

---

# **Regulatorische Effekte der Tyrosinphosphatase SHP-2 auf die endotheliale Permeabilität**

**Georg Hupel**

---



München 2019

Aus dem Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie  
(im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin, WBex),  
der Ludwig-Maximilians-Universität München,  
komm. Vorstand: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

## **Regulatorische Effekte der Tyrosinphosphatase SHP-2 auf die endotheliale Permeabilität**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
**Georg Hupel**  
aus Halle (Saale)

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät,  
der Universität München

Berichterstatlerin: PD. Dr. rer. nat. Hanna Mannell

Mitberichterstatler: Prof. Dr. Andrej Khandoga  
Prof. Dr. Andreas Schober

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hicckel

Tag der mündlichen Prüfung: 10.01.2019

*Meinen Eltern*

*Swantje und Andreas*

*Und Großeltern*

*Ina, Sigrid, Bernd und Klaus*



## Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	1
1 Einleitung.....	2
1.1 Endotheliale Permeabilität.....	2
1.1.1 Permeabilität im Rahmen pathologischer Prozesse.....	2
1.1.2 Anatomie von Blutgefäßen und des Endothels.....	4
1.1.3 Funktion und Regulation der Endothelialen Barriere.....	5
1.2 Tyrosinphosphatase SHP-2.....	13
1.2.1 Die klinische Bedeutung von SHP-2.....	13
1.2.2 Vorkommen und Funktion von SHP-2.....	14
1.2.3 SHP-2 in intrazellulären Signalkaskaden und der Regulation der Permeabilität.....	15
1.3 Zielsetzung.....	19
2 Material und Methodik.....	21
2.1 Material.....	21
2.2 Puffer und Lösungen.....	23
2.3 Geräte.....	26
2.4 Zellen und Zellkultur.....	27
2.4.1 Medien und Lösungen.....	27
2.4.2 Zellen.....	27
2.4.3 Kultivierung.....	28
2.4.4 Stimulation von Zellen.....	28
2.4.5 Transduktion von HUVEC mittels lentiviralem Gentransfers.....	28
2.5 Western Blot.....	29
2.5.1 Material.....	29
2.5.2 Prozedere.....	29
2.6 Quantitative reverse Transkriptase-PCR.....	32
2.6.1 Material.....	32

2.6.2	Prozedere.....	33
2.7	Immunofluoreszenz .....	34
2.7.1	Material .....	34
2.7.2	Prozedere.....	34
2.8	Transendotheliale elektr. Widerstandsmessung (TEER) .....	35
2.8.1	Material .....	35
2.8.2	Prozedere.....	35
2.9	Permeabilitäts- und Leukozyten-Extravasation-Assay in vivo.....	36
2.9.1	Material .....	36
2.9.2	Tierversuchsgenehmigung und Haltungsbedingungen .....	36
2.9.3	Anästhesie.....	37
2.9.4	Präparation des Musculus cremaster.....	37
2.9.5	Messung der Endothelpermeabilität.....	37
2.9.6	Messung der Leukozyten-Extravasation .....	38
2.10	Statistische Auswertung .....	39
3	Ergebnisse.....	40
3.1	Die Bedeutung der Aktivität von SHP-2 für die Aufrechterhaltung der endothelialen Barriere.....	40
3.1.1	Ein Funktionsverlust von SHP-2 erhöht die endotheliale Permeabilität in vitro.....	40
3.1.2	Die Inhibition der Aktivität von SHP-2 zeigt eine erhöhte IL-1 $\beta$ -induzierte Permeabilität in vivo.....	45
3.1.3	Die pharmakologische Hemmung der SHP-2 Aktivität fördert die Extravasation von Leukozyten in vivo .....	47
3.2	SHP-2 beeinflusst die Proteinmenge von Tight-Junction-Proteinen in Endothelzellen.....	49
3.2.1	Nachweis von Tight-Junction-Proteinen in HUVEC.....	49
3.2.2	IL-1 $\beta$ hat keinen Einfluss auf die Proteinmengen von Claudin-5, ZO-1 und Occludin .....	51

3.2.3	Der Verlust der Phosphatasefunktion von SHP-2 führt zu erniedrigten Proteinmengen von Claudin-5, ZO-1 und Occludin, nicht aber von VE-Cadherin.....	52
3.2.4	SHP-2 hat keinen Einfluss auf den Abbau von Tight-Junction-Proteinen.....	54
3.2.5	SHP-2 wird für die Expression von Tight-Junction-Proteinen benötigt ...	56
4	Diskussion.....	58
4.1	Die Aktivität von SHP-2 hat Einfluss auf die endotheliale Permeabilität .....	58
4.2	Die Phosphatasefunktion von SHP-2 beeinflusst die Leukozyten-Extravasation.....	66
4.3	Eine Inaktivierung von SHP-2 führt zu einer geringeren Expression von Tight-Junction-Proteinen.....	69
4.4	Ausblick in Forschung und klinischer Anwendung .....	73
5	Zusammenfassung .....	78
6	Veröffentlichungen .....	80
7	Anhang.....	81
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	81
7.2	Literaturverzeichnis.....	82
7.3	Tabellenverzeichnis .....	88
7.4	Abbildungsverzeichnis .....	89
7.5	Lebenslauf .....	90
8	Danksagung.....	91
9	Eidesstattliche Versicherung.....	92

## Vorwort

---

### *“Tumor, Rubor, Calor & Dolor”*

Schon Aulus Cornelius Celsus (25 v. Chr. bis 50 n. Chr.) beschrieb die vier Kardinalzeichen einer Entzündung: Tumor (Schwellung), Rubor (Rötung), Calor (Überwärmung) und Dolor (Schmerz) [1].

Auch heute noch prägen die Pathomechanismen der Entzündung das klinische Bild im Krankenhaus. Die Erforschung dieser komplexen Zusammenhänge verbesserte die Behandlung von zahlreichen Patienten und bleibt wichtiger Gegenstand der Wissenschