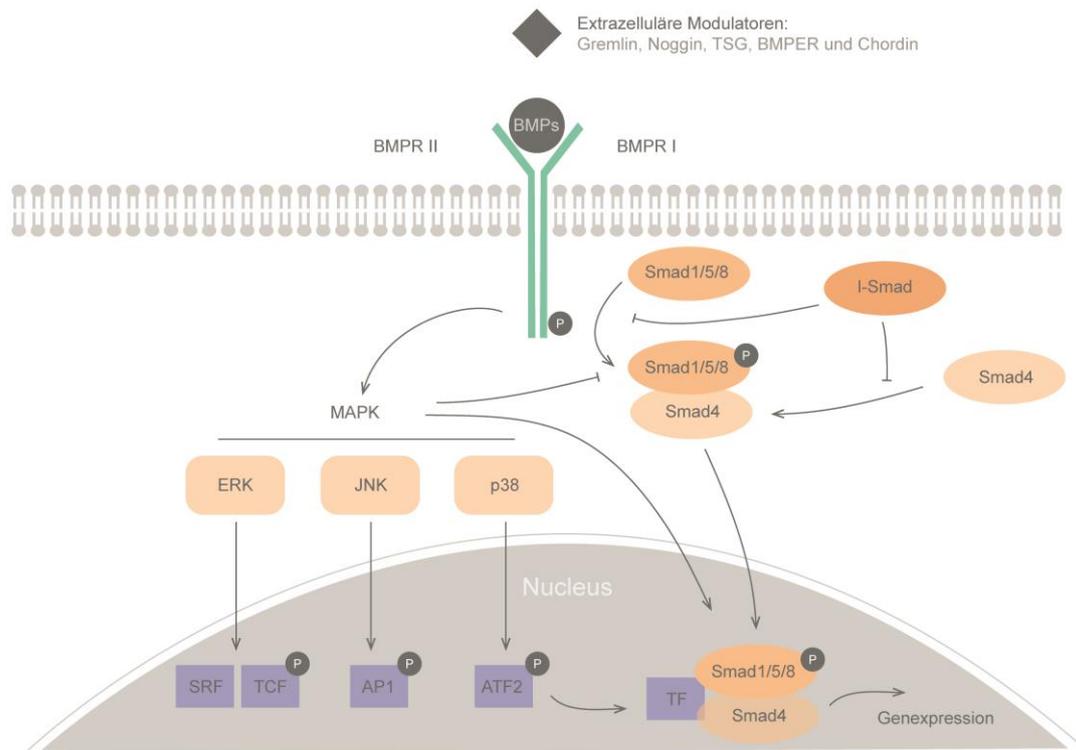


Abbildung 1.6 BMP Signalweg⁴⁸ (Liu A, 2005, modifiziert)

Bindet ein BMP oder einer der BMP-Modulatoren (Gremlin, Noggin, TSG, BMPER oder Chordin) an den BMP-Rezeptor II, kommt es zu einer Komplexbildung mit dem BMP-Rezeptor I. Dieser Komplex phosphoryliert Smad 1/5/8. Der phosphorylierte Komplex wandert zusammen mit Smad 4 in den Kern und aktiviert oder supprimiert dort Zielgene über die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren (TF). Ein weiterer Smad unabhängiger Signalweg kann über die mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) erfolgen. Es sind drei Familien der MAPKinasen bekannt: extracellulär signal-regulierte Kinase (ERK), c-Jun N-terminal Kinase (JNK) und p38-mitrogenaktivierte Proteinkinase (p38). Diese Kinasen phosphorylieren Transkriptionsfaktoren (SRF+TCF, AP1 und ATF2), die mit dem phosphorylierten Smad 1/5/8 und Smad 4 Komplex zu einer Genexpression führen.

1.6 Inflammatorische Auswirkungen der BMPs

BMPs sind nicht nur in Wachstums- und Zelldifferenzierungsprozessen nachzuweisen, auch bei diversen vaskulären Erkrankungen werden sie unterschiedlich exprimiert.⁴⁹

BMP2 und BMP4 weisen eine hohe Homologie in ihrer Aminosäuresequenz auf.⁵⁰ Für beide BMPs wurden proinflammatorische Eigenschaften beschrieben.^{41, 50} BMP2 wird nach Stimulation von Endothelzellen mit proinflammatorischen Substanzen wie TNF- α und Wasserstoffperoxid vermehrt exprimiert. BMP2 selbst kann oxidativen Stress im Endothel auslösen und verursacht dadurch eine vasodilatative Dysfunktion. Deshalb wird angenommen, dass BMP2 als ein proinflammatorisches Zytokin im Gefäßsystem wirkt.⁴¹ Für BMP4 konnte nachgewiesen werden, dass es proinflammatorische Effekte auslöst, indem es die Monozyten-Adhäsion am Endothel verstärkt. Außerdem induziert und aktiviert BMP4 die NADPH Oxidase und produziert dadurch Superoxide, die *in vitro* eine

Entzündungsreaktion bei Endothelzellen auslösen.⁵⁰ In einer *in vivo* Studie konnte gezeigt werden, dass die chronische Infusion von BMP4 die arterielle NADPH Oxidase aktiviert und sowohl zu einer endothelialen Dysfunktion als auch zu einer Hypertension bei Mäusen führt.⁵¹ Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass BMPs vaskuläre Kalzifikationen verursachen. Sie wurden vermehrt in arteriosklerotisch veränderten Plaques nachgewiesen.⁵²

Daraus lässt sich ableiten, dass BMPs eine Rolle in der Entstehung diverser vaskulärer Krankheitsprozesse spielen.

1.7 Die Auswirkung der BMPs auf die epitheliale Permeabilität

Am Beispiel der Lungenalveole lässt sich das Zusammenspiel epithelialer und endothelialer Permeabilität mit hoher klinischer Relevanz gut erklären. Die Alveolen dienen dem Gasaustausch und stellen die Endabschnitte des Bronchialbaumes dar. Die Wand der Alveolen wird von einem Alveolarepithel ausgekleidet. Das Alveolarepithel liegt einer dünnen Basalmembran auf und ist darüber mit dem Endothel der Kapillarwand verbunden. Die sogenannte „Blut-Luft-Schranke“ gewährleistet den Gasaustausch zwischen Alveole und Kapillare.⁵ Nach Lungenschädigung kommt es über die Freisetzung von proinflammatorisch wirkenden Zytokinen, wie z.B. TNF- α , zur endothelialen und epithelialen Entzündung, bei der die Beeinträchtigung der Barrierefunktion des Endothels und Epithels zum Übertritt von Flüssigkeiten, Botenstoffen und inflammatorischen Zellen in das Lungengewebe und in die Alveole führt. Der Zusammenbruch der endothelialen und epithelialen Permeabilität ist ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von Lungenerkrankungen wie Lungenödemen, Pneumonien oder akutem Lungenversagen (ALI). BMPs spielen im Epithel eine entscheidende Rolle in der Regulation der Permeabilität. In früheren Studien der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die BMP2 Expression in Bronchoalveolarzellen nach epithelialer Schädigung erhöht wird. So konnte *in vitro* in Bronchoalveolarzellen und *in vivo* im Lungengewebe wesentlich mehr BMP2 nachgewiesen werden, nachdem dieses einer Zellschädigung ausgesetzt war. Außerdem führte die Zugabe von BMP2 zu einer Reduktion des transmembranen Proteins E-Cadherin, welches bei der Instandhaltung der epithelialen Barrierefunktion eine wichtige Rolle spielt. Wurde der BMP-Modulator BMPER in hohen Konzentrationen hinzugegeben, konnte dieser Effekt gehemmt werden, was darauf schließen lässt, dass die Hemmung der proinflammatorisch wirkenden BMP-Aktivität durch BMPER die epitheliale Barrierefunktion schützt.⁴³

1.8 Extrazelluläre BMP-Modulatoren

Die BMP-Aktivität wird nicht ausschließlich über die Rezeptoraffinität und den Signalweg reguliert, sondern auch über verschiedene extrazelluläre Modulatoren. Dabei handelt es

sich um Proteine, die an BMPs binden und deren Interaktion mit dem BMP-Rezeptor blockieren.^{53, 54}

Diese Modulatoren haben zum Teil agonistische bzw. antagonistische Wirkungen auf die BMP-Aktivität. Zu den BMP Modulatoren gehören unter anderem Gremlin, Noggin, Twisted Gastrulation (TSG), LDN, Chordin und BMP-endothelial cell precursor-derived regulator (BMPER). BMPER ist ein aus 5 Cystein-reichen Domänen bestehendes Glykoprotein, das eine von Willebrand D-Domäne und eine Trypsin Inhibitor-Domäne enthält. BMPER wurde in fetal liver kinase-1 (flk1) positiven endothelialen Vorläuferzellen identifiziert und wird vorwiegend in Lunge, Herz, Gehirn und Haut exprimiert.⁵⁵

LDN-193189 (LDN) ist ein synthetischer BMP-Antagonist und blockiert den BMPR I. LDN hemmt die Phosphorylierung von Smad1, Smad5, und Smad8.⁵⁶ Auch eine Smad unabhängige Unterdrückung des Signalweges ist bekannt.⁵⁷

Gremlin, auch bekannt als Drm (Down regulated by v-mos-transformed rat embryonic fibroblasts) und Noggin binden BMP2, 4 und 7 und hemmen deren Interaktion mit dem BMPR. Beide antagonisieren somit die proinflammatorische Wirkung der BMPs.^{53, 58} Des Weiteren wird Gremlin eine antiinflammatorische Wirkung zugesprochen, indem es die Zellbeweglichkeit der Monozyten hemmt.⁵⁹ Durch die Hemmung der BMP4 Signalkaskade während der Lungenentwicklung spielt Gremlin eine wichtige Rolle in der Ausbildung der proximal-distalen Ausrichtung des Bronchialsystems.⁶⁰ In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Gremlin im Hühnerembryo die Ausbildung neuer Gefäße in der Chorioallantoismembran induziert.⁶¹

2 Zielsetzung

Der Endothelzellschaden ist ein zentraler Bestandteil vaskulärer Erkrankungen. Infolge einer Abnahme der endothelialen Zell-Zellkontakte und damit einhergehender Veränderungen des endothelialen Zytoskelettes tritt eine Dysfunktion der endothelialen Barriere auf. Dadurch werden die Einwanderung von Immunzellen und die Ödembildung im Gewebe begünstigt. Bone morphogenetic proteins (BMPs) werden eine vielfältige Wirkung bei verschiedenen vaskulären Erkrankungen zugesprochen.⁴⁷ In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte eine antagonistische Wirkung bestimmter BMPs und des BMP-Modulators BMPER auf die epitheliale Permeabilität in einem *in vitro* Schädigungsmodell nachgewiesen werden.⁴³ In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss bestimmter Vertreter der BMPs und BMP-Modulatoren auf die endotheliale Permeabilität untersucht werden, da dieser bislang unbekannt ist. Herauszufinden, ob und über welche Mechanismen, bestimmte BMPs und deren Modulatoren die endotheliale Permeabilität beeinflussen, ist Ziel dieser Arbeit.

Um dieses Ziel zu erreichen, sollten Methoden gefunden werden, um endotheliale Permeabilität messbar zu machen. Hierfür wurde *in vitro* der Modellaufbau eines Transwells gewählt und *in vivo* Perfusions-Versuche mit Evans Blue durchgeführt. In beiden Versuchen wurde nach Stimulation mit verschiedenen Mitgliedern der BMPs ein Farbstoff als Permeabilitätsindikator benutzt, der quantifiziert werden kann. Zu untersuchen galt es, ob nach Stimulation mit verschiedenen BMPs die endotheliale Permeabilität zunimmt und ob bestimmte transmembrane Proteine dabei eine Rolle spielen.

Zusätzlich sollte getestet werden, ob Mitglieder der BMP-Familie die Leukozytentransmigration beeinflussen und somit einen inflammatorischen oder antiinflammatorischen Einfluss auf das Endothel haben. Zum besseren Verständnis der molekularen Mechanismen sollte die Auswirkung bestimmter BMPs auf die transmembranen Proteine VE-Cadherin, Occludin und PECAM1 untersucht werden. Um eine Substanz zu finden, die sich antagonistisch zu den BMPs verhält, sollten die Auswirkungen verschiedener BMP-Modulatoren (Gremlin, Noggin, TSG, BMPER, LDN und Chordin) auf die endotheliale Permeabilität und bestimmter transmembraner Proteine analysiert werden.

Die klinische Bedeutung dieser Arbeit liegt darin, Mechanismen der epithelialen und endothelialen Zellschädigung nachvollziehen zu können und mit Hilfe der BMPs und deren Modulatoren eine Substanz zu finden, die potentiell therapeutisch einsetzbar wäre in der Behandlung bis jetzt unheilbarer Erkrankungen, wie Arteriosklerose, Sepsis und fortschreitende ödematöse Prozesse.

3 Tiere und Material

3.1 Tiere

Art der Tiere	
Mäuse	Bezugsquelle
C57BL/6	Charles River Laboratories Germany GmbH, Sulzfeld, Deutschland

Tabelle 1 Tiere

3.2 Geräte

Geräte	
Gerät	Hersteller
Brutschrank HERAcell	Sorvall Heraeus, Hanau, Deutschland
Computer mit Software für iCycler	Dell, Round Rock, USA
Entwicklungsmaschine für Westernblots	BioRad GmbH, München, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr AG, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80°C	Forma Scientific, Mariette, USA
Glasflaschen 100, 300, 500, 1000, 2000ml	Schott/Duran, Mainz, Deutschland
Heizblock Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kämme für Agarosegel	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Kühlschrank +4 °C	Liebherr AG, Bulle, Schweiz
Luminometer: TD-20/50	Turner Designs, Sunnyvale, USA
Magnetrührer RCT basic	IKA, Staufen, Deutschland
Mikroskop Kamera: AVT-BC 11 AP 2/3" -1-CCD-S/W-Kamera	Horn Imaging, Aalen, Deutschland
Mikroskop Kamera: AxioCam	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
Mikroskop Software: AxioVision Release 4.6	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
Mikroskop: AxioVert 25	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
Mikroskop: Stemi 2000C	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
Neubauer Zählkammer 0,0025 mm ²	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCR-Gerät: iCycler	BioRad GmbH, Jena, Deutschland
Pipetboy: Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Pipetten-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Power PAC 3000	BioRad GmbH, München, Deutschland
Präzisionswaage: Sartorius Basic Plus	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Software für iCycler, MylQ-Software	Dell, Round Rock, USA
Spectrophotometer: NanoDrop ND-1000	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Spectrophotometer: SpectraMax Gemini	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Spectrophotometer: SpectraMax Plus	Molecular Devices, Sunnyvale, USA

Stickstoff Tank: Cryo Med	Forma Scientific, Mariette, USA
ThermoBlock TBT-120	BioSan, Riga, Lettland
Vortexer: Lab-Dancer vario/Minishaker MS2	IKA, Staufen, Deutschland
Wasserbad: TWB 22	Julabo, Seelbach, Deutschland
Western Blot Protein II Ready Gel System	BioRad GmbH, München, Deutschland
Zählkammer Neubauer (Tiefe 0,1 mm)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturbank Heraeus Hera Safe	Sorvall Heraeus, Hanau, Deutschland
Zellkulturbank: Clean Air	Clean Air GmbH, Hilden, Deutschland
Zentrifuge: Centrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge: Heraeus Multifuge 3 S-R	Sorvall Heraeus, Hanau, Deutschland

Tabelle 2 Geräte

3.2.1 Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterialien	
Material	Hersteller
6 cm Zellkulturplatte (Dishes)	Nunclon™ Surface, Roskilde, Dänemark
6-Loch Zellkulturplatte	Schubert und Weiß Ominilab GmbH, München, Deutschland
Aurum Total RNA Kit	BioRad GmbH, München, Deutschland
Culture Slide, BD Falcon™	BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, USA
Deckgläser 24 x 60 mm	R.Langenbrück Labor und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Handschuhe: Gentleskin	Meditrade, Kiefersfelden, Deutschland
IScript cDNA Synthesis Kit	BioRad GmbH, München, Deutschland
Kanülen gelb 0,3x13 mm	B.Braun, Melsungen AG, Deutschland
Kanülen rosa 0,55x25 mm	B.Braun, Melsungen AG, Deutschland
Kryoröhrchen (1,2 ml)	Schubert und Weiß OmniLab GmbH, München, Deutschland
Küvetten	Instrumentation Laboratory GmbH, Kirchheim, Deutschland
Luminometer-Röhrchen PS 12/55 mm 4 ml	Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Mikroskopische Deckgläser	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Nitrozellulosemembran: Amersham Hybond ECL Membran	GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland
Objektträger (76x26mm)	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Parafilm M 380x10cm	VWR International GmbH, Neenah, USA

PCR 96 Loch Elisa Platte	Fisher Scientific GmbH, Ulm, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße: Soft Tubes 50µl	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen blau 1000 µl	StarLab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen gelb 100 µl	StarLab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen weiß 10 µl	StarLab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Plastikküvetten (Semi-Micro) 1,5 ml	BioRad, München, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsröhrchen 15 ml-50 ml „Falcons“	Schubert und Weiß OmniLab GmbH, München, Deutschland
Stabpipetten	Corning BV, Schiphol Rijk, Holland
Sterican 0,90 mm x 40 mm 20 G x 1 $\frac{1}{2}$	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Transwell Permeable Support 5µm Polycarbonate Membran, 6,5 mm Insert, 24-Lochplatte	Sigma Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Transwell Permeable Support, 0,4 µm Polycarbonate Membran, 6,5 mm Insert, 24-Lochplatte	Sigma Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Western Blot Filme: Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland
Zellkulturflasche (25, 75, 175 cm ²)	Fischer Scientific GmbH, Ulm, Deutschland
Zellkulturflasche steril 60 mm x 15 mm	Fischer Scientific GmbH, Ulm, Deutschland
Zellschaber	Corning BV, Schiphol Rijk, Holland

Tabelle 3 Gebrauchsmaterialien

3.2.2 Zellen

Verwendete Zellen	
Zellart	Hersteller
Humane Bronchialepithelzellen (BEAS-2B)	American Type Culture Collection (ATCC®), Manassas, USA
Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)	Frauenklinik Freiburg, Eigenisolation

Tabelle 4 Zellen

3.2.3 Zellmedien

Zellmedien	
Zellmedium	Hersteller
Bronchialepithelzell-Basalmedium (BEBM)	Lonza, Verviers, Belgien

DPBS (-/-) (Dulbeccos Phosphate Buffered Saline ohne Ca und Mg)	GIBCO® Life Technologies™, Karlsruhe, Deutschland
DPBS (+/+) (Dulbeccos Phosphate Buffered Saline mit Ca and Mg)	Lonza, Verviers, Belgien
Dulbeccos modified eagles medium (DMEM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Endothelial cell basal medium (EBM)	Lonza, Verviers, Belgien
Endothelial cell growth medium advanced mit Wachstumsfaktorzusätzen (HUVEC-Medium)	Provitro, Berlin, Deutschland
Fetal bovine serum (FBS)	Lonza, Verviers, Belgien
Freezing Medium	Lonza, Köln, Deutschland
Optimem	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
RPMI Medium 1640	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypan Blue Solution (0,4 %)	Aldrich, Chemie GmbH, München, Deutschland
Trypsin/L 200 mg/l Versene Mixture	Lonza, Verviers, Belgien

Tabelle 5 Zellmedien

3.2.4 Stimulationsreagenzien

Stimulationsreagenzien	
Reagenz	Hersteller
Bleomycin	Apotheke des Universitätsklinikums, Freiburg, Deutschland
MCP-1/rhCCL2	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Norderstedt, Deutschland
Rekombinantes BMP2	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Norderstedt, Deutschland
Rekombinantes BMP4	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Norderstedt, Deutschland
Rekombinantes BMP7	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Norderstedt, Deutschland
Rekombinantes BMP9	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Norderstedt, Deutschland
Rekombinantes humanes CV-2 Protein, BMP-binding endothelial cell precursor-derived regulator (BMPER)	R&D System GmbH, Wiesbaden-Norderstedt, Deutschland
Rekombinantes humanes Noggin	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Norderstedt, Deutschland
Rekombinantes humanes TNF- α	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Norderstedt, Deutschland

Rekombinantes murines Chordin	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Norderstedt, Deutschland
Rekombinantes murines Gremlin	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Norderstedt, Deutschland
Rekombinantes murines TGF	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Norderstedt, Deutschland
Stemolecule™ BMP Inhibitor LDN-193189	Stemgent, Cambridge, USA

Table 6 Stimulationsreagenzien

3.2.5 Reagenzien für in vivo Versuche

Reagenzien für Mausversuche	
Reagenz	Hersteller
Bleomycin	Zentrale Zytostatikazubereitung, Apotheke des Universitätsklinikums Freiburg, Deutschland
EDTA	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Evans Blue	Sigma-Aldrich™, Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Forene® 100 % (V/V), Isofluran	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Formamide	Sigma-Aldrich™, Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ketamin 50 mg/ml	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich™, Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
NaCl 0,9 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Rekombinantes murines BMP4	R&D Systems GmbH, Minneapolis, USA
Rompun 2 % (Xylazin)	Bayer Healthcare, Leverkusen, Deutschland
RPMI Medium 1640	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Temgesic (Buprenorphin)	RB Pharmaceuticals, Berkshire, Vereinigtes Königreich
Thioglycolate	Sigma-Aldrich™, Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Table 7 Reagenzien für in vivo Versuche

3.2.6 SiRNA

SiRNA	
Art der SiRNA	Hersteller
SiRNA I BMP4	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
SiRNA neg. Control Alexa Fluor 488nm	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Tabelle 8 SiRNA

3.2.7 Primer

Primer	
Primer Sequenz	Primer-Bindungstemperatur
hRPII fwd: 5'-GCA CCA CGT CCA ATG ACA T-3'	62-63 °C
hRPII rev: 5'-GTG CGG CTG CTT CCA TAA-3'	64,3 °C
BMP4 fwd: 5'-CAC GAA GAA CAT CTG GAG AAC-3'	62 °C
BMP4 rev: 5'-CCT TTA AGG TAA CGA TCG GCT-3'	62 °C

Tabelle 9 Primer

Die verwendeten Primer wurden auf der Basis des genetischen Codes im Labor erstellt und über die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

3.2.8 Primärantikörper

Primärantikörper	
Antikörper	Hersteller
4',6-Diamidino-2-Phenyl-Indol-Dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, München, Deutschland
Anti-hCD31 (PECAM1)	R&D System GmbH, Wiesbaden-Norderstedt, Deutschland
Occludin (D15G7) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology®, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Phalloidin TRIC labeled mixed isomers	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, München, Deutschland
Polyclonal rabbit antihuman-GAPDH	NatuTec GmbH, Frankfurt, Deutschland
Polyclonal VE-cadherin-rabbit AB	Cell Signaling Technology®, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland

Tabelle 10 Primärantikörper

3.2.9 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	
Antikörper	Hersteller
Anti-mouse igG hRP	R&D System GmbH, Wiesbaden-Norderstedt, Deutschland
Anti-rabbit IgG hRP	Thermo Fischer Scientific Germany Ltd. & Co.KG, Bonn, Deutschland
Goat-anti-rabbit Cy2	Koma Biotech, Seoul, Korea
Goat-Serum	Dako GmbH, Hamburg, Deutschland

Tabelle 11 Sekundärantikörper

3.2.10 Zusammensetzung verschiedener Puffer und Gele

RIPA-Puffer+SDS (Gesamtmenge von 50ml)	
Reagenz	Menge
0,2 M EDTA, pH 8,0	250 µl
1 M TRIS-HCL, pH 8,0	2,5 ml
20 % SDS	0,25 ml
20 % Sodiumdeoxycholate 0,5%	1,25 ml
5 M NaCl	1,5 ml
Igepal	0,5 ml
Wasser	43,75 ml

Tabelle 12 RIPA-Puffer+SDS

Trenngel-Puffer		Sammelgel-Puffer	
Reagenz	Menge	Reagenz	Menge
1,5 M Tribase	36,3 g	0,5 M TRIS-HCL	12,1 g
Wasser	200 ml	Wasser	200 ml
HCL/NaOH	pH 8,8	HCL/NaOH	pH 6,8

Tabelle 13 Trenn- und Sammelgel-Puffer

Gele für Western Blot		
Reagenz	Trenngel (12 %)	Sammelgel
Puffer	2,5 ml	1,25 ml
Acrylamid	4 ml	0,85 ml
SDS 10 %	0,1 ml	50 µl
Ammoniumpersulfat 10 %	100 µl	100 µl
TEMED	14 µl	10 µl
Wasser	3,5 ml	2,85 ml

Tabelle 14 Gele für Western Blot

Running-Puffer (10x)		Transfer-Puffer (10x)		TBS (10x)	
Reagenz	Menge	Reagenz	Menge	Reagenz	Menge
Tribase	30,25 g	Tribase	30,25	100 mM Tribase	24,22 g
Glycerin	144,25 g	Glycerin	144,25	1,5n NaCl	87,66 g
SDS	10 g	---	---	HCl/NaOH	pH 7,4
Wasser	1 l	Wasser	1 l	Wasser	1 l
Für die Herstellung eines Liters Arbeitslösung gilt:					
100 ml Stocklösung + 900 ml Wasser		100 ml Stocklösung + 200 ml Methanol + 700 ml Wasser		100 ml Stocklösung + 895 ml Wasser + 5 ml Tween → TBST	

Tabelle 15 Running-Puffer, Transfer-Puffer und TBS

3.2.11 Sonstige Reagenzien

Sonstige Reagenzien	
Reagenz	Hersteller
Acrylamid 4K-Lösung 30 %	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (A 3678)	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, München, Deutschland
Aqua ad injectabilia	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Aqua dest. 50 ml	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Blotting Grade non fat dry milk	BioRad GmbH, München, Deutschland
Bradford Dye: BioRad Protein Assay	BioRad GmbH, München, Deutschland
Bromphenol Blau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
BSA (bovines Serumalbumin)	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Collagenase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, München, Deutschland
ECL-Lösung (Western Blot)	GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland
Fibronectin (F0895)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
FITC-Dextran	Sigma-Aldrich™, Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Glycerol (G5516)	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, München, Deutschland
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Methanol	Livchem GmbH & Co. KG, Frankfurt, Deutschland
Mowiol 4-88	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Precision Plus Protein Dual Color Standards Proteinmarker	BioRad GmbH, München, Deutschland
Protease-Inhibitor Cocktail	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Purified BSA (10 mg/ml)	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SYBR-Green Supermix (Real-Time PCR)	BioRad GmbH, München, Deutschland
Tetramethyldiamin (TEMED)	BioRad GmbH, München, Deutschland
Trockenmilchpulver (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk)	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, München, Deutschland
Trypanblau 0,4 % (TB154)	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, München, Deutschland
Trypsin-Versene (17-161), 0,25 %	Lonza, Köln, Deutschland
Tween 20 (P1379)	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, München, Deutschland
β -Mercaptoethanol (M6250)	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, München, Deutschland

Tabelle 16 Sonstige Reagenzien

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Endothelzellen

In dieser Arbeit wurden vor allem Versuche mit human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) durchgeführt. Dabei handelt es sich um Endothelzellen, die aus Nabelschnurvenen isoliert wurden, die von der Universitäts-Frauenklinik Freiburg zur Verfügung gestellt wurden. Um spenderabhängige Effekte auszuschließen, wurden immer Zellisolate mehrerer Nabelschnurvenen zusammengelegt. Die HUVECs Isolation wurde im Institut der Humangenetik, Abteilung Kardiologie und Angiologie I von Laboranten durchgeführt. Hierfür wurden ca. 10 cm lange Nabelschnurvenen in sterilen Plastikschalen mit sterilen Mullkompressen gesäubert und anschließend mit PBS (+/+) gespült, bis der Durchfluss fast klar war. Die Nabelschnurvenen wurden mit 2 ml Collagenase A, welches zuvor auf 37°C erwärmt wurde durchgespült. Nach der Spülung wurde ein Ende der Nabelschnurvene mit einer Klemme verschlossen und 10 ml auf 37°C vorgewärmte Collagenase A Lösung in die Vene gefüllt. Nach 10 min Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde die Nabelschnur über einem 50 ml Reaktionsröhrchen eröffnet und die Collagenase A und die darin enthaltene Zellsuspension in das 50 ml Reaktionsröhrchen ausmassiert. Anschließend wurden 5 ml 10% FBS-Medium hinzugegeben und bei 300 g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit den darin enthaltenden Endothelzellen wurde in 6 ml HUVEC-Medium gelöst und in Zellkulturflaschen überführt. Die Zellkulturflaschen wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS (+/+) gewaschen und frisches HUVEC-Medium + 10% FBS hinzugegeben und für weitere 2 Tage im Brutschrank inkubiert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen 2 Mal mit PBS (-/-) gewaschen und mit 4 ml Trypsin nach 2 min Inkubation vom Zellkulturflaschenboden durch Klopfen gelöst. Mit 16 ml DMEM-Medium wurde die Lösungsreaktion abgestoppt. Daraufhin wurde mit der Neubauer Zählkammer gezählt wie viel Zellen sich in 1 ml befinden. Um die Endothelzellen zu konservieren wurden 1×10^6 Zellen in 1 ml Freezing Medium resuspendiert und für einen Tag in Kryoröhrchen bei -80°C gelagert und anschließend im Stickstofftank konserviert. Diese Zellen wurden ab Passage 4 in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff dauerhaft aufbewahrt. Für Versuche wurden einzelne Zellaliquots mit HUVECs der Passage 4 bis 7 verwendet. Charakterisiert wurden die Endothelzellen mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie oder FACS-Analyse (fluorescent activated cell sorting). Dabei handelt es sich um ein Messverfahren, das die Analyse der Zellen anhand von bestimmten Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht. Dazu wurden Antikörper eingesetzt, die an spezifische Oberflächenmoleküle der Endothelzellen binden und mit unterschiedlichen Fluorochrommolekülen gekoppelt sind. Als Antikörper wurden CD31 und CD144 verwendet. CD31 ist ein sensitiver und spezifischer Marker für endotheliale Zellen, CD144 ist ein endothelspezifisches Cadherin, welches sich an interzellulären Verbindungen befindet und zusätzlich endotheliale Stammzellen detektiert.

Bronchialepithelzellen

BEAS-2B Zellen sind immortalisierte humane Bronchialepithelzellen, die aus menschlichem Lungengewebe isoliert wurden. Diese wurden von American Type Culture Collection aus den USA bestellt und in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Da es sich um immortalisierte Zellen handelt, konnten die Versuche passagenzahlunabhängig durchgeführt werden. Der Phänotyp der Zellen verändert sich auch nach zahlreichen Passagen nicht.

Zellkultur

Die in Stickstoff eingefrorenen Kryoröhrchen mit den darin enthaltenen HUVECs 1×10^6 Zellen pro ml wurden ab Passage 4 im Wasserbad bei 37°C angetaut und steril unter der Zellkulturbank in ein 50 ml Reaktionsröhrchen mit 9 ml 4°C warmen DMEM überführt. Danach wurde das 50 ml Reaktionsröhrchen 5 min bei 500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet in 10 ml 37°C warmen HUVEC-Medium mit 10 % FBS suspendiert. Als nächstes wurde die Zellsuspension in eine T75-Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 für 3 Tage kultiviert.

Zellen splitten

Bei einer Konfluenz von über 80 % wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden die adhärennten Zellen zunächst zwei Mal mit PBS (-/-) gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Trypsin auf die Zellen gegeben und diese 2 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Trypsin ist ein Enzym, welches die adhärennten Zellen vom Flaschenboden löst. Nach 2 min erfolgte die Beendigung dieser enzymatischen Reaktion mit 8 ml DMEM mit 10% FBS. Die gesamten 10 ml der Zellsuspension wurden in ein 50 ml Reaktionsröhrchen überführt und bei 500 g für 5 min zentrifugiert. Durch Dekantieren wurde das entstandene Zellpelett vom Überstand getrennt und in 10 ml frischem HUVEC-Medium mit 10 % FBS resuspendiert.

Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Anzahl der Zellen in der Zellsuspension wurden 20 μl Zellsuspension mit 20 μl Trypanblau vermischt und davon 20 μl Lösung auf die Neubauer Zählkammer aufgetragen. Bei 100-facher Vergrößerung wurden die lebenden Zellen in 4 Quadranten gezählt und daraus das arithmetische Mittel bestimmt. Nach folgender Formel konnte nun die Zellzahl in einem ml berechnet werden:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \left(\frac{\text{Summe der 4 Quadranten}}{4} \right) * 2 * 1 * 10^4$$

Durch Verdünnen der Zellsuspension wurden die unterschiedlichen Konzentrationen für verschiedene Versuchsgefäße hergestellt.

Zellkonzentrationen		
Gefäß	Zellzahl	Volumen
6 cm Zellkulturplatten für Proteinisolation	4×10^5 Zellen	3 ml
6 cm Zellkulturplatten für Transfektion (Protein)	$2,25 \times 10^5$ Zellen	3 ml
12 Well Platte für Transfektion (RNA)	4×10^4 Zellen	1 ml
Culture Slide für Immunozytologie	1×10^5 Zellen	1 ml
Transwellfilter 0,4 μ m Pore Size für Permeabilitätstranswell	3×10^5 Zellen	100 μ l
Transwellfilter 5 μ m Pore Size für Transmigrationstranswell	$1,5 \times 10^5$ Zellen	100 μ l

Tabelle 17 Zellkonzentrationen für unterschiedliche Reaktionsgefäße

Zellstimulation

Um die Auswirkung verschiedener Substanzen auf die Endothelzellen zu testen, wurden diese zunächst in der oben angegebenen Konzentration in ein Reaktionsgefäß überführt und nach einmaligem Waschen mit PBS (-/-) am nächsten Tag mit der zu testenden Substanz stimuliert. Hierfür wurde die Menge der Stimulationssubstanz für das jeweilige Reaktionsgefäß (siehe Tabelle 4.1) berechnet und mit HUVEC-Medium mit 1 % FBS vermischt. Die Zellen wurden täglich mit PBS (-/-) gewaschen und neues HUVEC-Medium mit 1% FBS und die zu stimulierende Substanz in die Reaktionsgefäße gegeben. Die Dauer und die Konzentration der Substanz mit der stimuliert werden sollte, waren versuchsabhängig und werden in den einzelnen Versuchen genauer beschrieben. Als Negativkontrolle wurden die Reaktionsgefäße genommen, die nicht stimulierte Endothelzellen enthielten, bei denen nur das HUVEC-medium mit 1% FBS täglich gewechselt wurde. Als Positivkontrolle fungierte die Stimulation mit der reizenden Substanz TNF- α , die in einer Konzentration von 20 ng/ml in die jeweiligen Reaktionsgefäße mit HUVEC-medium mit 1% FBS gegeben wurde.

Zellstimulationen		
Zellen	Stimulanz	Konzentrationen
Bronchialepithelzellen (BEA-2B)	Bleomycin	5 ng/ml, 10 ng/ml 50 ng/ml

Endothelzellen (HUVECs)	BMP2	100 ng/ml
	BMP4	10 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng /ml, 1000 ng/ml
	BMP7	100 ng/ml
	BMP9	10 ng/mg, 50 ng/ml, 100 ng/ml,
	Gremlin	100 ng/ml
	Noggin	100 ng/ml
	TSG	100 ng/ml
	BMPER	100 ng/ml
	LDN	800 ng/ml

Tabelle 18 Zellstimulationen

4.2 Proteinisolation

Die zuvor auf 6 cm Zellkulturplatten ausgesäten und über drei Tage mit unterschiedlichen Substanzen stimulierten Zellen wurden zunächst mit PBS (+/+) zwei Mal gewaschen und anschließend mit 60 µl Radioimmunoprecipitations assay buffer mit Sodiumdodecylsulfat (RIPA-Puffer + SDS) und einem Protease Inhibitor (Im Verhältnis 1:50) gleichmäßig benetzt. Nach 10 min Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen mit Hilfe eines Spatels vom Boden der Zellkulturplatte gelöst und anschließend mechanisch lysiert, durch wiederholtes auf und ab Pipettieren der Flüssigkeit vom Boden der Zellkulturplatte. Die Suspension wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 4 °C und 10000 g für 10 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand, der die Proteine enthält, konnte nun bei -20 °C aufbewahrt werden.

4.3 Bradford Assay

Der Bradford Assay ist eine Methode, um eine Proteinmenge photometrisch zu bestimmen. Für eine Messung wurden in eine Küvette 800 µl Wasser, 200 µl Bradford-Dye und 3 µl der zu messenden Proteinsuspension gegeben. Zur Kalibrierung wurde das Standardprotein BSA (Bovines Serum Albumin) verwendet. Um den Standard festzulegen, wurden 4 Küvetten mit unterschiedlichen Konzentrationen BSA befüllt (0, 2, 4, 10 µg/ml).

Die Extinktionsmessung der Proben erfolgte bei $\lambda=595$ nm. Der im Bradford-Dye enthaltene Trypenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau hat seine ungebundene, rote Form bei einem Absorptionsmaximum von $\lambda=470$ nm. Kommt es zu einer Komplexbildung durch Anlagerung von Proteinen, entsteht die blaue gebundene Form des Farbstoffes bei einem Absorptionsmaximum von $\lambda=595$ nm. Nach Proteinbindung in der Lösung entsteht eine Komplexbildung, die aufgrund ihres höheren Extinktionskoeffizienten bei 595 nm im Spektrometer gemessen werden kann. Demzufolge ist die Extinktion bei 595 nm ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung.

4.4 Western Blot

Als Western Blot bezeichnet man eine Methode, mit der verschiedene Proteine in Abhängigkeit von ihrer Größe mit Hilfe einer Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Die

Banden werden anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (geblottet) und dort durch Immundetektion sichtbar gemacht.

In die Taschen eines Western Blots wird immer die gleiche Proteinmenge gegeben. Je nach Western Blot betrug die eingesetzte Proteinmenge zwischen 25 ng und 45 ng.

Die Mischung für den Versuchsansatz einer Proteinprobe betrug:

Versuchsansatz für eine Proteinprobe (60 µl)	
Reagenz	Menge
Proteinprobe	X µl je nach Messung
RIPA-Puffer	50 µl – X
Loading-Dye	9,25 µl
Mercaptoethanol	0,75 µl

Tabelle 19 Versuchsansatz für eine Proteinprobe

6 x Loading-Dye	
Reagenz	Menge
0,5 M TRIS-HCL, PH 6,8	1,3 ml
Bromphenolblau 0,5 %	0,6 ml
Glycerol 100 %	2,4 ml
SDS 10 %	2,4 ml
Wasser	1,5 ml

Tabelle 20 6xLoading-Dye

Das Gemisch von Reagenzien wurde für 5 min bei 95 °C erwärmt. Dabei kam es zur Denaturierung der Proteine durch Hitze, SDS und Mercaptoethanol.

Die verwendeten Gele wurden selbst hergestellt und bestanden aus einem Trenngel mit einem Acrylamid-Anteil von 12 % und einem Sammelgel. Im unausgehärteten Zustand wurden durch das Einlegen von Kämmen Probetaschen geschaffen. Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen. Nach dessen Polymerisation erfolgte das Gießen des Sammelgels auf das ausgehärtete Trenngel. Die Proteine wurden im Sammelgel konzentriert und anschließend im Trenngel entsprechend Ihrer Ladung und molekularen Masse getrennt.

Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden die verfestigten Gele, die sich zwischen zwei Glasplatten befanden, mit Hilfe eines Halteapparates in ein mit Running-Puffer (1 x) befülltes Gefäß überführt. Die Proteinproben wurden in die vorgefertigten Taschen im Sammelgel gefüllt. In die erste Tasche des Gels wurden 7 µl eines Proteinmarkers gegeben, um die verschiedenen Proteine später entsprechend ihrer kDa Höhe unterscheiden zu können.

Nun wurde eine Spannung mit dem Gerät Power PAC 3000 angelegt und diese langsam auf 150 V erhöht. Die Laufzeit betrug abhängig von der Größe der zu untersuchenden Proteine zwischen 1,5 h und 2,5 h. Die Spannung bewirkt eine Migration der negativ

geladenen Proteinanteile durch das Gel zum Pluspol. Dabei ist die Laufgeschwindigkeit abhängig von der Proteingröße, da kleinere Proteine schneller durch das Gel wandern. Im Anschluss an die Acrylamidgelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteinbanden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (geblottet). Dies erfolgte im Transfer-Puffer für 1 h bei 100 V. Die sich auf der Nitrocellulosemembran noch befindlichen Bindungsstellen für Proteine wurden durch das anschließende Legen der Membran in 3 % Magermilchpulver mit TBST blockiert.

Immundetektion

Die Detektion der auf der Nitrocellulosemembran vorhandenen Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern, die nur ein entsprechendes Zielprotein binden.

Zur Erkennung des Erstantikörpers wird ein Zweitantikörper verwendet, der an diesen bindet und an das Enzym Meerrettichperoxidase (hRP) gekoppelt ist. Die hRP katalysiert in Gegenwart von Wasserstoffperoxyd die Oxidation von Luminol. Es entsteht eine detektierbare Chemilumineszenz-Reaktion. Die Banden wurden je nach Intensität bei einer Belichtungszeit von 1-30 min sichtbar gemacht. Die Quantifizierung der Banden, erfolgte durch Ausmessen ihrer Intensität im Vergleich zur Ladekontrolle mittels Quantity One (Bio-Rad) des Programmes Image Lab 4.0.

Die praktische Durchführung der Immundetektion erfolgte, indem die Membran über Nacht bei 4 °C in den Primärantikörper (gelöst in 10 ml 3 % Magermilchlösung) eingelegt wurde. Am nächsten Tag wurde die Membran nach dreimaligem Waschen in TBST für etwa 2 h bei Raumtemperatur in den Sekundärantikörper eingelegt. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet um zu überprüfen, ob die einzelnen Banden gleichmäßig beladen wurden.

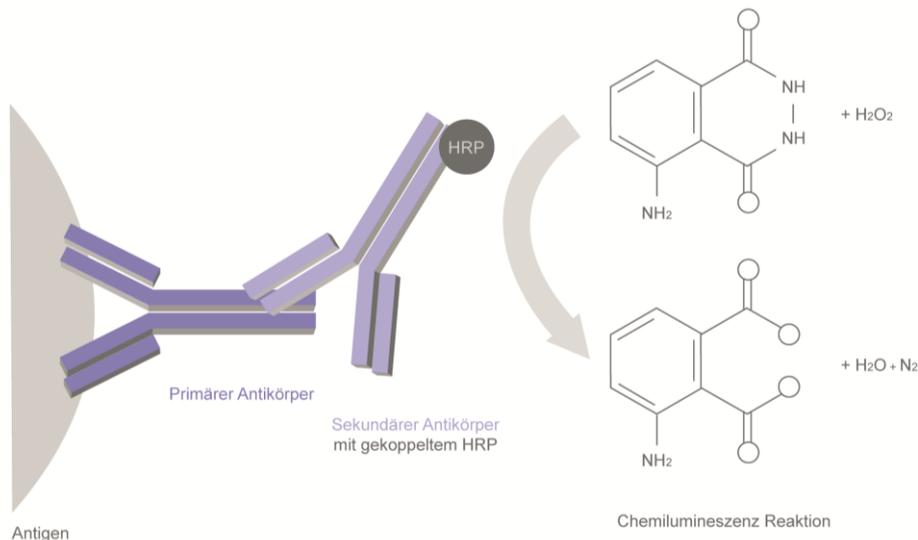


Abbildung 4.1 Immundetektion⁶² (Reiners J, 2004, modifiziert)

Der primäre Antikörper bindet an sein Zielprotein (Antigen). Ein Zweitantikörper, welcher an hRP gekoppelt ist, wird zur Erkennung des Erstantikörpers hinzugegeben. Das darin enthaltene Luminol wird mit Hilfe von hRP oxidiert und somit detektierbar gemacht.

4.5 Transfektion mittels SiRNA

Eine SiRNA Transfektion ist eine molekulargenetische Methode, um bestimmte Gensequenzen einzudämmen und somit einen knock down dieser Gensequenzen zu erzielen. SiRNA bedeutet smal interfering RNA. Die SiRNA entsteht aus dem Prä-mRNA Doppelstrang unter Bildung des RISC (RNA induced silencing komplex). Im RISC wird ein Strang der SiRNA abgespalten, welcher sich anschließend an die mRNA anlagern kann. Die einsträngigen SiRNA-RISC-Komplexe haben eine Länge von 21-28 Nukleotiden und kodieren sich an eine bestimmte Stelle der mRNA, so dass ein spezielles Protein nicht mehr entstehen kann.

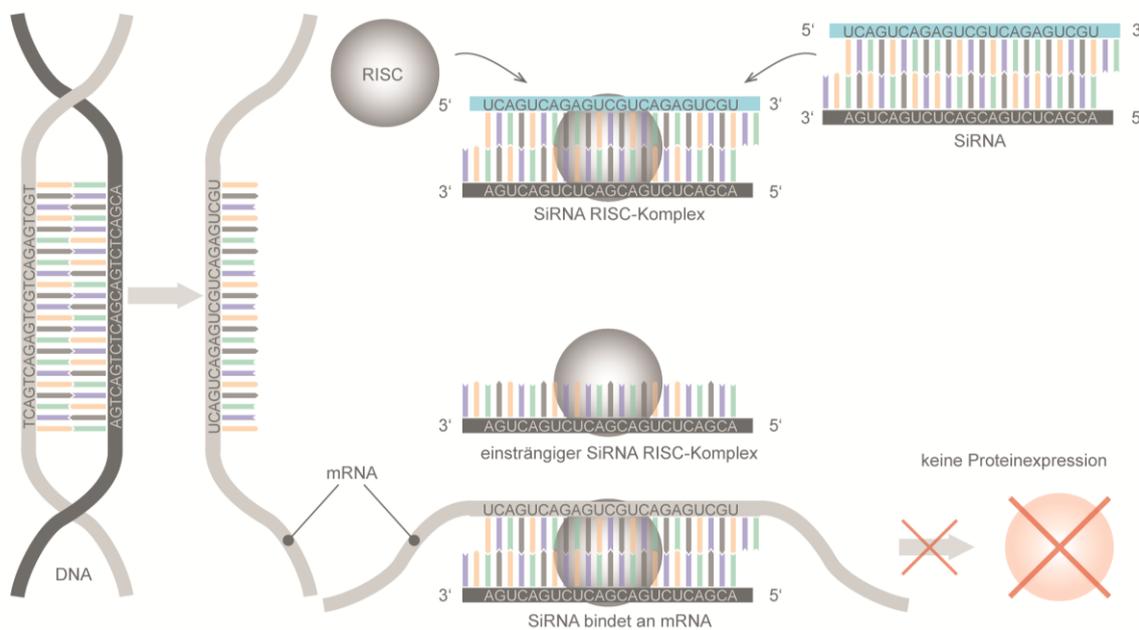


Abbildung 4.2 Veranschaulichung einer Transfektion⁶³ (Omid Y, 2013, modifiziert)

In den aufgeführten Versuchen wurden HUVECs mit SiRNA I für BMP4 transfiziert. Als Erfolgskontrolle wurde eine mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488nm markierte Kontroll-SiRNA verwendet. Dadurch sollte gezeigt werden, dass die Expression des Zielgenes tatsächlich unterdrückt wird und diese Expressionsunterdrückung nur spezifisch das Zielprotein betrifft. Erfolgreich transfizierte Zellen konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop angeregt werden und fluoreszierten bei 495 nm grün.

Für die Transfektion wurden HUVECs in 6 cm Zellkulturplatten ausgesät. Sobald die HUVECs eine Konfluenz von 60-70 % erreicht hatten, erfolgte das zweimalige Waschen der Zellen mit PBS (-/-). Danach wurden die Zellen für 2 h auf 2,5 ml endotheliales Basalmedium (EBM) ohne Wachstumsfaktoren mit 1 % FBS gesetzt. Das endotheliale Basalmedium fungiert als eine Art Hungermedium, damit die Zellen vor der Transfektion aufnahmebereit gemacht werden. Anschließend wurden zwei Ansätze für die Transfektion in Polystyrene-Röhrchen pipettiert. Ansatz 1 enthält Lipofectamine und wird verwendet um

die Transfektionseffizienz der SiRNA durch eine erhöhte Lipofektionsbereitschaft der Endothelzelle zu erhöhen. Ansatz 2 enthält die SiRNA, die durch Lipofektion in den Zellkern gelangen soll.

Ansatz 1 (500µl) für Proteine	
Reagenz	Menge
Lipofectamine	10 µl
Optimem	490 µl

Tabelle 21 Ansatz 1 für SiRNA Transfektion

Ansatz 2 (500µl) für Proteine	
Reagenz	Menge
Optimem	470 µl
SiRNA	30 µl

Tabelle 22 Ansatz 2 für SiRNA Transfektion

Diese Ansätze wurden zu gleichen Teilen gemischt und für 30 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert und danach vorsichtig auf die Zellen geträufelt. Nach 4-5 h wurde zusätzlich 3 ml HUVEC-Medium mit Wachstumsfaktoren und 30 % FBS dazugegeben. Nach 12 h fand ein Mediumwechsel auf 10 % HUVEC-Medium statt. Nach insgesamt 48 h wurden Proteine für einen Western Blot isoliert oder die Zellen in einen Transwell überführt.

4.6 Quantitative Real-Time PCR

Diese PCR Methode lässt mittels Fluoreszenz- Messung eine quantitative Aussage über die Expression von Zielgenen zu.

RNA Gewinnung aus HUVECs

Für die RNA Gewinnung aus HUVECs wurde das Aurum™ Total RNA Mini Kit (BioRad GmbH, München) verwendet. Alle Wasch- und Zentrifugationsschritte wurden nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dabei konnte aus den Zelllysaten der stimulierten oder transfizierten HUVECs die RNA isoliert und von anderen Verunreinigungen befreit werden. Die RNA-Konzentration wurde dann mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 spektrometrisch bestimmt. Die isolierte RNA kann bei - 80 °C aufbewahrt werden.

cDNA- Synthese

Für das Umschreiben der RNA in cDNA wurde das iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad GmbH, München) verwendet. In diesem Ansatz befanden sich die RNA, Reverse

Transkriptase und ein Puffer mit dNTPs. Die einsträngige RNA wurde bei 42 °C in doppelsträngige komplementäre cDNA umgeschrieben.

Die nun entstandene doppelsträngige DNA kann mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I, welcher an die DNA bindet, quantifiziert werden. Mit zunehmender Anzahl der zu untersuchenden doppelsträngigen DNA erhöht sich die Menge des gebundenen Farbstoffes und damit auch die Stärke der Fluoreszenz. Die Messung findet in der exponentiellen Phase am Ende der Elongation statt. Das bedeutet, dass jede Probe einen bestimmten Ct-Wert (Cycle Threshold) besitzt, bei dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Somit erhält man für jede einzelne Probe eine genaue Zykluszahl, welche dem Erreichen des Grenzwertes entspricht. Mithilfe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Formel konnten die einzelnen Proben analysiert werden unter Berücksichtigung der Kontrollproben. Als Kontrolle wurde das Referenzgen Horseradish Peroxidase (hRP II) verwendet.

$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Formel

$$\Delta\text{Ct (Probe)} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen}$$

$$\Delta\text{Ct (Kontrolle)} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct (Probe)} - \Delta\text{Ct (Kontrolle)}$$

$$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = \text{Expression des Zielgenes in der Probe}$$

Tabelle 23 Formelbezeichnung Ct-Formel

Da bei der Quantitativen Real-Time PCR nicht automatisch zwischen verschiedenen Produkten unterschieden wird, wurde eine Schmelzkurve angefertigt. Bei der jeweils spezifischen Schmelztemperatur spalten sich die zu untersuchenden doppelsträngigen Fragmente in ihre Einzelstränge auf. Dadurch wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green frei und es kommt zu einer Abnahme der Fluoreszenz. Die Temperatur wurde schrittweise von 55 °C auf 95 °C erhöht. Der Schmelzkurvenpeak gibt Auskunft über die entstandene Produktmenge.

Die einzelnen Versuchsansätze wurden wie folgt hergestellt:

Versuchsansatz: (Gesamtmenge von 25 μl)

Reagenz	Menge
SYBR-Green	12,5 μl
cDNA	2 μl
Forward-Primer	0,5 μl
Reverse-Primer	0,5 μl
Aqua a. i.	9,5 μl

Tabelle 24 Versuchsansatz für Realtime-PCR

Protokoll der Quantitativen Realtime-PCR			
Schritt	Temperatur °C	Dauer	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	95	5 min	1
Denaturierung	95	30 sec	50
Primerhybridisierung	50-65	30 sec	
Elongation	72	30-45 sec	
Terminale Elongation	72	5 min	1
Schmerzkurvenbeginn	55	1 min	1
Schmelzkurve (jeweils + 0,5 °C)	55-95	10 sec	80
Abkühlung	4	∞	1

Tabelle 25 Ablauf einer Realtime-PCR; Programmierung des iCycler

4.7 Anfärbung des Zytoskelettbestandteiles Aktin mit Phalloidin im Endothel

Phalloidin ist ein Toxin aus dem Knollenblätterpilz *Amanita phalloides*. An einer freien Bindungsstelle des bityklichen Heptapeptids des Phalloidins wird der rot fluoreszierende Farbstoff Tetramethylrodamin (TRITC) gebunden.

Die Phalloidinfärbung ist eine spezielle Färbemethode, um das Aktinzytoskelett der Zelle sichtbar zu machen. Dabei bindet Phalloidin an den Zytoskelettbestandteil Aktin mit einer hohen Affinität. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI, welches an die DNA des Zellkernes bindet und diesen blau färbt.

Hierzu wurden HUVECs in Culture Slides ausgesät und über 3 Tage täglich mit BMP2, BMP4, BMP7 und BMP9 100 ng/ml stimuliert. Hierfür wurde täglich das HUVEC-Medium mit 1% FBS gewechselt und die zu stimulierende Substanz dazugegeben. Als Positivkontrolle wurde mit TNF- α 20 ng/ml stimuliert, welches zu einer Zellschädigung des Endothels führt. Bei der Negativkontrolle wurde täglich das HUVEC-Medium mit 1% FBS gewechselt ohne stimulierende Zusätze. Anschließend wurden die Zellen mit PBS (-/-) gewaschen und in 4% Paraformaldehyd (4 g PFA in 100 ml PBS gelöst) nach 10 min Inkubation fixiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen über 5 min folgte unter lichtgeschützten Bedingungen nun die Färbereaktion mit einem Phalloidin-TRITC, welches 1:100 in 1% BSA gelöst wurde. Um die Zellkerne sichtbar zu machen, erfolgte nach 10 min Inkubation und weiteren Waschschritten eine DAPI-Färbung. DAPI wurde 1:30.000 in 1% BSA gelöst und anschließend 250 μ l für 15 min auf jedes Slide gegeben. Nach weiteren Waschschritten mit PBS und aqua dest. wurden die aufgesetzten Culture Slides vom Objektträger gelöst und der Objektträger mit Mowiol eingedeckt und anschließend mit einem Deckgläschen geschützt. Die Objektträger wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

4.8 Immunozytologische Färbung

Die Immunozytologie dient der Anfärbung bestimmter Proteine im Zellverband. Das gewünschte Epitop eines Zielproteins wird von einem Erstantikörper erkannt. Daraufhin wird ein zweiter Antikörper aufgetragen, welcher an den ersten bindet und an ein Fluorochrom gekoppelt ist. In der Fluoreszenzmikroskopie leuchtet das Fluorochrom und somit indirekt das daran gebundene Protein.

In Rahmen dieser Arbeit wurden HUVECs für immunozytologische Färbungen verwendet. Es wurde VE-Cadherin und PECAM1 angefärbt. Dazu wurden HUVECs in Culture Slides ausgesät und über 3 Tage einmal täglich mit BMP4 100 ng/ml oder BMP9 100 ng/ml in HUVEC-Medium mit 1% FBS stimuliert. Als Kontrolle dienten Endothelzellen in Culture Slides bei denen nur das HUVEC-Medium mit 1% FBS täglich gewechselt wurde. Für die Negativkontrolle wurden Culture Slides verwendet, welche ohne Zugabe des Erstantikörpers gefärbt wurden.

Nach mehrmaligem Waschen der HUVECs mit PBS (-/-) wurden diese für 10 min bei -20 °C in Aceton-Methanol fixiert. Zur Blockierung unspezifischer Rezeptoren erfolgte eine Inkubation im Serum der Tierspezies, aus welcher der Zweitantikörper stammte. Im Fall von VE-Cadherin war dies Goat-Anti-Rabbit. Die HUVECS wurden in 10 % Goat-Serum für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen über Nacht in den Erstantikörper (hier VE-Cadherin) 1:100 in 5 % Goat-Serum eingelegt. Am nächsten Tag erfolgte nach mehreren Waschschritten die Färbung mit dem Zweitantikörper, der an Fluorochrom gekoppelt ist (Goat-Anti-Rabbit Cy2). Zur Sichtbarmachung der Kerne diente DAPI, welches in einer Verdünnung von 1:30 000 in 1 % BSA zusätzlich zum Zweitantikörper mit auf die Zellen gegeben wurde. Nach 2 Stunden Inkubation und weiteren Waschungen mit PBS und aqua dest. wurde der Objektträger mit Mowiol eingedeckt und mit einem Deckgläschen geschützt.

4.9 Bestimmung der endothelialen Permeabilität *in vitro*

Ein Transwell dient dazu Permeabilität *in vitro* messbar zu machen. Gemessen wird, wie viel Farbstoff durch die mit Zellen beschichtete Membran des Transwells diffundieren kann. Ein Transwell besteht aus 12 Wells, die sich in ein oberes und ein unteres Kompartiment gliedern. Im oberen, herausnehmbaren Kompartiment ist eine Membran befestigt mit einer Porengröße von 0,4 µm.

Die Transwellfilter wurden zunächst unter der Zellkulturbank mit Fibronectin beschichtet, dazu wurden 7 µl Fibronectin mit 1 ml PBS (+/+) vermischt und von dieser Mischung 50 µl auf jeden Filter gegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Fibronectin-Mischung vorsichtig mit der Pipette abgenommen und verworfen. Jeder Transwellfilter wurde danach mit 100 µl HUVEC-Medium gewaschen. Anschließend wurde eine konfluente Schicht HUVECs a 30×10^4 Zellen/ml in 100 µl HUVEC-Medium mit 10% FBS auf die Membran gesät. In die unteren Kompartimente kamen jeweils 600 µl HUVEC-Medium mit 10 % FBS. Die Zellen konnten über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ anwachsen.

Danach erfolgte die Stimulation der Endothelzellen über 72 h. Hierfür wurde täglich das HUVEC-Medium im oberen und unteren Kompartiment gewechselt und die Substanz, mit der stimuliert werden sollte, wurde täglich frisch angesetzt und hinzugegeben. Als Negativkontrolle fungierten unbehandelte HUVECs, als Positivkontrolle HUVECs, die TNF- α 20 ng/ml ausgesetzt wurden.

Um nun die Auswirkung der Stimulationsreagenzien auf die endotheliale Permeabilität zu messen, wurde nach 72 h der fluoreszierende Farbstoff FITC-Dextran (5 μ l pro Filter) auf das obere Kompartiment gegeben und die Menge, die durch die Endothelzellschicht diffundieren konnte, im unteren Kompartiment gemessen.

Nach zweistündiger Inkubation des Farbstoffes wurde die Migration gestoppt. 50 μ l aus dem unteren Transwell-Kompartiment wurden in eine 96-Lochplatte mit jeweils 150 μ l PBS pipettiert. Anschließend erfolgte die Messung im Spektrometer bei 485 nm.

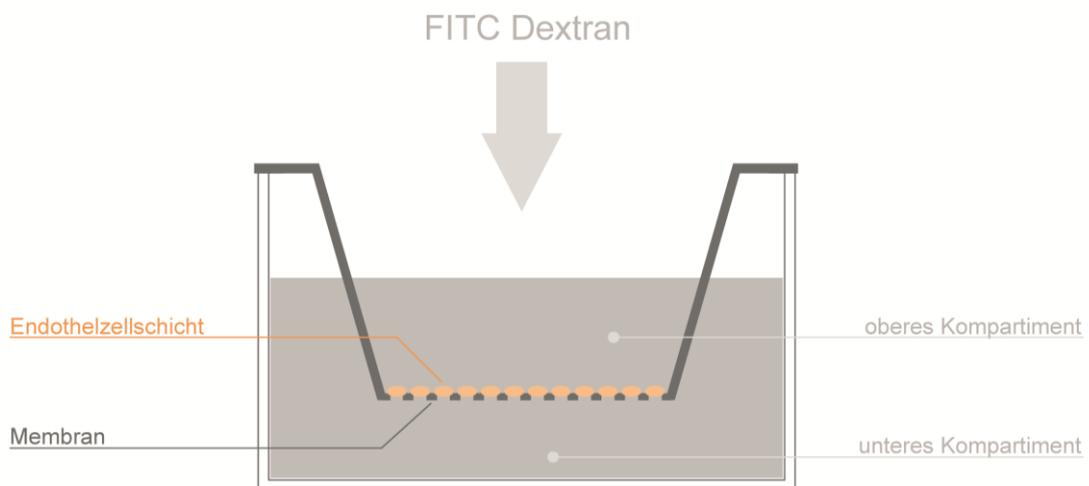


Abbildung 4.3 Veranschaulichung eines Transwells zur Bestimmung der Permeabilität

Ein „Transwell“ gliedert sich in ein oberes und ein unteres Kompartiment. Im oberen Kompartiment befindet sich eine Membran, auf die eine Schicht Endothelzellen ausgesät wurde. Zur Permeabilitätsmessung wurde der fluoreszierende Farbstoff FITC-Dextran auf das obere Kompartiment gegeben und nach 2 h Inkubationszeit die Menge des Farbstoffes im unteren Kompartiment gemessen, die durch die Zellschicht diffundieren konnte.

4.10 Quantifizierung der endothelialen Transmigration von PBMCs *in vitro*

Dieser Versuch im Transwellsystem diente der Messung transmigrierter peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) durch Filter einer Porengröße von 5 μ m, auf die zuvor eine Endothelzellschicht ausgesät wurde. Bei PBMCs handelt es sich um einkernige Zellen des Blutes, die eine wichtige Rolle im Immunsystem bei der Bekämpfung von Infektionen spielen, wie zum Beispiel Leukozyten und Monozyten. PBMCs wurden zuvor durch ein hydrophiles Kolloid aufgereinigt und werden häufig in der Forschung als Indikator verwendet. Mit Hilfe eines Transwells sollte gezeigt werden, ob eine Endothelzellschicht nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen mehr oder weniger PBMCs transmigrieren lässt. Hierfür wurden Transwellfilter wie oben beschrieben mit Fibronectin beschichtet und

pro Filter eine Schicht HUVECs $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml in 100 μ l HUVEC-Medium mit 10 % FBS ausgesät. Die Endothelzellen auf den Transwellfiltern konnten nun über drei Tage täglich mit Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) 100 ng/ml und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) 20 ng/ml in unterschiedlichen Kombinationen stimuliert werden. Nach 72 h wurden PBMCs 5×10^5 Zellen pro Filter in das obere Kompartiment gegeben. Als Lockstoff im unteren Kompartiment dienten 3 μ l pro Transwell monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1). Die PBMCs hatten nun 2 h Zeit durch die Endothelzellschicht in das untere Kompartiment zu transmigrieren. Nach 2 h wurde die Flüssigkeit im unteren Kompartiment entnommen, zentrifugiert und das Zellpellett, welches die PBMCs enthielt, mit 20 μ l Trypanblau angefärbt und gelöst. Anschließend erfolgte die Zählung der transmigrierten PBMCs in der Neubauer-Zählkammer.

4.11 Analyse der endothelialen und epithelialen Permeabilität *in vivo* nach Bleomycin induzierter Lungenschädigung

Als etabliertes Lungenschädigungsmodell wurde ein *in vivo* Versuch gewählt, in dem Mäuse mit Bleomycin behandelt wurden, um die Auswirkung nach einer Gewebsschädigung auf die endotheliale und epitheliale Permeabilität zu untersuchen.

Bleomycin ist eine antineoplastisch, zytostatisch wirksame Substanz, die aus Aktinomyceten isoliert wird. Bleomycin bildet Komplexe mit Sauerstoff und Metallen und führt zur Produktion von Sauerstoffradikalen, DNA-Brüchen und letztendlich zum Zelltod. Eine einmalige Gabe von 45 μ g Bleomycin pro g Körpergewicht der Maus reicht aus, um eine endotheliale Lungenschädigung auszulösen.⁶⁴

Pro Versuch wurden 10 männlichen 8 Wochen alten C57BL/6 Mäusen (Wildtyp) einmalig unter einer kurzzeitigen Isoflurannarkose Bleomycin intratracheal in einer Konzentration von 4 U/kg verabreicht. Die Kontrollgruppe bekam das gleiche Flüssigkeitsvolumen ohne Bleomycin in Form von NaCl intratracheal verabreicht. Nach täglicher Prüfung des Gesundheitszustandes der Mäuse erfolgte nach drei Tagen Inkubationszeit die OP.

Für eine Allgemeinanästhesie wurden die Mäuse mit Ketamin und Xylazin in Narkose gelegt. Die Verabreichung des Farbstoffes Evans Blue (EVB, 45 μ g/g gelöst in 200 μ l PBS) erfolgte in die Schwanzvene. Unter ständiger Beobachtung der Narkosetiefe anhand des Rückzugreflexes oder bei spontanen und gezielten Bewegungen wurde bei Bedarf die Narkose intraperitoneal nachdosiert. Dabei lagen die Mäuse für 3 h auf einer Wärmematte, damit der Farbstoff sich im Kreislauf verteilen konnte.

Um die bronchoalveoläre Lavage (BAL) zu gewinnen, wurde das Spatium colli bis zur Trachea freipräpariert. Unterhalb des Kehlkopfes wurde durch einen kleinen Schnitt die Trachea eröffnet, ein Tubus in die Trachea gelegt und mit Hilfe eines Fadens fixiert. Die Gewinnung der BAL erfolgte durch mehrmaliges Aspirieren eines Milliliters PBS durch den Tubus. Als nächster Schritt erfolgte die Eröffnung des Thorax, um das Gefäßsystem durch eine intrakardiale Infusion mit 500 μ l NaCl nach Schnitt in den rechten Ventrikel durchzuspülen. Danach konnten die Organe Herz, Lunge und Nieren entnommen werden. Diese wurden anschließend getrennt für 18 h bei 70 °C und 500 rpm in 1 ml Formamide

gelöst. Formamide ist das Amid der Ameisensäure und sorgt dafür, dass sich die Organe auflösen und der blaue Farbstoff in die Flüssigkeit übertreten kann.

Die Konzentration des Farbstoffes Evans Blue, der in die Organe und in die BAL diffundieren konnte, wurde photometrisch bei einer OD von 620 nm bestimmt. Zusätzlich wurde die Zellzahl in der BAL ermittelt, indem diese zentrifugiert wurde und das entstandene Zellpellet mit 20 µl Trypanblau gelöst wurde. Die nun blau gefärbten Zellen konnten in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt werden.

4.12 Einfluss von BMP4 auf die endotheliale Permeabilität *in vivo*

Bedingungen ohne inflammatorische Stimulation

Dieses Experiment wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit konzipiert, um damit den Einfluss von BMP4 im Tiermodell auf die endotheliale Permeabilität zu überprüfen.

Hierfür wurden 13 Wochen alten männlichen C57BL/6 Mäusen über drei Tage täglich morgens und abends 1 µg BMP4 intraperitoneal injiziert. Das rekombinante murine BMP4 wurde zuvor in einem Lösungspuffer bestehend aus 4 mM HCL+ 0,1 % BSA gelöst. Die Kontrollmausgruppe bekam das gleiche Flüssigkeitsvolumen Lösungspuffer injiziert. Nach drei Tagen wurden die Mäuse mit Ketamin und Xylazin in Narkose gelegt und auf einem OP-Tisch fixiert. Darauf erfolgte die intravenöse Injektion des blauen Farbstoffs EVB (45 µg/g gelöst in 200 µl PBS) in die Schwanzvene. Nach einer Stunde Narkose wurde den Mäusen 6 ml RPMI-Medium intraperitoneal injiziert. Nach zweiminütiger Massage des Bauches, um die Flüssigkeit gleichmäßig zu verteilen, wurde die Peritoneallavage entnommen. Anschließend erfolgte die Eröffnung des Thorax. Durch einen Schnitt in den rechten Herzventrikel wurde das Gefäßsystem mit Hilfe einer kardialen NaCl Infusion durchgespült, um die Messergebnisse nicht durch noch nicht ins Gewebe diffundierten intravaskulären Farbstoff zu verfälschen. Daraufhin wurden Herz, Lunge und Nieren entnommen.

Die Organe wurden 18 h bei 70 °C und 500 rpm in Formamide gelöst. Anschließend wurde der Farbstoff, der in die Organe diffundieren konnte, bei einer OD von 620 nm gemessen. Auch der in die Peritoneallavage diffundierte Farbstoff wurde photometrisch ermittelt und mit den Kontrollmäusen, die nicht mit BMP4 behandelt wurden, verglichen.

Inflammatorische Bedingungen

Dieser Versuch wurde im Rahmen der experimentellen Arbeiten etabliert, um im Tiermodell Daten zu gewinnen, die eine Aussage darüber treffen lassen, ob BMP4 die Transmigration von Leukozyten durch das Endothel beeinflusst.

Es wurden 10 Tiere als Kontrollgruppe, die keiner Inflammation ausgesetzt wurden, mit 10 Tieren einer Gruppe unter inflammatorischen Bedingungen verglichen. Um eine sterile, lokale Inflammation zu verursachen, erfolgte 72 h vor der OP die intraperitoneale Verabreichung von 2 ml Thioglycolatlösung (4 g Thioglycolate in 100 ml PBS gelöst). Thioglycolate ist das Salz der Mercaptoessigsäure und verursacht intraperitoneal injiziert

eine lokale Reizung. Die Tiere der Kontrollgruppe bekamen das gleiche Flüssigkeitsvolumen in Form des Lösungsmittels injiziert. Jeweils 5 Tieren der Gruppe der Tiere unter inflammatorischen und der Tiere unter basalen Bedingungen wurde über 72 h täglich morgens und abends 1 µg BMP4 injiziert. Um eventuelle Schmerzen zu minimieren, wurde den Mäusen täglich Temgesic 0,05- 0,1 mg/kg, gelöst in 200 µl NaCl, subkutan verabreicht. Temgesic enthält Buprenorphin als Wirkstoff, ein Schmerzmittel aus der Gruppe der partiellen Opioidantagonisten und wirkt somit nicht entzündungshemmend. Nach 72 h wurden die Mäuse mit Ketamin und Xylazin für 1h in Narkose gelegt. Unter ständiger Beobachtung der Narkose wurde bei Bedarf das Narkosemittel nachdosiert. In die Schwanzvene erfolgte die Injektion des blauen Farbstoffes EVB (45 µg/g gelöst in 200 µl PBS). Um die Aszitesflüssigkeit entnehmen zu können, wurde den Mäusen 6 ml RPMI-Medium nach 1 h Narkose intraperitoneal injiziert und nach zweiminütiger Massage des Bauches entnommen. Anschließend wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet und ihnen unmittelbar danach intrakardial Blut entnommen. Das Blut wurde ins Labor der Inneren Medizin am Universitätsklinikum Freiburg gebracht und von Laboranten auf dessen Leukozytengehalt untersucht. Die in der Aszites-Flüssigkeit enthaltenen Leukozyten wurden mit Hilfe der Neubauer Zählkammer gezählt.

4.13 Statistische Analysen

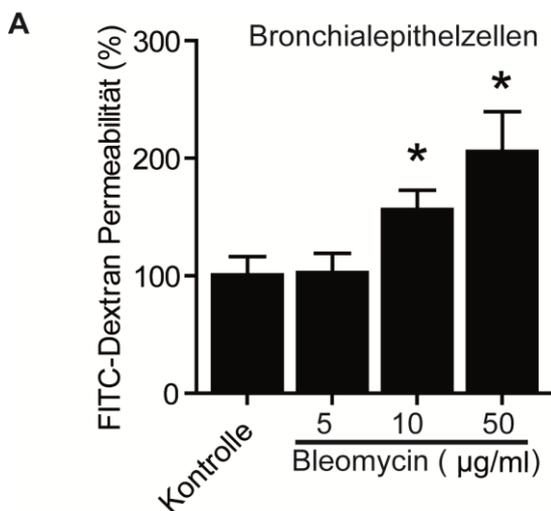
Statistische Analysen wurden mit dem Programm Graphpad Prism 4.0 selbstständig durchgeführt.

Die Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Daten sind dargestellt als Mittelwert der Standardabweichung (+/- SEM). Vergleiche zur Kontrolle wurden mit dem ungepaarten, studentischen T-Test durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als signifikant (*) gekennzeichnet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % lag (*p <= 0,05). Western Blots wurden ausgewertet mit der Quantity One 1-D Analysis Software (v4.4, BioRad).

5 Ergebnisse

5.1 Epitheliale und endotheliale Permeabilität nach Gabe von Bleomycin *in vitro* und *in vivo*

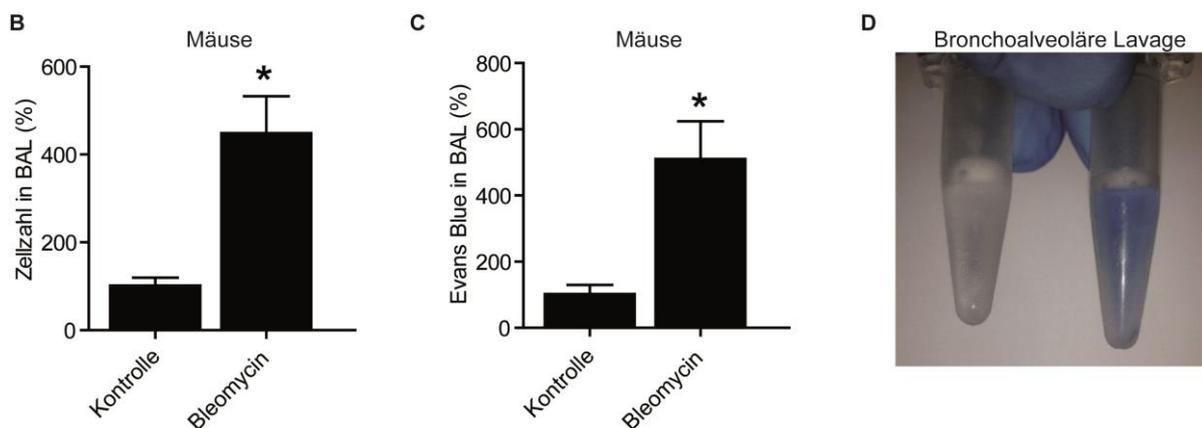
Um die epitheliale oder endotheliale Permeabilität *in vitro* messen zu können, wurde der Versuchsaufbau eines Transwells gewählt. Die übergetretene Menge des Indikators FITC-Dextran wurde nach Schädigung der Zellschicht gemessen. Die Schädigung erfolgte durch Bleomycin. Hierfür wurde eine konfluente Schicht humaner bronchialer Epithelzellen (BEAS-2B) auf die Membran der Transwellfilter gesät und anschließend mit aufsteigenden Bleomycin Konzentrationen stimuliert. Daraufhin wurde der fluoreszierende Farbstoff FITC-Dextran auf das obere Kompartiment aufgebracht und gemessen, wie viel FITC-Dextran durch die Epithelzellen diffundieren konnte. Die unbehandelte Kontrollgruppe Bronchialepithelzellen wurde auf 100 % gesetzt ($100,0 \pm 16,41 \%$, $n=3$) und mit der Gruppe der Bronchialepithelzellen verglichen, die mit einer aufsteigenden Bleomycin Konzentrationsreihe stimuliert wurden. Die Stimulation mit $5 \mu\text{g/ml}$ Bleomycin führt lediglich zu einem Anstieg von ($102,24 \pm 23,66 \%$) verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe. Erst ab einem Konzentrationsanstieg von $10 \mu\text{g/ml}$ Bleomycin konnten signifikante Ergebnisse erzielt werden, so führt die Stimulation mit $10 \mu\text{g/ml}$ Bleomycin zu einem Anstieg von ($155,6 \pm 17,37 \%$) und mit $50 \mu\text{g/ml}$ Bleomycin zu einem Anstieg von ($205,2 \pm 34,51 \%$). Somit konnte bewiesen werden, dass Bleomycin die epitheliale Barrierefunktion reduziert und konzentrationsabhängig die Permeabilität des Epithels steigert (siehe Ergebnis 5.1 (A)).



Ergebnis 5.1-A

(A) Humane Bronchialepithelzellen wurden auf Transwellfilter ausgesät (3×10^5 Zellen/Filter; $100 \mu\text{l}$) und über 72 h mit aufsteigenden Bleomycin Konzentrationen ($5, 10, 50 \mu\text{g/ml}$) stimuliert. Anschließend wurde FITC-Dextran auf die Filter gegeben und nach 2 h die diffundierte Farbstoffmenge bei einer OD von 485 nm im Spektrometer gemessen ($n=3$). Der dargestellte Graph zeigt, dass ab einer Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ Bleomycin die FITC-Dextran Durchlässigkeit signifikant zunimmt ($*p < 0,05$ vs. Kontrolle, Mittelwert \pm SEM).

Um diese *in vitro* Ergebnisse *in vivo* zu bestätigen, wurden C57BL/6 Mäusen einmalig Bleomycin intratracheal verabreicht. Als Permeabilitätsindikator diente in diesem Fall der blaue Farbstoff Evans Blue (EVB). Nach Zirkulation des Farbstoffes im Kreislauf konnte die bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnen werden. Verglichen wurden die mit Bleomycin behandelten Mäuse mit einer Gruppe von Mäusen, die NaCl intratracheal verabreicht bekommen haben. Die Kontrollgruppe wurde auf 100 % gesetzt ($100,0 \pm 19,51 \%$, $n=6$). Nach Induktion einer Lungenschädigung durch Bleomycin kam es zu einer signifikant vermehrten Transmigration von Leukozyten ($447,2 \pm 85,47 \%$, $n=5$) und einer signifikant erhöhten Diffusion des Farbstoffes Evans Blue in die bronchoalveoläre Lavage ($508,6 \pm 115,9 \%$, $n=5$), (siehe Ergebnis 5.1 (B, C)). Der Übertritt von Evans Blue in die bronchoalveoläre Lavage wurde noch einmal farblich dargestellt (siehe Ergebnis 5.1 (D)).

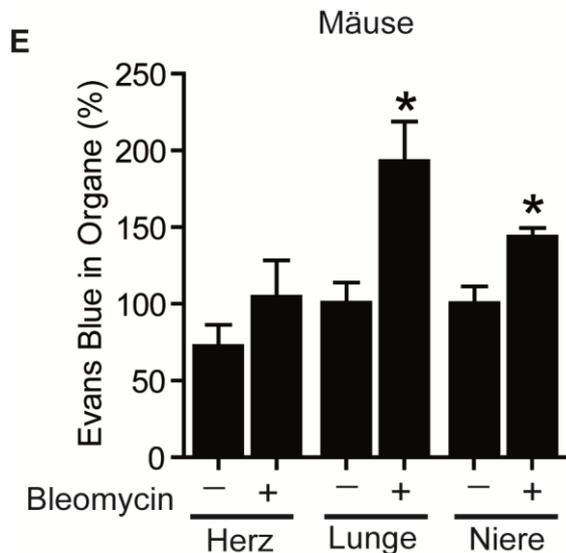


Ergebnis 5.1-B, 5.1-C und 5.1-D

- (B) 5 männlichen C57BL/6 Mäusen wurden Bleomycin intratracheal verabreicht (4 U/kg; 60 ml). Nach 72 h wurde den Mäusen der Farbstoff Evans Blue (45 µg/g) in die V. femoralis injiziert. Nach weiteren 3 h wurde die bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnen und die darin enthaltene Zellzahl mit der Kontrollgruppe $n=6$ verglichen. Bleomycin steigert die Durchlässigkeit der Zellen in die BAL signifikant ($*p < 0,05$ vs. Kontrolle, Mittelwert \pm SEM).
- (C) In der BAL wurde zusätzlich die diffundierte Menge des blauen Farbstoffes Evans Blue (EVB) photometrisch bei einer OD von 620 nm gemessen. Nach Bleomycin Behandlung konnte signifikant mehr Evans Blue in die bronchoalveoläre Lavage diffundieren ($*p < 0,05$ vs. Kontrolle, Mittelwert \pm SEM).
- (D) Diese Abbildung zeigt links die BAL einer Kontrollmaus. Rechts ist die BAL einer mit Bleomycin behandelten Maus zu sehen. Beiden Mäusen wurden 3 h vor der Entnahme der BAL Evans Blue injiziert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die epitheliale Permeabilität durch die Zellschädigung des Lungengewebes mit Bleomycin erhöht wurde. Um die Auswirkung von Bleomycin auf die endotheliale Permeabilität zu testen, wurden Herz, Lunge und Niere der zuvor mit Bleomycin und Evans Blue behandelten Mäuse entnommen und die darin diffundierte Evans Blue Konzentration photometrisch gemessen. Bleomycin erhöht den Übertritt des

Farbstoffes EVB im Herzen um $(132,00 \pm 28,40 \%$, $n=5$) bei Lunge und Nieren konnten signifikante Ergebnisse erzielt werden. So wird die endotheliale Permeabilität in der Lunge um $(192,5 \pm 26,36 \%$, $n=5$) erhöht und in den Nieren um $(143,2 \pm 6,234 \%$, $n=5$), (siehe Ergebnis 5.1 (E)).



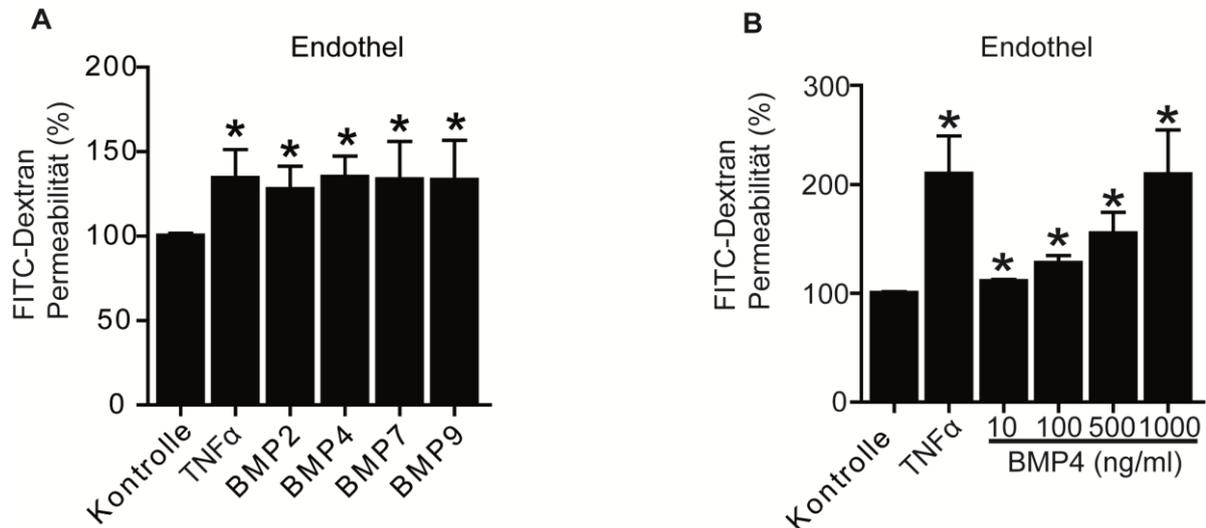
Ergebnis 5.1-E

(E) Den mit Bleomycin und EVB behandelten Mäusen wurden Herz, Lunge und Niere entnommen, die in je 1 ml Formamide über 18 h bei 70 °C und 500 rpm gelöst wurden. Anschließend wurde die Menge des übergetretenen EVB photometrisch ermittelt. Nach Behandlung mit Bleomycin nimmt die Durchlässigkeit des Farbstoffes EVB in Lunge und Niere signifikant zu (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, Mittelwert \pm SEM).

Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich feststellen, dass nach einer Schädigung, verursacht durch Bleomycin, die endotheliale und epitheliale Permeabilität *in vitro* und *in vivo* erhöht ist.

5.2 BMPs und die endotheliale Permeabilität *in vitro* und *in vivo*

Darüber hinaus sollte der Einfluss verschiedener BMPs auf die endotheliale Permeabilität getestet werden. Dazu wurden Endothelzellen mit BMP2, BMP4, BMP7 und BMP9 (100ng/ml) täglich stimuliert. Die unbehandelten Endothelzellen wurden als Kontrolle verwendet und auf 100 % gesetzt ($100,0 \pm 1,689 \%$, $n=8$). Es konnten signifikante Ergebnisse für die Positivkontrolle erzielt werden ($134,2 \pm 17,08 \%$, $n=8$), die auf eine erfolgreiche Zellschädigung nach Stimulation mit TNF- α hindeuten. Nach Stimulation mit den unterschiedlichen BMPs kam zu einer signifikant erhöhten FITC-Dextran Durchlässigkeit um mindestens 25 %, verglichen mit der Kontrolle (siehe Ergebnis 5.2 (A)). Außerdem konnte im Transwell gezeigt werden, dass die endotheliale Permeabilität abhängig von der BMP4 Konzentration zunimmt. Ab einer Konzentration von 10 ng/ml BMP4 nimmt die FITC-Dextran Permeabilität signifikant zu ($111,0 \pm 1,799 \%$, $n=8$), (siehe Ergebnis 5.2 (B)). Zusammenfassend erhöhen BMPs die endotheliale Permeabilität *in vitro*.

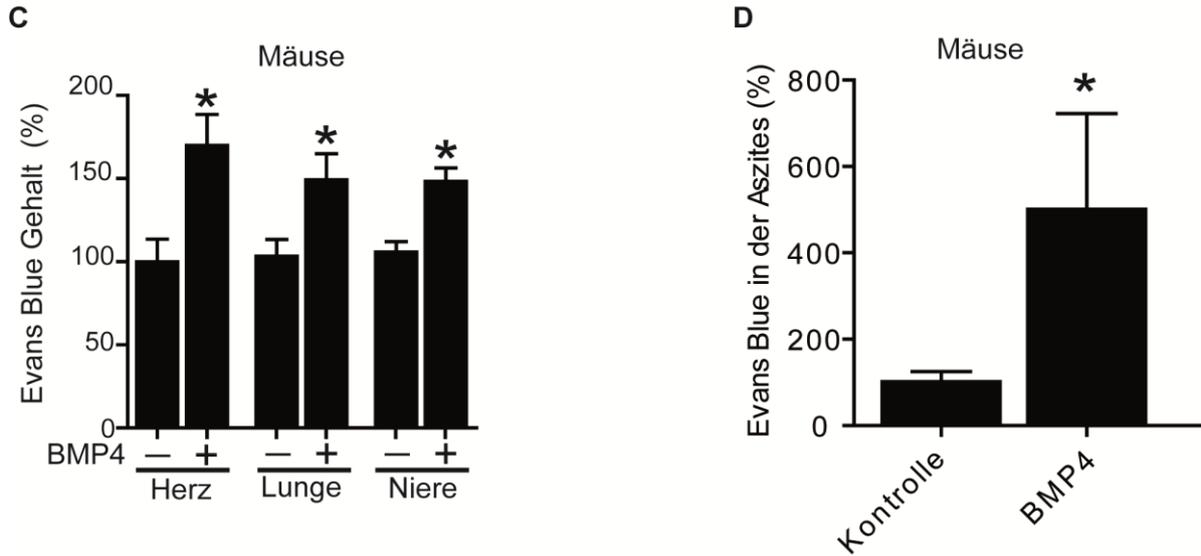


Ergebnis 5.2-A und 5.2-B

- (A) Humane Endothelzellen (HUVECs, 30×10^4) wurden in Transwellfilter gesät und über 72 h mit BMP2, 4, 7 und 9 (100 ng/ml) stimuliert. Als Positivkontrolle fungierte TNF- α (20 ng/ml). Um die durch BMPs induzierte Permeabilität messbar zu machen, wurde der fluoreszierende Farbstoff FITC-Dextran in das obere Kompartiment appliziert und nach 2 h die diffundierte Menge des Farbstoffes im unteren Kompartiment bei einer OD von 485 nm gemessen. Alle getesteten BMPs erhöhen die FITC-Dextran Permeabilität signifikant (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, Mittelwert \pm SEM, $n=8$).
- (B) Endothelzellen wurden über 72 h mit einer aufsteigenden BMP4 Konzentration stimuliert (10, 100, 500, 1000 ng/ml). Anschließend erfolgte anhand der diffundierten FITC-Dextran Menge die Permeabilitätsmessung im Transwell Assay. Ab einer Konzentration von 10 ng/ml BMP4 erhöht sich die FITC-Dextran Permeabilität signifikant (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, Mittelwert \pm SEM, $n=8$).

Des Weiteren sollte anhand von BMP4 getestet werden, ob sich diese Ergebnisse auch *in vivo* bestätigen lassen. Dazu wurden Wildtypmäusen rekombinantes BMP4 intraperitoneal appliziert und diese mit der unbehandelten Kontrollmausgruppe verglichen. Als Permeabilitätsindikator diente der Farbstoff Evans Blue. Bei der Mausgruppe, die mit BMP4 behandelt wurde, diffundiert signifikant mehr Farbstoff ins Herz ($169,5 \pm 19,15$ %, $n=10$) verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe die auf 100 % gesetzt wurde. Auch in der Lunge ($148,8 \pm 16,09$ %, $n=10$) und in den Nieren ($147,7 \pm 8,746$ %, $n=10$) steigt nach BMP4 Injektion der Evans Blue Gehalt in den Organen signifikant an (siehe Ergebnis 5.2 (C)). Dies belegt, dass BMP4 zu einer Zunahme der endothelialen Permeabilität *in vivo* führt.

Zusätzlich wurde bei den mit BMP4 behandelten C57BL/6 Mäusen die Peritoneallavage gewonnen und auf deren Evans Blue Gehalt getestet. Nach Zugabe von BMP4 kommt es zu einem signifikanten Anstieg des Farbstoffes in die Aszitesflüssigkeit ($499,2 \pm 224,5$ %, $n=8$), (siehe Ergebnis 5.2 (D)).



Ergebnis 5.2-C und 5.2-D

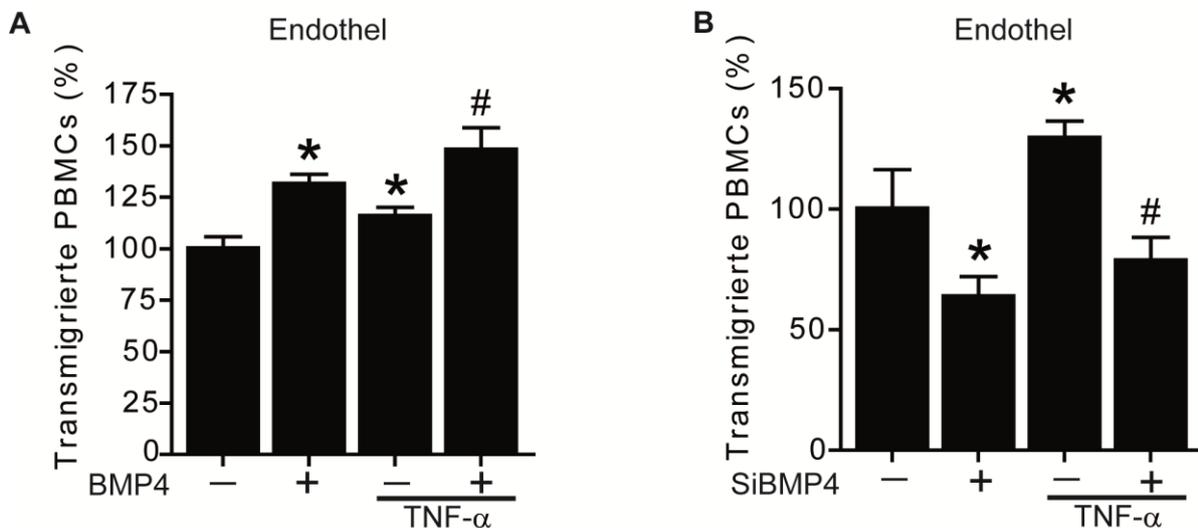
- (C) 13 Wochen alten männlichen C57BL/6 Mäusen wurde täglich zweimal 1 µg rekombinantes BMP4 (BMP4+) intraperitoneal injiziert. Nach 72 h erfolgte die Evans Blue Injektion in die Schwanzvene (45 µg/g), nach 1 h Zirkulation im Kreislauf wurden Herz, Lunge und Nieren entnommen. Die Organe wurden in 1 ml Formamide gelöst und anschließend wurde die diffundierte Evans Blue Menge bei einer OD von 620 nm gemessen. Nach Zugabe von BMP4 steigt die endotheliale Permeabilität in Herz, Lunge und Niere signifikant an, verglichen mit den Kontrollmäusen (BMP4-), (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, Mittelwert \pm SEM).
- (D) Die unbehandelte Kontrollgruppe ist der Gruppe Mäusen, die rekombinantes BMP4 injiziert bekommen haben, gegenübergestellt. Ermittelt wurde der Evans Blue Gehalt, der in die Aszitesflüssigkeit diffundieren konnte. Nach Zugabe von BMP4 steigt dieser signifikant an ($n=8$; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, Mittelwert \pm SEM).

5.3 BMP4 und die Transmigration von Leukozyten und PBMCs

Bis jetzt konnte gezeigt werden, dass BMP4 die endotheliale Permeabilität erhöht. Als nächstes sollte getestet werden, ob BMP4 eine erhöhte Transmigration von PBMCs verursacht. Hierfür wurden im Transmigrationstranswell unbehandelte Endothelzellen einer Gruppe mit TNF- α behandelter Endothelzellen gegenübergestellt. Dabei wurde jeweils ein Teil der Transwellfilter dieser zwei unterschiedlichen Gruppen mit BMP4 stimuliert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der PBMCs, die nach Auftragen auf die Endothelzellschicht transmigrieren konnten. Nur durch die Stimulation der Endothelzellen mit BMP4 kam es zu einem signifikanten Anstieg der transmigrierten PBMCs ($115,7 \pm 4,403$ %, $n=3$). Die Schädigung des Endothels durch TNF- α führt zu einer vermehrten Transmigration der PBMCs von ($131,3 \pm 4,818$ %). Die Zugabe von BMP4 und TNF- α führt ebenfalls zu signifikant mehr transmigrierten PBMCs ($148,0 \pm 10,69$ %) verglichen zu den Endothelzellen, die einer Schädigung mit TNF- α ausgesetzt wurden (siehe Ergebnis 5.3 (A)).

Umgekehrt sollte untersucht werden, ob eine BMP4 Abnahme die Transmigration von PBMCs beeinflusst. Nach dem *knock down* von BMP4 kommt es zu einer verminderten

Transmigration der PBMCs ($63,68 \pm 8,41$ %) durch das Endothel, verglichen mit den Zellen, die mit Kontroll-SiRNA transfiziert wurden. Der gleiche Versuch wurde durchgeführt nach Zellschädigung mit TNF- α . Nach Zellschädigung kommt es zu einem signifikanten Anstieg der transmigrierten PBMCs ($129,4 \pm 7,19$ %). Auch nach Zellschädigung führt der BMP4 knock down ebenfalls zu einer verminderten PBMC Transmigration ($78,54 \pm 9,75$ %), (siehe Ergebnis 5.3 (B)).



Ergebnis 5.3-A und 5.3-B

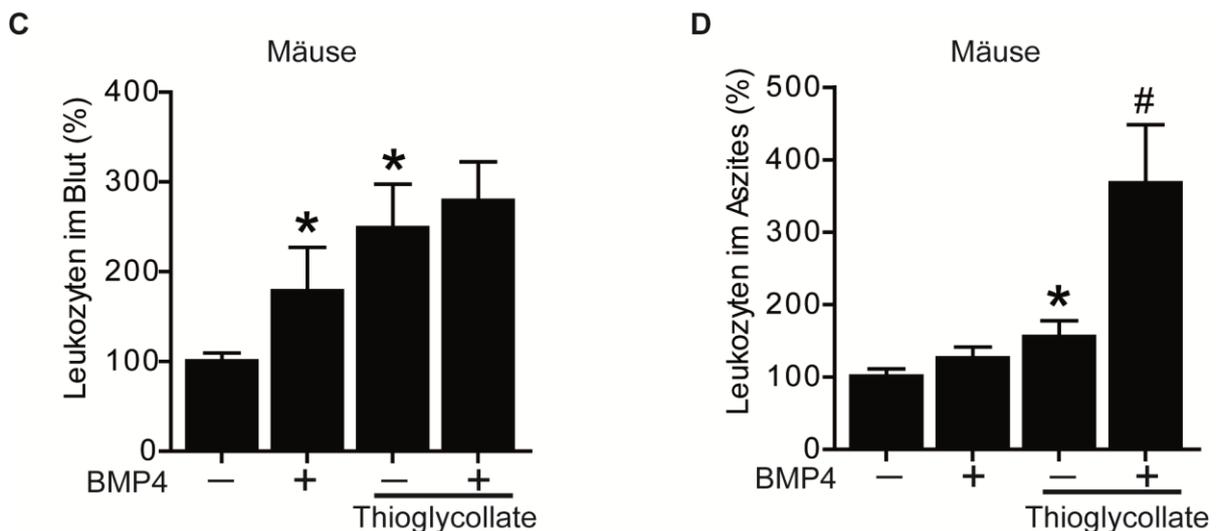
(A) HUVECs wurden in Transwellfilter ausgesät und täglich mit 100 ng/ml BMP4, 20 ng/ml TNF- α und 100 ng/ml BMP4 zusammen mit 20 ng/ml TNF- α stimuliert. Nach 3 Tagen wurden isolierte PBMCs auf das obere Kompartiment appliziert und nach 2 h die transmigrierten PBMCs im unteren Kompartiment gezählt. Die Zugabe von BMP4 führt zu signifikant mehr transmigrierten PBMCs. Auch nach Zellschädigung verursacht durch TNF- α , führt die zusätzliche Zugabe von BMP4 zu einer signifikant höheren PBMC Transmigration ($n=3$), (* $p < 0,05$ vs. (BMP4-); # $p < 0,05$ vs. (BMP4-) + TNF- α).

(B) Dargestellt ist ein Kontrollversuch nach BMP4 knock down. HUVECs wurden 48 h mit BMP4 SiRNA I transfiziert (SiBMP4+), als Kontrolle wurde eine SiKontroll RNA verwendet (SiBMP4-). Die transfizierten HUVECs wurden auf Transwellfilter übertragen. Verglichen wurden zwei Gruppen: ohne und mit Zellschädigung, verursacht durch eine dreitägige Stimulation mit TNF- α 20 ng/ml. Quantifiziert wurden nach 2 h die transmigrierten PBMCs, die auf das obere Transwell Kompartiment gegeben wurden. Nach BMP4 knock down können signifikant weniger PBMCs transmigrieren ($n=6$), (* $p < 0,05$ vs. (SiBMP4-); # $p < 0,05$ vs. (SiBMP4-) + TNF- α).

Da die Vermutung, dass BMP4 die Transmigration von Entzündungszellen in vitro erhöht, bestätigt wurde, sollte gezeigt werden, wie sich BMP4 auf die Leukozyten-Transmigration in vivo verhält. C57BL/6 Mäuse wurden in zwei Gruppen eingeteilt: eine unbehandelte Gruppe und eine Gruppe, die einer sterilen lokalen Inflammation ausgesetzt wurde, verursacht durch Thioglycolate. Die Quantifizierung der Leukozyten erfolgte im Blut und in der Aszitesflüssigkeit. Nach BMP4 Behandlung steigen die Leukozyten im Blut signifikant an ($177,8 \pm 49,29$ %, $n=6$) verglichen mit der Kontrollgruppe die auf 100 % gesetzt wurde ($100,0 \pm 9,49$ %, $n=9$). Durch die alleinige Induktion einer Entzündung mit Thioglycolate konnten signifikant mehr Leukozyten im Blut nachgewiesen werden ($248,0 \pm 49,64$ %, $n=8$).

Nach zusätzlicher BMP4 Injektion steigt die Transmigration der Leukozyten geringfügig aber nicht signifikant an um ($278,61 \pm 66,09 \%$), verglichen mit der Gruppe die einer Entzündung mit Thioglycolate ausgesetzt wurde (siehe Ergebnis 5.3 (C)).

Im gleichen Versuchsaufbau wurde zusätzlich der Leukozytengehalt in der Aszitesflüssigkeit gemessen, mit dem Ergebnis, dass nach Induktion einer Entzündung signifikant mehr Leukozyten transmigrieren konnten ($154,5 \pm 23,06 \%$, $n=7$). Nach zusätzlicher BMP4 Behandlung der Mäuse kam es zu einem erheblichen und signifikanten Anstieg der transmigrierten Leukozyten in die Aszitesflüssigkeit ($366,98 \pm 81,39 \%$, $n=10$), (siehe Ergebnis 5.3 (D)).



Ergebnis 5.3-C und 5.3-D

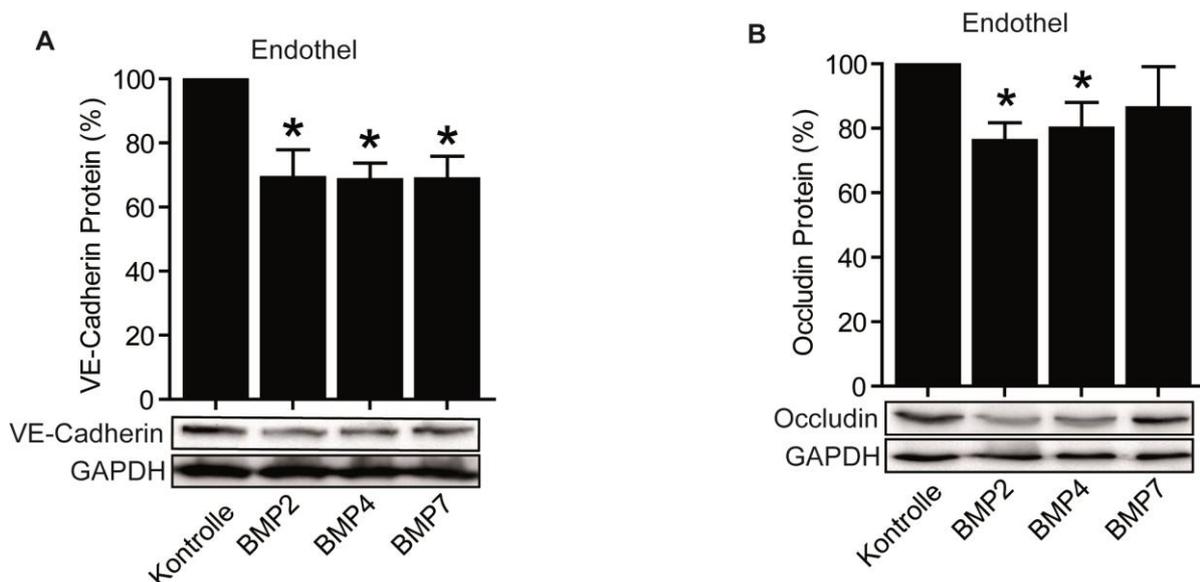
(C) Dargestellt ist eine Gruppe unbehandelter Wildtypmäuse und eine Gruppe, die einer Inflammation verursacht durch Thioglycolate ausgesetzt wurden. Davon wurde jeweils einer der Mausgruppen alle 12 h BMP4 ($1 \mu\text{g}$) i.p. injiziert. Nach 3 Tagen erfolgte die Blutentnahme und die Leukozyten wurden quantifiziert. Die alleinige Behandlung mit BMP4 führt dazu, dass signifikant mehr Leukozyten im Blut nachzuweisen waren (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle (BMP4-); # $p < 0,05$ vs. Kontrolle (BMP4-) + Thoiglycollate).

(D) Im gleichen Versuchsaufbau (siehe (C)) wurde anschließend die Aszitesflüssigkeit gewonnen und der darin enthaltene Leukozytengehalt quantifiziert. Nach einer Entzündungsinduktion, verursacht durch Thioglycolate und zusätzlicher Injektion von BMP4, transmigrieren signifikant mehr Leukozyten in die Aszites Flüssigkeit (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle (BMP4-); # $p < 0,05$ vs. Kontrolle (BMP4-) + Thoiglycollate).

5.4 BMPs und die Expression transmembraner Proteine

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die transendotheliale Permeabilität und Transmigration von PBMCs und Leukozyten durch die Stimulation mit verschiedenen BMPs erhöht wird, wurde in weiterführenden Experimenten der Einfluss verschiedener BMPs auf die Expression transmembraner Proteine getestet. Um eine Aussage auf die Auswirkung von BMPs auf die transmembranen Proteine zu treffen, wurden VE-Cadherin und Occludin auf Proteinebene mit Hilfe eines Western Blots quantifiziert. Hierfür wurden Endothelzellen

über drei Tage mit BMP2, 4 oder 7 stimuliert. Anschließend wurde die Expression von VE-Cadherin und Occludin im Western Blot bestimmt. Die Western Blot Banden wurden mit der Quantity One 1-D Analysis Software ausgewertet und die Kontrollen wurden auf 100 % gesetzt. Nach Stimulation mit BMP2 kommt es zu einer Abnahme von VE-Cadherin um ($68,95 \pm 8,95$ %), bei BMP4 um ($68,32 \pm 5,43$ %) und bei BMP7 um ($68,51 \pm 7,38$ %), (siehe Ergebnis 5.4 (A)). Somit führt die Stimulation bei allen getesteten BMPs zu einer signifikanten Abnahme der Expression von VE-Cadherin im Endothel. Die Expression von Occludin nimmt nach Stimulation mit BMP2 ($75,97 \pm 5,78$ %) und BMP4 ($79,76 \pm 8,31$ %) signifikant ab. Dieser Effekt scheint für die beiden BMPs spezifisch zu sein, da nach Stimulation mit BMP7 keine signifikante Occludin Reduktion zu erzielen ist ($86,18 \pm 12,96$ %), (siehe Ergebnis 5.4 (B)).

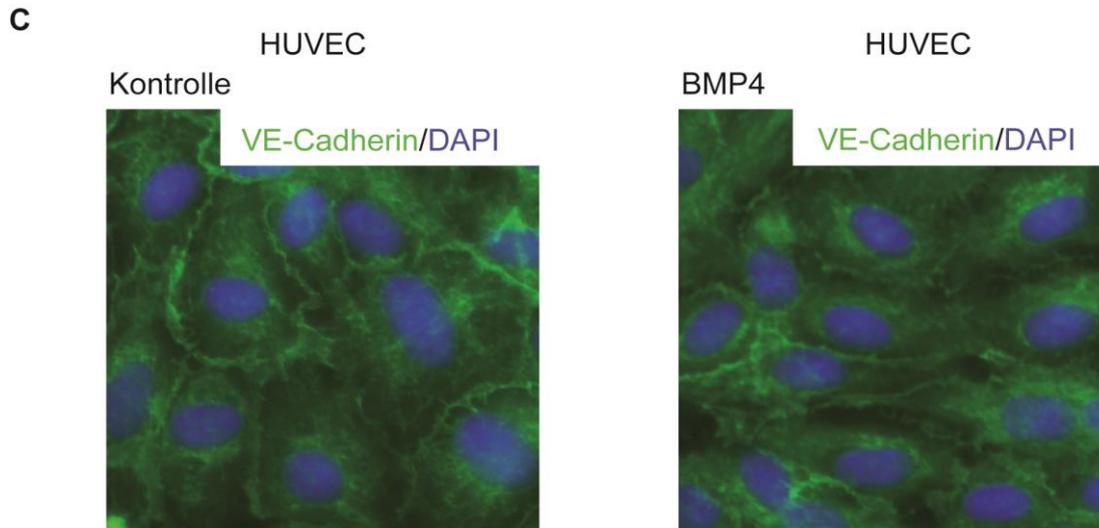


Ergebnis 5.4-A und 5.4-B

- (A) Endothelzellen wurden täglich über 72 h mit BMP2, BMP4 und BMP7 (100 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurden Zelllysate gewonnen und im Western Blot aufgetragen. GAPDH fungiert als Ladekontrolle. Nach Stimulation mit BMP2, BMP4 und BMP7 kommt es zu einer signifikanten Reduktion von VE-Cadherin. (Die Graphen zeigen die Mittelwerte der Western-Blots mit einem Signifikanzniveau von (* $p < 0,05$). Die Kontrollen aller Western Blots wurden auf 100 % gesetzt, $n=6$).
- (B) Endothelzellen wurden über 3 Tage mit BMP2, BMP4 und BMP7 (100 ng/ml) stimuliert. Mit Hilfe eines Western Blots wurde der Occludin Gehalt quantifiziert. Zu sehen ist ein repräsentativer Western Blot aus 8 unabhängigen Runden. Die Stimulation mit BMP2 und BMP4 führt zu einer signifikanten Reduktion von Occludin. (Die Graphen zeigen die Mittelwerte der Western Blots mit einem Signifikanzniveau von (* $p < 0,05$). Die Kontrollen aller Western Blots wurden auf 100 % gesetzt, $n=8$).

Um die Regulation von VE-Cadherin in der Zellmembran zu beurteilen, wurden Endothelzellen mit einer immunzytologischen Färbung mit Antikörpern für VE-Cadherin angefärbt. Ergebnis 5.4 (C) zeigt, dass VE-Cadherin (grün dargestellt) nach dreitägiger BMP4 Stimulation reduziert wird. Die Begrenzungen zwischen den einzelnen Zellen sind

undeutlich, außerdem wirken die Zellen in die Länge gezogen (siehe Ergebnis 5.4 (C)). Das bedeutet, dass BMP4 nicht nur VE-Cadherin reduziert, sondern zusätzlich den Phänotyp der Endothelzelle verändert.

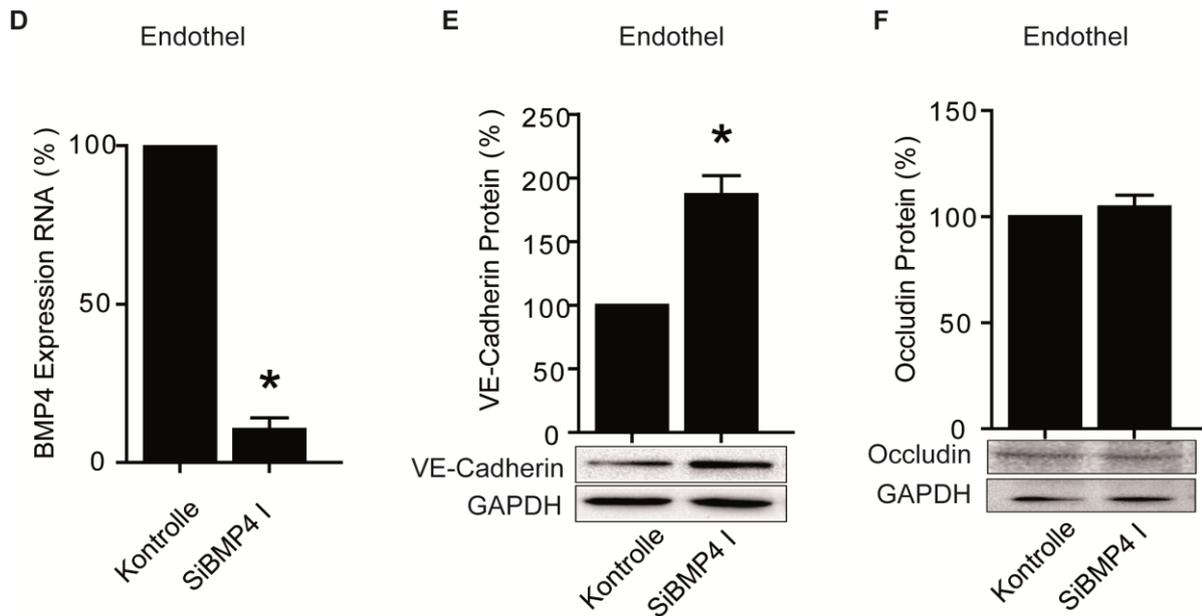


Ergebnis 5.4-C

(C) Die Abbildung zeigt die Immunozytologische Färbung von VE-Cadherin (grün). Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Auf dem linken Bild ist ein konfluenter unbehandelter Endothelzellrasen abgebildet. Rechts zu sehen ist der Zellrasen nach drei tägiger Stimulation mit BMP4 (100ng/ml). Nach Stimulation mit BMP4 verändert sich der kubische Phänotyp der Zelle. Die Zell-Zellkontakte nehmen ab und die Zellen wirken in die Länge gezogen.

In einem Gegenexperiment sollte getestet werden, ob die Abnahme von BMP4 Auswirkungen auf die Genexpression von VE-Cadherin und Occludin hat. Um die Effizienz des BMP4 *knock down* nachzuweisen, wurde die BMP4 Expression nach durchgeführter Transfektion mit SiRNA I mittels RT-PCR nachgewiesen. Nach der Transfektion zeigt sich eine signifikante Abnahme der BMP4 RNA Expression um ($19,89 \pm 3,68 \%$, $n=6$) in den Endothelzellen, verglichen mit der Kontroll-SiRNA die auf 100 % gesetzt wurde. Somit konnte ein erfolgreicher Nachweis eines funktionierenden BMP4 *knock down* erbracht werden (siehe Ergebnis 5.4 (D)).

Der *knock down* von BMP4 führt zu einer signifikant höheren Expression von VE-Cadherin ($187,1 \pm 14,82 \%$ $n=3$), (siehe Ergebnis 5.4 (E)). Nach dem *knock down* von BMP4 war die Occludin-Proteinexpression minimal aber nicht signifikant erhöht ($104,6 \pm 5,47 \%$ $n=5$), (siehe Ergebnis 5.4 (F)).

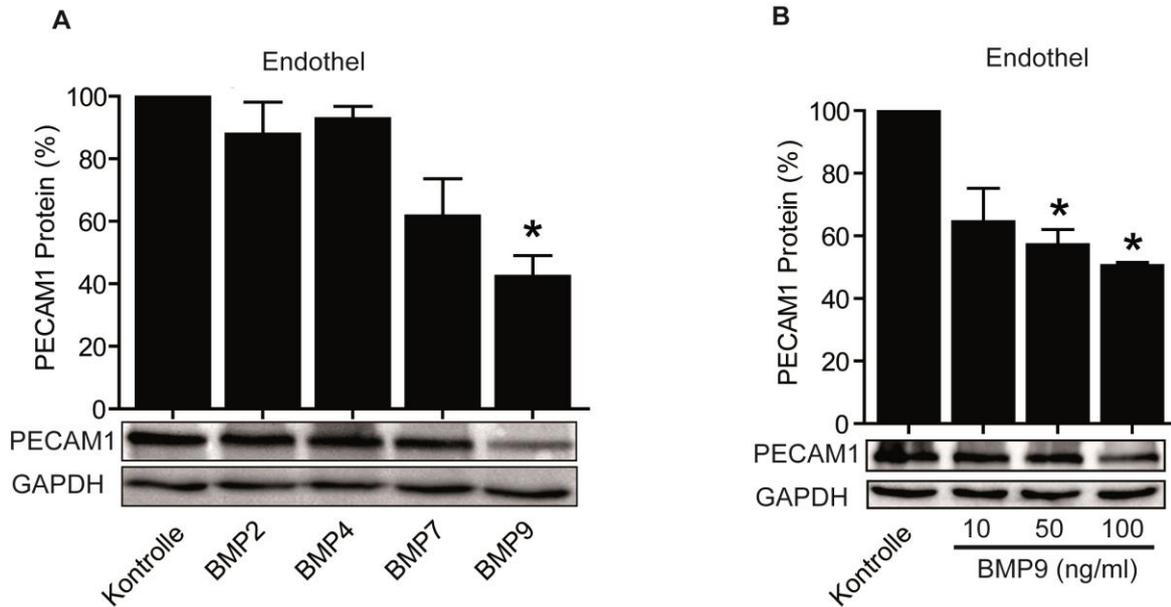


Ergebnis 5.4-D, 5.4-E und 5.4-F

- (D) HUVECs wurden über 48 h mit SiRNA I für BMP4 transfiziert. Als Negativkontrolle fungierten Endothelzellen, die einer unspezifischen SiRNA ausgesetzt wurden. Graphisch dargestellt sind die Ergebnisse aus 6 unabhängigen Runden. Es konnte ein erfolgreicher knock down Nachweis auf RNA-Ebene durchgeführt werden. Nach BMP4 knock down kommt es zu einer signifikant reduzierten Expression von BMP4. Die Auswertung der BMP4 Expression erfolgte mittels RT-PCR nach Normalisierung der Werte auf die jeweilige Expression des Referenzgens hRP II und anschließenden Vergleich mit der Negativkontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde (* $p < 0,05$).
- (E) Nach Transfektion der HUVECs mit SiRNA I für BMP4 wurden nach 48 h Zelllysate gewonnen und im Western Blot aufgetragen. Die mit BMP4 SiRNA transfizierten Zellen wurden mit einer Si-Kontrolle, die als Negativkontrolle fungiert, verglichen. Der knock down von BMP4 führt zu einer signifikanten Erhöhung der VE-Cadherin Expression (* $p < 0,05$). Die Kontrollen aller Western Blots wurden auf 100 % gesetzt, $n=3$).
- (F) HUVECs wurden mit SiRNA I für BMP4 transfiziert. Nach 48 h wurde die Expression von Occludin im Western Blot bestimmt ($n=5$). GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Der BMP4 knock down führt zu einer geringen Erhöhung von Occludin (* $p < 0,05$). Die Kontrollen aller Western Blots wurden auf 100 % gesetzt).

5.5 BMP9 und die Expression von PECAM1

Im Transwell konnte gezeigt werden, dass BMP2, BMP4, BMP7 und BMP9 die endotheliale Permeabilität erhöhen (siehe Ergebnis 5.2 (A)). Neben der Regulation von VE-Cadherin und Occludin wurde der Einfluss von BMPs auf ein weiteres transmembranes Protein, PECAM1, getestet. Mit dem Ergebnis, dass BMP9 im Western Blot als einziges getestetes BMP die Expression von PECAM1 signifikant reduziert ($42,13 \pm 6,9 \%$, $n=3$), (siehe Ergebnis 5.5 (A)). In einer BMP9 Konzentrationsreihe ließ sich bestätigen, dass PECAM1 mit zunehmender Konzentration von BMP9 abnimmt. Ab einer Konzentration von 50 ng/ml BMP9 kommt es zu einer signifikanten Abnahme von PECAM1 ($56,92 \pm 5,14 \%$, $n=3$), (siehe Ergebnis 5.5 (B)).

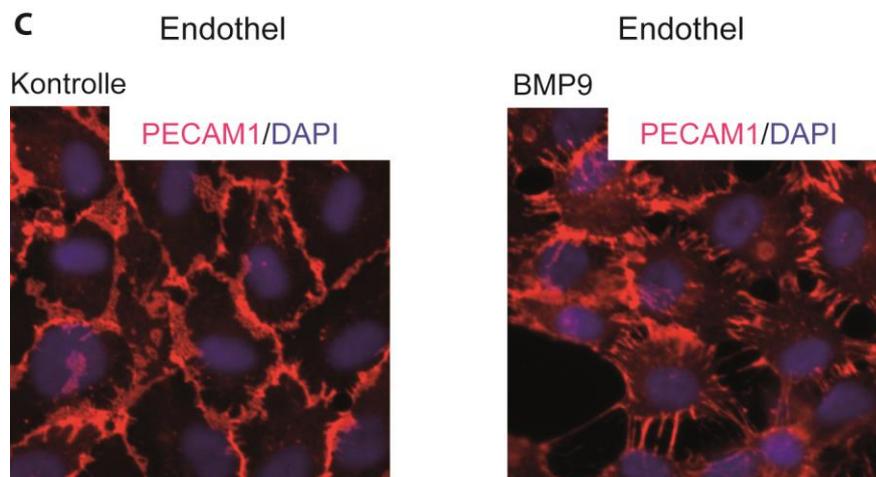


Ergebnis 5.5-A und 5.5-B

(A) Nach Stimulation der HUVECs über drei Tage mit verschiedenen BMPs wurden Proteine aus den Zelllysaten gewonnen und die Expression von PECAM1 mit Hilfe von Western Blots quantifiziert. Im Gegensatz zu BMP2, 4, 7 führt BMP9 zu einer signifikanten Abnahme von PECAM1. Dargestellt ist ein Western Blot aus 3 unabhängigen Runden. GAPDH dient als Ladekontrolle.

(B) BMP9 reduziert konzentrationsabhängig (10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml) die PECAM1-Expression im Endothel in vitro ($n=3$, $*p < 0,05$ vs. Kontrolle, Mittelwert \pm SEM).

Die Ergebnisse, die im Western Blot dargestellt sind, wurden in einer immunzytologischen Färbung visuell bestätigt. Nach Stimulation mit BMP9 wird die zellbegrenzende Schicht von PECAM1 zwischen den Endothelzellen aufgelöst, es entstehen Fortsätze und Zellausläufer (siehe Ergebnis 5.5 (C)).



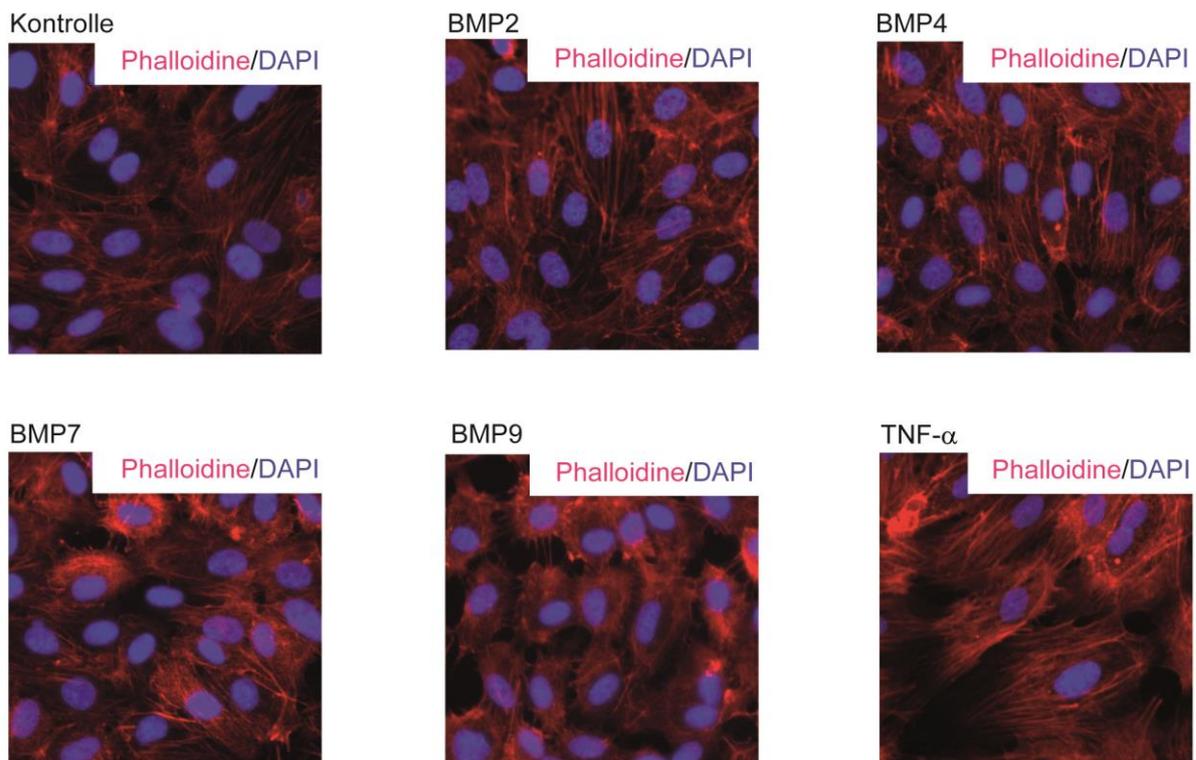
Ergebnis 5.5-C

(C) Diese Abbildung zeigt einen Ausschnitt eines Endothelzellrasens nach immunozytologischer PECAM1 Färbung. Gegenübergestellt sind unbehandelte Endothelzellen (links) und Endothelzellen nach dreitägiger Stimulation mit BMP9 (100 ng/ml, rechts). Nach Stimulation mit BMP9 verändert sich der Phänotyp der Zelle. Es entstehen Fortsätze und Zellausläufer.

5.6 BMPs und die Zellmorphologie der Endothelzelle

BMPs regulieren differentiell die Expression verschiedener transmembraner Proteine. Um dies visuell darzustellen, wurden HUVECs ausgesät und über drei Tage mit BMP2, 4, 7 und 9 (100 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurde das Aktinzytoskelett mit einer Phalloidin-Färbung angefärbt. Als Positivkontrolle dienten Endothelzellen, die über drei Tage mit TNF- α (20 ng) stimuliert wurden. Die Bilder der Immunzytologie zeigen, dass sich nach der Stimulation mit BMP2, 4, 7, 9 vermehrt Stressfasern bilden, die Zellen wirken gerötet und in die Länge gezogen. Die verstärkte Rot-Färbung der Aktinfasern ist Ausdruck der Endothelaktivierung. Die Zell-Zellkontakte haben abgenommen, die Aktinfasern sind verdickt und gerötet. Die Stimulation mit BMP9 wirkt sich vor allem auf die Abnahme der Zell-Zellkontakte aus (siehe Ergebnis 5.6 (A)).

A



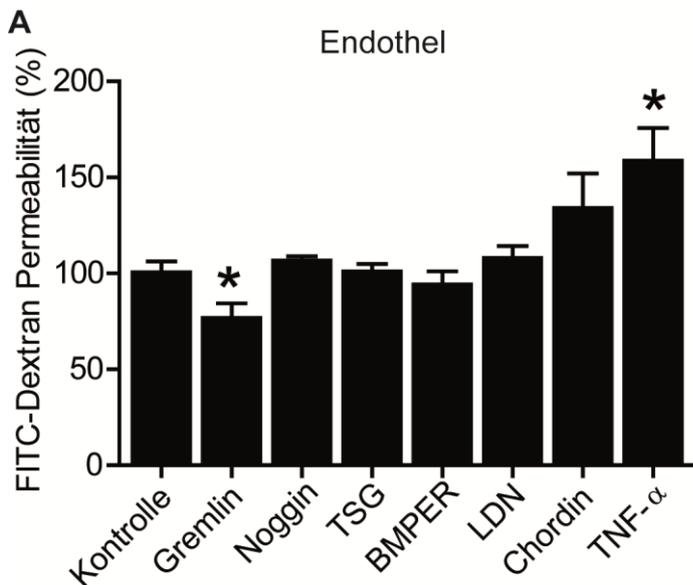
Ergebnis 5.6-A

(A) HUVECs wurden über 72 h mit verschiedenen BMPs stimuliert. Danach wurden die Endothelzellen in 4 % PFA fixiert und das Aktinzytoskelett wurde mit Phalloidine (rot), die Zellkerne mit DAPI (blau) angefärbt. Gegenübergestellt sind die Färbungen einer unbehandelten Negativkontrolle und einer mit TNF- α (20 ng/ml) stimulierten Positivkontrolle. BMP2, 4, 7, 9 verstärken die Ausbildung von Stressfasern im Aktinzytoskelett und reduzieren die Zell-Zellkontakte.

Diese Färbungen bestätigen, dass nach Stimulation mit verschiedenen BMPs sich der endotheliale Phänotyp verändert. Die endotheliale Permeabilität ist durch die vermehrte Kontraktionsbereitschaft der Endothelzellen und durch den Verlust der Zell-Zellkontakte erhöht.

5.7 BMP-Modulatoren und die endotheliale Barrierefunktion *in vitro*

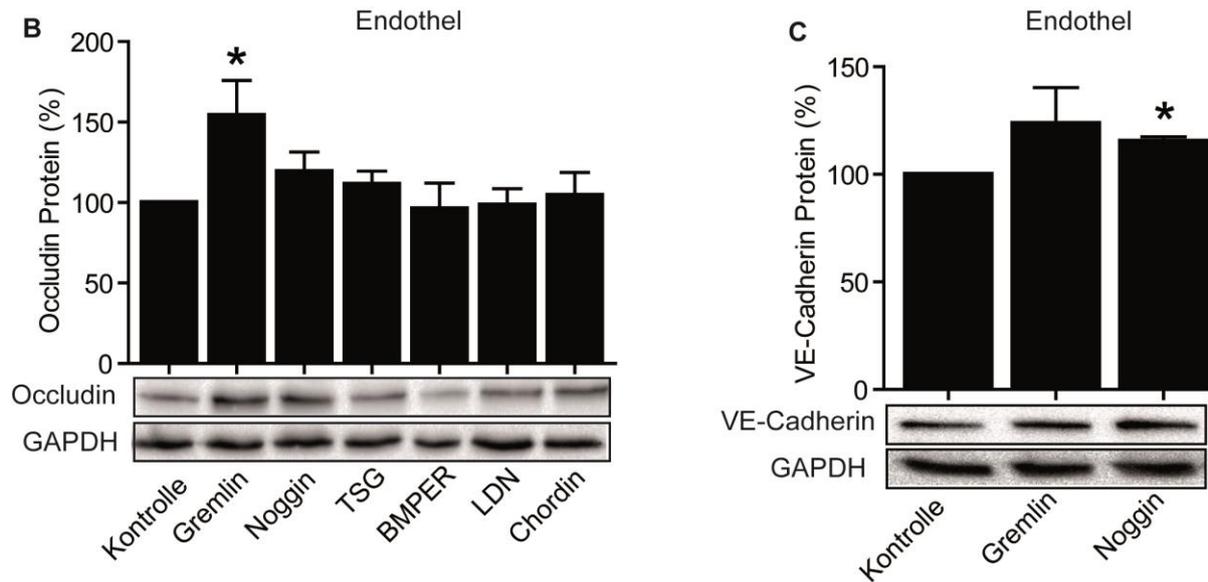
Des Weiteren sollte im Transwell untersucht werden, inwiefern sich die BMP-Modulatoren Gremlin, Noggin, TSG, BMPER, Chordin und der synthetische BMP-Antagonist LDN, auf die endotheliale Permeabilität auswirken. Nach Stimulation mit Gremlin konnte signifikant weniger FITC-Dextran durch die Endothelzellschicht treten ($76,20 \pm 8,23 \%$, $n=8$), verglichen mit der Negativkontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde ($100 \pm 6,621 \%$). Für alle anderen getesteten Modulatoren konnten keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden. TNF- α fungierte mit einem signifikanten Permeabilitätsanstieg als Positivkontrolle ($158,3 \pm 17,47 \%$), (siehe Ergebnis 5.7 (A)).



Ergebnis 5.7-A

(A) HUVECs wurden in Transwellfilter ausgesät und über 72 h mit den verschiedenen BMP-Modulatoren stimuliert (100 ng/ml Gremlin, Noggin, TSG, BMPER, Chordin und 800 ng/ml LDN). TNF- α (20 ng/ml) fungiert als Positivkontrolle. Anschließend wurde FITC-Dextran in das obere Kompartiment gegeben und nach 2 h die diffundierte Menge des Farbstoffes durch die Endothelzellschicht gemessen. Gremlin reduziert signifikant die endotheliale Permeabilität im Transwell ($n=8$).

Des Weiteren wurde die Expression von Occludin und VE-Cadherin im Western Blot nach Stimulation mit den BMP-Modulatoren quantifiziert. Nach Stimulation mit Gremlin steigt die Expression von Occludin signifikant an ($154,3 \pm 21,56$, $n=8$), (siehe Ergebnis 5.7 (B)). Die VE-Cadherin Expression steigt nach Stimulation mit Noggin und Gremlin an (siehe Ergebnis 5.7 (C)), bei Noggin sogar signifikant ($115,4 \pm 2,07 \%$, $n=7$).



Ergebnis 5.7-B und 5.7-C

- (B) Nach 72 h Stimulation der Endothelzellen mit den verschiedenen BMP-Modulatoren Gremlin, Noggin, TSG, BMPER, LDN und Chordin wurden Zelllysate gewonnen und im Western Blot die Expression von Occludin quantifiziert. Gremlin führt zu einer signifikant erhöhten Expression von Occludin ($n=8$, $*p<0,05$ vs. Kontrolle, Mittelwert \pm SEM)
- (C) Die Stimulation mit Noggin führt zu einem signifikanten Anstieg von VE-Cadherin. (Die Graphen zeigen die Mittelwerte der Western-Blots mit einem Signifikanzniveau von ($*p < 0,05$), die Kontrollen aller Western Blots wurden auf 100 % gesetzt, $n=7$).

6 Diskussion

6.1 Bleomycin erhöht die epitheliale und endotheliale Permeabilität *in vitro* und *in vivo*

Der Zusammenbruch der endothelialen und epithelialen Barrierefunktion ist ein wichtiger Faktor in der Entstehung der Lungenschädigung, welche zu einer Inflammation, einem Lungenödem und letztendlich zu einem pulmonalen Organversagen führen kann. Wie sich eine geschädigte Barrierefunktion auf die Permeabilität auswirkt, wurde mit Hilfe der zytostatischen Substanz Bleomycin getestet. Bleomycin ist eine antineoplastische, antibiotisch wirksame Substanz, die aus Aktinomyzeten isoliert wird. Es werden Komplexe mit Sauerstoff und Metallen gebildet, die zur Produktion von Sauerstoffradikalen, DNA-Brüchen und letztendlich zum Zelltod führen.⁶⁵

Hyperpermeabilität der Gefäße ist ein Merkmal der endothelialen Dysfunktion. Eine intakte Endothelzellschicht verhindert die Migration von Entzündungszellen und Plasmaproteinen aus der Blutbahn in das Gewebe.¹ Dagegen ist eine beschädigte Barrierefunktion die Ursache für eine Reihe vaskulärer Erkrankungen wie Gewebsödeme, Entzündungen, Arteriosklerose und letztendlich Sepsis und Organversagen. Ebenso ist die Funktion eines intakten Lungenepithels von großer Bedeutung. Ist die epitheliale Homöostase beeinträchtigt, werden der pulmonale Flüssigkeitsaustausch, die mukoziliäre Reinigung und der zelluläre Metabolismus gestört.^{66 43} Eine aktuelle Studie beschreibt die Komplexität des Lungengewebes und die Mechanismen der Regeneration des Gewebes nach einer Zellschädigung. Interessanterweise läuft der molekulare Signalweg der Zellerneuerung des Lungengewebes über ähnliche Mechanismen ab, wie der BMP-Signalweg.⁶⁷

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es im Schädigungsmodell mit Bleomycin zu einer endothelialen und epithelialen Hyperpermeabilität kommt. Durch die Dysfunktion des Endothels konnten mehr Leukozyten in der bronchoalveolären Lavage nachgewiesen werden. Passend zu diesen Ergebnissen ist aus der Literatur bekannt, dass die einmalige intratracheale Gabe von Bleomycin eine endotheliale Lungenschädigung auslöst.⁶⁴ Diese Ergebnisse bauen auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe auf, bei denen ebenfalls gezeigt werden konnte, dass die epitheliale Permeabilität nach Zellschädigung zunimmt.⁴³

6.2 BMPs regulieren die endotheliale Permeabilität *in vitro* und *in vivo*

Es konnte ein Zusammenhang zwischen der Erhöhung der epithelialen Permeabilität und BMPs gefunden werden, indem gezeigt wurde, dass Id-1 nach einer Lungenschädigung, verursacht durch Bleomycin, erhöht ist.⁴³ Da es sich bei Id-1 um einen Marker der BMP-Aktivität handelt,⁴⁶ lag die Vermutung nahe, dass BMPs Einfluss auf die epitheliale Hyperpermeabilität haben. Inwiefern sich BMPs auf die endotheliale Permeabilität auswirken, war bislang nicht bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun erstmalig gezeigt werden, dass nach Stimulation mit BMP2, 4, 7 und 9 die endotheliale Permeabilität *in vitro* erhöht wird. Auch *in vivo* erhöht BMP4 die endotheliale Permeabilität. Ursächlich dafür können die proinflammatorischen Eigenschaften der BMPs sein. So zeigen andere Studien, dass BMP2 nach Stimulation mit proinflammatorischen Substanzen wie TNF- α und Wasserstoffperoxid vermehrt exprimiert wird.⁴¹ Außerdem konnte gezeigt werden, dass BMP2 selbst oxidativen Stress im Endothel auslösen kann.⁶⁸ Für BMP4 wurde nachgewiesen, dass es proinflammatorische Effekte auslöst, indem es die Monozytenadhäsion am Endothel verstärkt.⁵⁰ Außerdem induziert und aktiviert BMP4 die NADPH Oxidase wodurch Superoxide produziert werden, die *in vitro* eine Entzündungsreaktion bei Endothelzellen auslösen.⁵⁰ In einer anderen Studie wurde Mäusen eine Pumpe implantiert, die über 4 Wochen BMP4 infundierte. Diese chronische Infusion von BMP4 führte zu einer Aktivierung der arteriellen NADPH Oxidase und sowohl zu einer endothelialen Dysfunktion als auch zu einem Blutdruckanstieg bei den Mäusen.⁵¹

Für BMP4 werden unterschiedliche Wirkungsweisen in koronaren und pulmonalen arteriellen Zellen beschrieben. So belegt eine Studie, dass BMP4 in koronaren arteriellen Endothelzellen (CAECs) oxidativen Stress verursacht und der Entzündungsmarker ICAM-1 hochreguliert wird.⁶⁸ Außerdem wird die Monozytenadhäsion am Endothel gesteigert. Bei pulmonalen arteriellen Endothelzellen (PAECs) wurden keine proinflammatorischen Auswirkungen nach Stimulation mit BMP4 nachgewiesen.⁶⁸

6.3 BMP4 erhöht die Transmigration von Leukozyten und PBMCs

Übereinstimmend zu den proinflammatorischen Eigenschaften der BMPs konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass BMP4 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer vermehrten Migration von Entzündungszellen führt. Ein *in vivo* Modell unter basalen und inflammatorischen Bedingungen wurde dazu etabliert. Anhand dieses Modells konnte gezeigt werden, dass die Injektion von BMP4 zu einem Transmigrationsanstieg der Leukozyten in Blut und Aszites führt. Beruhend auf diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass BMP4 proinflammatorische Eigenschaften hat, indem es die Leukozytentransmigration durch das Endothel *in vivo* und *in vitro* steigert.

Aus früheren Studien lassen sich unterschiedliche Gründe für eine vermehrte Leukozytentransmigration durch das Endothel ableiten. In einem *in vivo* Versuch wurden Mäusen mit Hilfe von implantierten osmotischen Pumpen 4 Wochen BMP4 infundiert, mit dem Resultat, dass die langfristige Infusion von BMP4 zu einer endothelialen Dysfunktion und einer Hypertension durch die Aktivierung der arteriellen NADPH-Oxidase führt.⁵¹ In dieser Studie wurde die NADPH-Oxidase Aktivität für die proinflammatorischen Eigenschaften von BMP4 verantwortlich gemacht. Andere Studien begründen den proinflammatorischen Effekt von BMP4 damit, dass BMP4 die Monozytenadhäsion am Endothel verstärkt.⁵⁰ Außerdem konnte gezeigt werden, dass BMP4 durch die Aktivierung

der NADPH-Oxidase Aktivität Superoxide produziert, die eine Entzündungsreaktion im Endothel auslösen.⁵⁰

Zusammenfassend erhöht BMP4 die endotheliale Permeabilität und führt zu einer vermehrten Transmigration von Leukozyten. Beides sind entscheidende Komponenten einer endothelialen Dysfunktion. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Reduktion von BMP4 hingegen protektiv auf die endotheliale Barrierefunktion wirkt.

Auch der BMP-Rezeptor (BMPR) spielt eine wesentliche Rolle in der Regulation der endothelialen Barrierefunktion. So zeigt eine Studie, dass es nach dem knock down des BMPR II zu einer gesteigerten Permeabilität und zu einer erhöhten Transmigration von Leukozyten in das Lungengewebe kommt.⁷ *In vivo* wurde festgestellt, dass bei BMPR II defizienten Mäusen eine vermehrte vaskuläre Durchlässigkeit und eine gesteigerte Migration von Leukozyten in die Lunge stattfindet. Mutationen im BMPR II sind häufig die Ursache von pulmonaler arterieller Hypertension.⁷

Eine weitere Studie hat sich über einen anderen Mechanismus mit der Entstehung endothelialer Hyperpermeabilität auseinandergesetzt.⁶⁹ Bei einer Schädigung der Endothelzelle entstehen zentripetale Kräfte, die eine Kontraktion der Zelle verursachen und dazu führen, dass sich die transmembranen Proteine VE-Cadherin und Occludin durch ihre Verbindung zum Aktinzytoskelett zurück ins Zellinnere verlagern. Durch die entstandenen vergrößerten interzellulären Lücken können Entzündungszellen nun ungehindert passieren.^{1,9}

6.4 BMPs regulieren die Expression transmembraner Proteine

Da die transmembranen Proteine VE-Cadherin und Occludin eine wesentliche Rolle bei der Entstehung der endothelialen Hyperpermeabilität spielen, wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft, inwiefern sich BMPs auf die Expression transmembraner Proteine auswirken. Das Ergebnis zeigte, dass nach Stimulation der Endothelzellen mit BMPs die Expression von Occludin und VE-Cadherin signifikant reduziert wird. Besonders deutlich war die Abnahme von VE-Cadherin nach Stimulation mit BMP4. Die Reduktion von BMP4 führt hingegen zu einer erhöhten Expression von VE-Cadherin. Von klinischem Interesse ist vor allem die Expressionssteigerung von VE-Cadherin zum Schutz der endothelialen Barrierefunktion. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit zeigen frühere wissenschaftliche Studien, dass durch die Inhibition von VE-Cadherin über Antikörper oder bei VE-Cadherin defizienten Mäusen die vaskuläre Homöostase beeinträchtigt wird und somit Gewebsödeme und Transmigration von Leukozyten begünstigt werden.^{19, 70} Umgekehrt führt die vermehrte Expression von VE-Cadherin zur Stabilisierung der Barrierefunktion und zum Schutz vor vaskulärer Hyperpermeabilität.⁷¹ Für eine aktuelle Studie wurden genmanipulierte Mäuse verwendet, bei denen VE-Cadherin mit α -Catenin fest fixiert wurde, wodurch eine Interaktion von VE-Cadherin mit dem Aktinzytoskelett der Endothelzelle gehemmt wurde. Daraus resultierte eine gesteigerte endotheliale Barrierefunktion.⁷²

In der vorliegenden Arbeit konnten keine signifikanten Aussagen für eine BMP7 induzierte Reduktion von Occludin oder für eine durch BMP9 induzierte Reduktion von Occludin und VE-Cadherin gemacht werden. Denkbar ist, dass verschiedene BMPs die Expression transmembraner Proteine unterschiedlich stark beeinflussen. Zu vermuten ist, dass BMP4 die stärkste Auswirkung von allen getesteten BMPs auf die Reduktion von VE-Cadherin hat, da sich hierfür signifikante Ergebnisse bei Zugabe und Reduktion von BMP4 erzielen lassen konnten. Occludin wird ebenfalls von BMP2 und BMP4 reguliert, jedoch findet keine signifikante Expressionszunahme nach BMP4 knock down statt. BMP9 hat hingegen keinerlei Einfluss auf die Regulation von Occludin und VE-Cadherin. Die Vermutung, dass sich BMPs unterschiedlich auf transmembrane Proteine auswirken und zu deren Reduktion und damit einhergehender Hyperpermabilität führen, konnten frühere Tests der Arbeitsgruppe bestätigen, die sich mit epithelialer Permeabilität auseinandergesetzt haben.⁴³ Dabei wurde Epithel mit BMP2 stimuliert, mit dem Ergebnis, dass die Zugabe von BMP2 zu einer vermehrten Reduktion der epithelialen Barrierefunktion über den Verlust des transmembranen Proteins E-Cadherin führt.⁴³

6.5 BMP9 reduziert die Expression von PECAM1

Wie bei Occludin und VE-Cadherin handelt es sich bei Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) ebenfalls um ein transmembranes Glykoprotein, welches vorwiegend im Endothel zu finden ist.²⁹ Auch für PECAM1 wurden Regulationsmechanismen in der endothelialen Inflammation nachgewiesen, jedoch über andere Wirkungsmechanismen als für Occludin und VE-Cadherin. PECAM1 kann zum einen proinflammatorisch wirken, indem es die Migration von Leukozyten vermittelt,³² zum anderen hat es antiinflammatorische Eigenschaften durch seine dämpfende Wirkung auf proinflammatorische Zytokine.^{33, 34}

Von den untersuchten BMPs führte in dieser Studie nur BMP9 zu einer signifikanten Reduktion von PECAM1. Gründe für die differentiell unterschiedliche Auswirkung der BMPs auf die transmembranen Proteine könnten sein, dass sich BMP2 und BMP4 sehr ähnlich in ihrer Aminosäuresequenz sind,³⁸ wohingegen BMP9 einer anderen Subgruppe der BMPs angehört.³⁷ Die verschiedenen BMP-Gruppen unterscheiden sich durch ihre Bindungsaffinität am Rezeptor und lösen über die Phosphorylierung unterschiedlicher Smads andere Signalkaskaden aus.⁴⁴

BMP9 wirkt sich nicht nur andersartig auf die Zellmorphologie aus, auch die Wirkungsweise von BMP9 unterscheidet sich von BMP2 und 4. BMP9 zeigt verschiedene Effekte, einerseits inhibiert es die Angiogenese⁷³, andererseits aktiviert es die Proliferation von Endothelzellen.⁴⁴ BMP2 und 4 hingegen konnten in früheren Studien schon eine Vielzahl von Funktionen zugeschrieben werden. Dazu gehören Funktionen in der Entwicklung verschiedener Gewebe,³⁶ unterschiedliche Expression der BMPs in pathogenen Prozessen und vaskulären Erkrankungen⁴⁹ sowie proinflammatorische Eigenschaften.^{41, 50}

6.6 BMPs verändern die Zellmorphologie

Da ein Zusammenhang zwischen endothelialer Hyperpermeabilität und den transmembranen Proteinen Occludin und VE-Cadherin bekannt ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Zellmorphologie nach Behandlung des Endothels mit den unterschiedlichen BMPs untersucht. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist die Verbindung von Occludin und VE-Cadherin mit dem Aktinzytoskelett der Zelle. Bei Irritation der Zelle wird das Aktinzytoskelett aktiviert und die Zelle kontrahiert sich.¹ Occludin und VE-Cadherin werden durch die entstehenden zentripetalen Kräfte über ihre Verbindung zum Aktinzytoskelett zurück ins Zellinnere gezogen.^{1, 17} Es ist bekannt, dass inflammatorische Mediatoren wie z.B. TNF- α und Thrombin endotheliale Hyperpermeabilität durch Zellkontraktion verursachen. Daraus resultiert eine Zerstörung der Adhäsionsverbindungen.¹⁸

Das Aktinzytoskelett der Endothelzellen wurde nach Stimulation mit unterschiedlichen BMPs angefärbt. Auch hier wurden Unterschiede nach Stimulation mit den einzelnen BMPs deutlich. Nach Stimulation mit BMP2, BMP4 und BMP7 wirken die Aktinfasern verdickt, gerötet und in die Länge gezogen, was auf eine vermehrte Kontraktionsbereitschaft der Endothelzellen zurückzuführen ist. Nach Stimulation mit BMP9 war hingegen die Abnahme der Zell-Zellkontakte zu beobachten.

6.7 BMP-Modulatoren regulieren die endotheliale Barrierefunktion *in vitro*

Da in der vorliegenden Arbeit für BMP4 proinflammatorische und permeabilitätssteigernde Effekte auf das Endothel nachgewiesen werden konnten, ist es von hohem klinischen Interesse, eine Substanz zu finden, die diese negativen Effekte auf das Endothel hemmen könnte. Dafür wurden verschiedene BMP-Modulatoren untersucht, von denen bekannt ist, dass sie sich an BMPs binden und deren Interaktion mit dem BMP-Rezeptor blockieren können und somit das Auslösen einer Signalkaskade hemmen.⁵³ Es ist von anderen Untersuchungen bekannt, dass der BMP-Modulator BMPER sich antagonistisch auf den proinflammatorischen Effekt von BMP2 und 4 auswirkt.⁷⁴ Die Auswirkung von BMPER wurde sowohl am Epithel als auch am Endothel getestet. Am Endothel wirkt BMPER antiinflammatorisch, indem es die Expression von Adhäsionsmolekülen reduziert und somit die Leukozytenadhäsion am Endothel hemmt.⁷⁴ Am Epithel führt BMPER dagegen zu einem Schutz der Barrierefunktion durch die antagonistische Wirkung auf BMP2, wodurch die Reduktion von E-Cadherin unterdrückt wird.⁴³

In einem *in vitro* Experiment im Rahmen dieser Arbeit wurden die BMP-Modulatoren und deren Auswirkung auf die endotheliale Permeabilität überprüft, mit dem Resultat, dass Gremlin die endotheliale Durchlässigkeit reduziert. Gremlin ist ein Glykoprotein von dem aus vorhergehenden Studien,⁵³ in Übereinstimmung mit den hier vorliegenden Ergebnissen bekannt ist, dass es antagonistisch auf BMP2, 4 und 7 wirkt.

Anhand der Proteinexpressionsmessung im Western Blot konnte gezeigt werden, dass Gremlin als einziger getesteter BMP-Modulator die Expression von Occludin signifikant erhöht. Auch hier konnte im Rahmen dieser Arbeit wieder ein Zusammenhang zwischen den transmembranen Proteinen und deren Regulation auf die endotheliale Permeabilität gezeigt werden. Gremlin beeinflusst nicht nur die Permeabilität über die vermehrte Expression von Occludin, sondern wirkt zusätzlich antiinflammatorisch und sich positiv auf die Ausbildung neuer Gefäße der Chorioallantoismembran im Hühnerembryo aus, wie sich aus der Literatur entnehmen lässt.^{59, 61}

Nach Stimulation mit Noggin kommt es zu einer signifikanten Expressionssteigerung von VE-Cadherin. Für Noggin wurden in einer früheren Studie entzündungshemmende Eigenschaften am Endothel nachgewiesen, indem Noggin die Bildung von Sauerstoffradikalen in der Aorta hemmt.⁷⁵ Daraus lässt sich mutmaßen, dass sich nicht nur die BMPs differentiell unterschiedlich auf die Expression der transmembranen Proteine auswirken, sondern auch die BMP-Antagonisten unterschiedliche Wirkungsweisen zu haben scheinen. Damit konnte ein Zusammenhang zwischen der vermehrten Expression des transmembranen Proteins Occludin und der verbesserten endothelialen Barrierefunktion hergestellt werden. Perspektivisch wäre es sinnvoll, die Wirkung von Gremlin im Mausmodell zu untersuchen. Ein Modell unter inflammatorischen Bedingungen wäre beispielsweise denkbar, um zu testen, ob sich Gremlin protektiv auf die Migration von Entzündungszellen verhält. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob durch die Zugabe von Gremlin der proinflammatorische Effekt von BMP4 zu unterdrücken wäre.

Gelingt es, Gremlin in therapeutischen Dosen einzusetzen, kann sein antiinflammatorischer und protektiver Effekt entscheidend zur Entwicklung neuer Medikamente beitragen. Insbesondere ist der Einsatz von Gremlin in der Behandlung vaskulärer Erkrankungen, wie Arteriosklerose, pulmonale arterielle Hypertension und Sepsis denkbar.

7 Zusammenfassung

Einfluss bestimmter *bone morphogenetic proteins* auf die endotheliale Permeabilität

Erhöhte endotheliale Permeabilität ist die Ursache vieler vaskulärer Erkrankungen und führt zu Gewebsödemen und Entzündungen. Ursächlich für eine endotheliale Dysfunktion kann der Verlust der transmembranen Proteine Occludin und VE-Cadherin sein. Infolge einer Abnahme der endothelialen Zell-Zellkontakte kommt es zu einer Kontraktion und Umstrukturierung des Zytoskelettes, wodurch vermehrt immunrelevante Zellen durch den erweiterten endothelialen Spalt dringen können. Bone morphogenetic proteins (BMPs) spielen bei der endothelialen Inflammation eine wichtige Rolle. Die Wirkungsmechanismen der BMPs auf die endotheliale Permeabilität sind bis heute jedoch unbekannt. Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, ob und über welche Mechanismen, bestimmte BMPs und deren Modulatoren die endotheliale Permeabilität beeinflussen.

Um Permeabilität messbar zu machen, wurden im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* und *in vivo* Methoden etabliert. Zellkulturergebnisse wurden über einen Transwell gewonnen, in dessen oberes Kompartiment die zu testende Epithelschicht oder Endothelschicht auf einen Filter aufgetragen wurde. Als Permeabilitätsindikator fungierte ein fluoreszierender Farbstoff (FITC-Dextran) oder isolierte Immunzellen (PBMCs). Gemessen wurde die Menge des diffundierten Farbstoffes oder der transmigrierten PBMCs durch die Zellschicht, nach Stimulation der Zellen mit den BMPs oder ihren Modulatoren. *In vivo* wurden zur Permeabilitätsmessung Mäuse mit Bleomycin oder BMP4 behandelt. Als Permeabilitätsindikator fungierte hier der Farbstoff Evans Blue (EVB), der in die Schwanzvene injiziert wurde. Photometrisch quantifiziert wurde die Menge des Farbstoffes der in Herz, Lunge, Niere, bronchoalveoläre Lavage (BAL) und Aszitesflüssigkeit diffundieren konnte.

Nach Zellschädigung, verursacht durch Stimulation mit Bleomycin, wurde analysiert, ob die epitheliale und endotheliale Permeabilität zunimmt. *In vitro* im Transwell führt die Schädigung der Bronchialepithelzellen zu einer erhöhten FITC-Dextran Permeabilität. *In vivo* zeigten die Mäuse eine signifikant höhere EVB Diffusion in Lunge, Niere und BAL.

Nach Stimulation mit BMP2, 4, 7 und 9 konnte im Transwell ein signifikanter Permeabilitätsanstieg durch die Endothelzellschicht gemessen werden. *In vivo* zeigen Mäuse nach Stimulation mit rekombinanten murinen BMP4 i.p. eine signifikant höhere Evans Blue Diffusion in die Aszitesflüssigkeit und Herz, Lunge und Niere.

Vor hohem klinischem Interesse ist die Frage, ob sich BMPs auf die Transmigration von Entzündungszellen auswirken. *In vitro* wurde eine Inflammation durch TNF- α induziert und *in vivo* durch Thioglycolate. Nach BMP4 Stimulation nimmt die Anzahl der transmigrierten PBMCs *in vitro* durch die Endothelzellschicht zu. *In vivo* konnten nach BMP4 Stimulation mehr Leukozyten im Blut und in der Aszitesflüssigkeit gezählt werden.

Um festzustellen wie sich BMPs und deren Modulatoren auf die transmembranen Proteine auswirken, wurde die Expression von VE-Cadherin, Occludin und PECAM1 mit Hilfe eines Western Blots quantifiziert. Hierfür wurden Endothelzellen über drei Tage mit BMP2, 4, 7 und 9 stimuliert. Anschließend wurde die Protein Expression mit Antikörpern für VE-Cadherin, Occludin und PECAM1 im Western Blot sichtbar gemacht und quantifiziert. BMP2 und 4 führen zu einer signifikanten Reduktion von Occludin, BMP2, 4 und 7 reduzieren signifikant die Expression von VE-Cadherin. Diese Reduktion konnte für BMP4 mit Hilfe einer VE-Cadherin Färbung visuell dargestellt werden. Nach *knock down* von BMP4 kam es zu einem Anstieg von VE-Cadherin. BMP9 reduzierte als einziges getestetes BMP die Expression von PECAM1 signifikant. Auch in einer BMP9 Konzentrationsreihe und einer speziellen PECAM1-Färbung konnte die Reduktion von PECAM1 nach Stimulation mit BMP9 bestätigt werden. Zusätzlich wurde mit Hilfe einer Phalloidin-färbung gezeigt, dass die Stimulation mit BMP2, 4, 7 und 9 die Zellmorphologie des Endothels verändert und zu einer vermehrten Ausbildung von Stressfasern führt.

Um eine Substanz zu finden, die sich schützend auf die endotheliale Permeabilität auswirkt, wurde die Wirkung der BMP-Modulatoren Gremlin, Noggin, TSG, BMPER, LDN und Chordin auf die endotheliale Permeabilität getestet. Gremlin stärkt die endotheliale Barrierefunktion und führt zu einer gesteigerten Expression von Occludin.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmalig zwei Mitglieder der BMP Familie, BMP4 und Gremlin, mit gegensätzlicher Wirkung auf die endotheliale Permeabilität identifiziert werden. BMP4 führt zu einer erhöhten endothelialen Durchlässigkeit durch die Reduktion von Occludin und VE-Cadherin. Der BMP Antagonist Gremlin führt hingegen zu einer gesteigerten Barrierefunktion des Endothels durch die erhöhte Expression von Occludin. Die gezielte Hemmung der BMP Aktivität könnte zu neuen therapeutischen Ansatzpunkten in der Behandlung von Ödemen und Entzündungen führen.

8 Summary

Effects of specific bone morphogenetic proteins on endothelial permeability

Endothelial injury is a central finding in vascular disease and is accompanied by disruption of the endothelial barrier function leading to tissue edema and inflammation. Endothelial barrier dysfunction is caused by loss of transmembrane proteins such as Occludin and VE-cadherin, and by loss of cell-cell contacts and cytoskeletal contraction and reorganisation leading to paracellular gaps and penetration of protein-rich fluid and inflammatory cells. Bone morphogenetic proteins (BMPs) are important in endothelial inflammation, but their effects on endothelial permeability have not been investigated until now. The intention of this thesis is to determine, why and by which effects specific BMPs and their antagonists influence the endothelial permeability.

In this thesis, *in vitro* and *in vivo* methods were established to detect and to measure permeability. *In vitro*, a transwell was applied where epithelial or endothelial cells were seeded on the upper insert. As permeability indicators, fluorescent dye (FITC-dextran) or isolated immune cells (PBMCs) were inserted. The amount of diffused FITC-dextran or transmigrated PBMCs through the cell layer was measured after the stimulation of the endothelial cells by adding the BMPs or the BMP antagonists. For analyzing the endothelial permeability *in vivo*, mice were stimulated with bleomycin or BMP4 and subsequently injected with Evans blue (EVB) into the tail vein as permeability indicator. By using a spectrophotometer, the amount of diffused Evans blue in heart, lung, kidney, bronchioalveolar fluid (BAL), and ascites fluid was quantified.

After bleomycin induced injury of endothelial and epithelial cells, the content of diffused FITC-dextran was higher, compared to the untreated cells. *In vivo*, the content of EVB in lungs, kidneys, and BAL fluid was significantly higher after bleomycin stimulation.

In vitro, endothelial cells were seeded on transwell chambers and were cultured in the presence of BMPs. Stimulation with BMP2, 4, 7, and 9 enhanced the endothelial permeability. *In vivo*, mice were stimulated with recombinant murine BMP4. After three days, EVB was injected intravenously. In lung, kidneys, heart, and ascites the EVB content after BMP4 injection was significantly higher.

Inflammation was induced *in vitro* with TNF- α and *in vivo* with thioglycolate. After three days of additional BMP4 stimulation endothelial permeability was increased. *In vitro*, more PBMCs were able to transmigrate through the endothelial cell layer. *In vivo*, leukocytes in blood and leukocytes in ascites were significantly higher.

Bone morphogenetic proteins regulate protein expression of tight and adherens junctions in endothelial cells. Endothelial cells were exposed to BMP2, 4, and 7 and were lysed afterwards. The lysates were used for western blotting with anti-occludin, anti-VE-cadherin and anti-PECAM1 antibody. Using western blotting BMP2 and BMP4 decreased expression of occludin. After stimulation with BMP2, 4, and 7, the expression of VE-cadherin was

downregulated. Furthermore, the VE-cadherin expression in endothelial cells was shown by immunohistofluorescence and was down regulated after injection of BMP4. The VE-cadherin expression was increased after BMP4 knock down. BMP9 decreased the expression of PECAM1, depending on the BMP9 concentration, this was shown by western blotting and immunohistofluorescence. Bone morphogenetic proteins increase actin stress fiber formation and endothelial cell contraction. Therefore, endothelial cells were exposed to BMP2, 4, 7 and 9. The cells were fixed and actin cytoskeleton was stained with phalloidine.

To find a protein to protect the endothelial barrier function, endothelial cells were cultured in the presence of BMP-modulators Gremlin, Noggin, TSG, BMPER, LDN and Chordin, with the result that Gremlin decreased endothelial permeability due to upregulation of occludin.

In conclusion BMP4 and the BMP-antagonist Gremlin were identified as novel regulators of endothelial barrier function with opposing effects. While BMP4 increased endothelial leakage due to downregulation of occludin and VE-cadherin, antagonist of BMP activity Gremlin increased occludin expression and reduced endothelial permeability. Inhibition of BMP activity may open new therapeutic options in the treatment of edema and transmigration of inflammatory cells.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ALK	Actin receptor-like kinase
APS	Ammonium persulfate
Aqua a.i.	Aqua ad iniectabilia
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BEAS-2B	Humane Bronchialepithelzellen
BMP	Bone morphogenetic proteins
BMPER	BMP-binding endothelial cell precursor-derived regulator
BMPR	Bone morphogenetic proteins receptor
BSA	Bovines Serum Albumin
Cadherin	Ca ²⁺ dependent adhesion molecule
cDNA	komplementäre DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct-Wert	Cycle threshold Wert
Cy2	Cyanine dyes 2
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenyl-Indol-Dihydrochlorid
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Drm	Down regulated by v-mos-transformed rat embryonic fibroblasts
EBM	Endothelial Cell Basal Medium
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EVB	Evans Blue
FBS	Fetal bovine serum
FITC-Dextran	Fluorescein isothiocyanate-Dextran
Fik1	Fetal liver kinase 1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

HCL	Salzsäure
hRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase)
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
Id-1	Inhibition of differentiation-1
Ig	Immunglobulin
JAM	Junctional adhesion molecule
LDN	LDN-193189, BMP Inhibitor
MAPK	mitrogen-activated protein kinase
MCP1	Monocyte chemoattractant protein-1
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
OD	Optische Dichte
PAH	Pulmonale arterielle hypertension
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PBS (-/-)	Phosphate buffered saline ohne Ca und Mg
PBS (+/+)	Phosphate buffered saline mit Ca und Mg
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PECAM1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassay
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SiRNA	Small interfering RNA
TBST	Tris-Buffered Saline and Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktoren
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TSG	Twisted Gastrulation

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Tiere.....	18
Tabelle 2 Geräte.....	18
Tabelle 3 Gebrauchsmaterialien	19
Tabelle 4 Zellen	20
Tabelle 5 Zellmedien	20
Tabelle 6 Stimulationsreagenzien	21
Tabelle 7 Reagenzien für in vivo Versuche	22
Tabelle 8 SiRNA.....	23
Tabelle 9 Primer	23
Tabelle 10 Primärantikörper.....	23
Tabelle 11 Sekundärantikörper.....	24
Tabelle 12 RIPA-Puffer+SDS.....	24
Tabelle 13 Trenn- und Sammelgel-Puffer.....	24
Tabelle 14 Gele für Western Blot.....	24
Tabelle 15 Running-Puffer, Transfer-Puffer und TBS	25
Tabelle 16 Sonstige Reagenzien	25
Tabelle 17 Zellkonzentrationen für unterschiedliche Reaktionsgefäße	29
Tabelle 18 Zellstimulationen	29
Tabelle 19 Versuchsansatz für eine Proteinprobe.....	31
Tabelle 20 6xLoading-Dye	31
Tabelle 21 Ansatz 1 für SiRNA Transfektion	34
Tabelle 22 Ansatz 2 für SiRNA Transfektion	34
Tabelle 23 Formelbezeichnung Ct-Formel	35
Tabelle 24 Versuchsansatz für Realtime-PCR.....	35
Tabelle 25 Ablauf einer Realtime-PCR; Programmierung des iCycler	36

9.3 Abbildungen

Abbildung 1.1 Gegenüberstellung eines erweiterten endothelialen Spaltes und einer intakten Endothelzellschicht (Quelle modifiziert nach: Lee WL, Slutsky AS. Sepsis and endothelial permeability. <i>The New England journal of medicine</i> . 2010;363:689-691).	7
Abbildung 1.2 Verschiedene Transportvorgänge durch das Endothel (Quelle modifiziert nach: Heuvel Mvd. Blut-Hirn-Schranke: Kontrollinstanz an höchster Stelle. <i>Pharmazeutische Zeitung online</i> . 2013:Ausgabe 13/2012).....	9
Abbildung 1.3 VE-Cadherin und dessen Verbindung zum Aktinzytoskelett (Quelle modifiziert nach: Lee WL, Slutsky AS. Sepsis and endothelial permeability. <i>The New England journal of medicine</i> . 2010;363:689-691)	10
Abbildung 1.4 Occludin (Quelle modifiziert nach: Meek B. Histo epithelium 1. <i>Oklahoma State University - Center for Health Sciences</i> . 2012, www.studyblue.com ; (abgerufen am 10.05.2015))	11
Abbildung 1.5 PECAM1 (Quelle modifiziert nach: Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: Happy together. <i>Nature reviews Molecular cell biology</i> . 2004;5:261-270)	12
Abbildung 1.6 BMP Signalweg (Quelle modifiziert nach: Liu A, Niswander LA. Bone morphogenetic protein signaling and vertebrate nervous system development. <i>Nature reviews Neuroscience</i> . 2005;6:945-954)	14
Abbildung 4.1 Immundetektion (Quelle modifiziert nach: Reiners J. Molekulare Analyse des Gerüstproteins Harmonin in der Retina und seine zentrale Rolle im Usher-Syndrom. <i>Dissertation am Institut für Zoologie, Johannes Gutenberg Universität Mainz</i> . 2004)	32
Abbildung 4.2 Veranschaulichung einer Transfektion (Quelle modifiziert nach: Omid Y, Barar J, Coukos G. Cancer gene therapy: Targeted genomedicines. <i>Novel gene therapy approaches</i> . 2013;DOI: 10.5772/54739:Chapter 11)	33
Abbildung 4.3 Veranschaulichung eines Transwells zur Bestimmung der Permeabilität.....	38

9.4 Ergebnisse

5.1 Epitheliale und endotheliale Permeabilität nach Gabe von Bleomycin <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	
Ergebnis 5.1-A.....	42
Ergebnis 5.1-B, 5.1-C und 5.1-D.....	43
Ergebnis 5.1-E.....	44
5.2 BMPs und die endotheliale Permeabilität <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	
Ergebnis 5.2-A und 5.2-B.....	45
Ergebnis 5.2-C und 5.2-D	46
5.3 BMP4 und die Transmigration von Leukozyten und PBMCs	
Ergebnis 5.3-A und 5.3-B.....	47
Ergebnis 5.3-C und 5.3-D	48
5.4 BMPs und die Expression transmembraner Proteine	
Ergebnis 5.4-A und 5.4-B.....	49
Ergebnis 5.4-C.....	50
Ergebnis 5.4-D, 5.4-E und 5.4-F	51
5.5 BMP9 und die Expression von PECAM1	
Ergebnis 5.5-A und 5.5-B.....	52
Ergebnis 5.5-C.....	52
5.6 BMPs und die Zellmorphologie der Endothelzelle	
Ergebnis 5.6-A.....	53
5.7 BMP-Modulatoren und die endotheliale Barrierefunktion <i>in vitro</i>	
Ergebnis 5.7-A.....	54
Ergebnis 5.7-B und 5.7-C.....	55

9.5 Literaturverzeichnis

1. Lee WL, Slutsky AS. Sepsis and endothelial permeability. *The New England journal of medicine*. 2010;363:689-691
2. Libby P, Aikawa M, Jain MK. Vascular endothelium and atherosclerosis. *Handbook of experimental pharmacology*. Springer, Berlin Heidelberg New-York; 2006:285-306
3. Langenfeld EM, Bojnowski J, Perone J, Langenfeld J. Expression of bone morphogenetic proteins in human lung carcinomas. *The Annals of thoracic surgery*. 2005;80:1028-1032
4. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *The New England journal of medicine*. 1989;320:365-376
5. Liebich H-G. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. *Schattauer*, Stuttgart; 10.2003;4. Auflage:130-131
6. Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiological reviews*. 2006;86:279-367
7. VJ. Burton LC, AM. Holmes, DM. Rodman, C. Walker and DC. Budd. Bone morphogenetic protein receptor 2 regulates pulmonary artery endothelial cell barrier function. *Blood*. 2011;117:330-341
8. Minshall RD, Sessa WC, Stan RV, Anderson RG, Malik AB. Caveolin regulation of endothelial function. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2003;285:L1179-1183
9. Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB. Regulation of endothelial junctional permeability. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1123:134-145
10. Heuvel Mvd. Blut-Hirn-Schranke: Kontrollinstanz an höchster Stelle. *Pharmazeutische Zeitung online*. Govi-Verlag, Eschborn; 2013:Ausgabe 13/2012
11. Simionescu N, Simionescu M, Palade GE. Open junctions in the endothelium of the postcapillary venules of the diaphragm. *The Journal of cell biology*. 1978;79:27-44
12. Dejana E. Endothelial adherens junctions: Implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 1996;98:1949-1953
13. Lampugnani MG, Dejana E. Interendothelial junctions: Structure, signaling and functional roles. *Current opinion in cell biology*. 1997;9:674-682
14. Legrand P, Bibert S, Jaquinod M, Ebel C, Hewat E, Vincent F, Vanbelle C, Concord E, Vernet T, Gulino D. Self-assembly of the vascular endothelial cadherin ectodomain in a Ca^{2+} -dependent hexameric structure. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:3581-3588
15. Lampugnani MG, Corada M, Caveda L, Breviario F, Ayalon O, Geiger B, Dejana E. The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: Differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (ve-cadherin). *The Journal of cell biology*. 1995;129:203-217
16. Xia X, Mariner DJ, Reynolds AB. Adhesion-associated and pkc-modulated changes in serine/threonine phosphorylation of p120-catenin. *Biochemistry*. 2003;42:9195-9204
17. Moy AB, Van Engelenhoven J, Bodmer J, Kamath J, Keese C, Giaever I, Shasby S, Shasby DM. Histamine and thrombin modulate endothelial focal adhesion through centripetal and centrifugal forces. *The Journal of clinical investigation*. 1996;97:1020-1027
18. Lin Z, Natesan V, Shi H, Dong F, Kawanami D, Mahabeleshwar GH, Atkins GB, Nayak L, Cui Y, Finigan JH, Jain MK. Kruppel-like factor 2 regulates endothelial barrier function. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30:1952-1959
19. Broermann A, Winderlich M, Block H, Frye M, Rossaint J, Zarbock A, Cagna G, Linnepe R, Schulte D, Nottebaum AF, Vestweber D. Dissociation of ve-ctp from ve-cadherin is required for leukocyte extravasation and for vegf-induced vascular permeability in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208:2393-2401

20. Gotsch U, Borges E, Bosse R, Boggemeyer E, Simon M, Mossmann H, Vestweber D. Ve-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *Journal of cell science*. 1997;110 (Pt 5):583-588
21. Gory-Faure S, Prandini MH, Pointu H, Roullot V, Pignot-Paintrand I, Vernet M, Huber P. Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development*. 1999;126:2093-2102
22. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *The Journal of cell biology*. 1963;17:375-412
23. Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochimica et biophysica acta*. 2008;1778:588-600
24. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of cell biology*. 1993;123:1777-1788
25. Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. Direct association of occludin with zo-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *The Journal of cell biology*. 1994;127:1617-1626
26. Van Itallie CM, Anderson JM. Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts. *Journal of cell science*. 1997;110 (Pt 9):1113-1121
27. Meek B. Histo epithelium 1. *Oklahoma State University - Center for Health Sciences*. 2012:www.studyblue.com; (abgerufen am 10.05.2015)
28. Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: Happy together. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2004;5:261-270
29. Privratsky JR, Newman PJ. Pecam-1: Regulator of endothelial junctional integrity. *Cell and tissue research*. 2014;355:607-619
30. Newman PJ. The biology of pcam-1. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100:S25-29
31. Newman PJ, Newman DK. Signal transduction pathways mediated by pcam-1: New roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003;23:953-964
32. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. Pecam-1: A multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2514-2523
33. Privratsky JR, Newman DK, Newman PJ. Pecam-1: Conflicts of interest in inflammation. *Life sciences*. 2010;87:69-82
34. Qin WD, Mi SH, Li C, Wang GX, Zhang JN, Wang H, Zhang F, Ma Y, Wu DW, Zhang M. Low shear stress induced hmgb1 translocation and release via pcam-1/parp-1 pathway to induce inflammation response. *PloS one*. 2015;10:e0120586
35. Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science*. 1965;150:893-899
36. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *Journal of biochemistry*. 2010;147:35-51
37. Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine & growth factor reviews*. 1998;9:49-61
38. Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA, Wozney JM. Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87:9843-9847
39. Massague J, Chen YG. Controlling tgf-beta signaling. *Genes & development*. 2000;14:627-644
40. David L, Feige JJ, Bailly S. Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine & growth factor reviews*. 2009;20:203-212
41. Csiszar A, Ahmad M, Smith KE, Labinskyy N, Gao Q, Kaley G, Edwards JG, Wolin MS, Ungvari Z. Bone morphogenetic protein-2 induces proinflammatory endothelial phenotype. *American journal of pathology*. 2006;168:629-638
42. Csiszar A, Labinskyy N, Smith KE, Rivera A, Bakker EN, Jo H, Gardner J, Orosz Z, Ungvari Z. Downregulation of bone morphogenetic protein 4 expression in coronary arterial endothelial cells: Role of shear stress and the camp/protein kinase a pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27:776-782

43. Helbing T, Herold EM, Hornstein A, Wintrich S, Heinke J, Grundmann S, Patterson C, Bode C, Moser M. Inhibition of bmp activity protects epithelial barrier function in lung injury. *The Journal of pathology*. 2013;231:105-116
44. Suzuki Y, Ohga N, Morishita Y, Hida K, Miyazono K, Watabe T. Bmp-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. *Journal of cell science*. 2010;123:1684-1692
45. Brown MA, Zhao Q, Baker KA, Naik C, Chen C, Pukac L, Singh M, Tsareva T, Parice Y, Mahoney A, Roschke V, Sanyal I, Choe S. Crystal structure of bmp-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280:25111-25118
46. Valdimarsdottir G, Goumans MJ, Rosendahl A, Brugman M, Itoh S, Lebrin F, Sideras P, ten Dijke P. Stimulation of id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells. *Circulation*. 2002;106:2263-2270
47. Cai J, Pardali E, Sanchez-Duffhues G, ten Dijke P. Bmp signaling in vascular diseases. *FEBS letters*. 2012;586:1993-2002
48. Liu A, Niswander LA. Bone morphogenetic protein signaling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6:945-954
49. Cai J, Pardali E, Sanchez-Duffhues G, ten Dijke P. Bmp signaling in vascular diseases. *FEBS Lett*. 586:1993-2002
50. Sorescu GP, Song H, Tressel SL, Hwang J, Dikalov S, Smith DA, Boyd NL, Platt MO, Lassegue B, Griendling KK, Jo H. Bone morphogenetic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a nox1-based nadph oxidase. *Circulation research*. 2004;95:773-779
51. Miriyala S, Gongora Nieto MC, Mingone C, Smith D, Dikalov S, Harrison DG, Jo H. Bone morphogenetic protein-4 induces hypertension in mice: Role of noggin, vascular nadph oxidases, and impaired vasorelaxation. *Circulation*. 2006;113:2818-2825
52. Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, Tordoir JH, Spronk HM, Vermeer C, Daemen MJ. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001;21:1998-2003
53. Balemans W, Van Hul W. Extracellular regulation of bmp signaling in vertebrates: A cocktail of modulators. *Developmental biology*. 2002;250:231-250
54. Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocrine reviews*. 2003;24:218-235
55. Moser M, Binder O, Wu Y, Aitsebaomo J, Ren R, Bode C, Bautch VL, Conlon FL, Patterson C. Bmper, a novel endothelial cell precursor-derived protein, antagonizes bone morphogenetic protein signaling and endothelial cell differentiation. *Molecular and cellular biology*. 2003;23:5664-5679
56. Yu PB, Deng DY, Lai CS, Hong CC, Cuny GD, Bouxsein ML, Hong DW, McManus PM, Katagiri T, Sachidanandan C, Kamiya N, Fukuda T, Mishina Y, Peterson RT, Bloch KD. Bmp type i receptor inhibition reduces heterotopic [corrected] ossification. *Nature medicine*. 2008;14:1363-1369
57. Boergemann JH, Kopf J, Yu PB, Knaus P. Dorsomorphin and ldn-193189 inhibit bmp-mediated smad, p38 and akt signaling in c2c12 cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2010;42:1802-1807
58. Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM. The spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell*. 1996;86:599-606
59. Chen B, Blair DG, Plisov S, Vasiliev G, Perantoni AO, Chen Q, Athanasiou M, Wu JY, Oppenheim JJ, Yang D. Cutting edge: Bone morphogenetic protein antagonists drm/gremlin and dan interact with slits and act as negative regulators of monocyte chemotaxis. *Journal of immunology*. 2004;173:5914-5917
60. Lu MM, Yang H, Zhang L, Shu W, Blair DG, Morrisey EE. The bone morphogenetic protein antagonist gremlin regulates proximal-distal patterning of the lung. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2001;222:667-680

61. Stabile H, Mitola S, Moroni E, Belleri M, Nicoli S, Coltrini D, Peri F, Pessi A, Orsatti L, Talamo F, Castronovo V, Waltregny D, Cotelli F, Ribatti D, Presta M. Bone morphogenetic protein antagonist drm/gremlin is a novel proangiogenic factor. *Blood*. 2007;109:1834-1840
62. Reiners J. Molekulare Analyse des Gerüstproteins Harmonin in der Retina und seine zentrale Rolle im Usher-Syndrom. *Dissertation am Institut für Zoologie, Johannes Gutenberg Universität Mainz*. 2004
63. Omid Y, Barar J, Coukos G. Cancer gene therapy: Targeted genomeditines. *Novel gene therapy approaches*. 2013;DOI: 10.5772/54739:Chapter 11
64. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2008;295:L379-399
65. Sausville EA, Peisach J, Horwitz SB. A role for ferrous ion and oxygen in the degradation of DNA by bleomycin. *Biochemical and biophysical research communications*. 1976;73:814-822
66. Tam A, Wadsworth S, Dorscheid D, Man SF, Sin DD. The airway epithelium: More than just a structural barrier. *Therapeutic advances in respiratory disease*. 2011;5:255-273
67. Beers MF, Morrisey EE. The three r's of lung health and disease: Repair, remodeling, and regeneration. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121:2065-2073
68. Csiszar A, Labinskyy N, Jo H, Ballabh P, Ungvari Z. Differential proinflammatory and prooxidant effects of bone morphogenetic protein-4 in coronary and pulmonary arterial endothelial cells. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2008;295:H569-577
69. Kumar P, Shen Q, Pivetti CD, Lee ES, Wu MH, Yuan SY. Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: Implications in inflammation. *Expert reviews in molecular medicine*. 2009;11:e19
70. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oosthuysen B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the ve-cadherin gene in mice impairs vegf-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*. 1999;98:147-157
71. Fainaru O, Adini I, Benny O, Bazinet L, Pravda E, D'Amato R, Folkman J. Doxycycline induces membrane expression of ve-cadherin on endothelial cells and prevents vascular hyperpermeability. *FASEB journal*. 2008;22:3728-3735
72. Schulte D, Kuppers V, Dartsch N, Broermann A, Li H, Zarbock A, Kamenyeva O, Kiefer F, Khandoga A, Massberg S, Vestweber D. Stabilizing the ve-cadherin-catenin complex blocks leukocyte extravasation and vascular permeability. *The EMBO journal*. 2011;30:4157-4170
73. Ogunjimi AA, Briant DJ, Pece-Barbara N, Le Roy C, Di Guglielmo GM, Kavsak P, Rasmussen RK, Seet BT, Sicheri F, Wrana JL. Regulation of smurf2 ubiquitin ligase activity by anchoring the e2 to the hect domain. *Molecular cell*. 2005;19:297-308
74. Helbing T, Rothweiler R, Ketterer E, Goetz L, Heinke J, Grundmann S, Duerschmied D, Patterson C, Bode C, Moser M. Bmp activity controlled by bmp6 regulates the proinflammatory phenotype of endothelium. *Blood*. 2011;118:5040-5049
75. Koga M, Engberding N, Dikalova AE, Chang KH, Seidel-Rogol B, Long JS, Lassegue B, Jo H, Griendling KK. The bone morphogenetic protein inhibitor, noggin, reduces glycemia and vascular inflammation in db/db mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2013;305:H747-755

9.6 Publikationsverzeichnis

Helbing T, Herold EM, Hornstein A, Wintrich S, Heinke J, Grundmann S, Patterson C, Bode C, Moser M. Inhibition of bmp activity protects epithelial barrier function in lung injury. *The Journal of pathology*. 2013;231:105-116

9.7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen besonderen Menschen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet haben.

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Moser für seine kompetente Hilfe bei schwierigen Fragestellungen und für seine gute Betreuung während der gesamten Zeit bedanken. Auch bei Prof. Dr. Johanna Plendl möchte ich mich für den netten Empfang in Berlin bedanken und dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat, mein Projekt vor vielen interessierten Studenten in ihrem Seminar in Berlin vorzustellen.

Dr. Thomas Helbing gilt ein ganz besonderer Dank für seine Betreuung meiner experimentellen Arbeit im Labor und für seinen unermüdlichen, sprühenden Ideenreichtum, der mich während meiner experimentellen Laborphase stets vorantrieb und mich motivierte.

Ein großer Dank geht auch an die lieben Mitarbeiter im Labor, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Vor allem möchte ich Adrian Bauer danken, der mir bei größeren Experimenten sehr geholfen hat und der mich auch menschlich durch seine beeindruckende positive Art immer wieder aufheitern konnte.

Ein weiteres Dankeschön geht an meine Mitdoktorandinnen der Arbeitsgruppe, mit denen ich mich bei Fragestellungen austauschen konnte und die mir die Zeit im Labor verschönert haben.

Vielen Dank an alle die mich während des Schreibens unterstützt haben: Malvine Stecher für die Hilfe bei der graphischen Gestaltung der Abbildungen, Imke Driemel für die sprachliche Korrektur und ein besonderes Dankeschön geht an Simon Barke, der mir stets aufbauend zu Seite stand.

Doch der größte Dank gebührt meinen Eltern, die mich während meines gesamten Studiums und der Doktorarbeit unterstützt haben und die stets an mich geglaubt haben. Ohne sie wäre es nicht möglich gewesen, die Doktorarbeit direkt nach dem Tiermedizinstudium zu bewältigen. Auch meiner Schwester Annette möchte ich danken, die immer ein offenes Ohr für mich hat und für mich da ist.

9.8 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 19.05.2015

Alexandra Hornstein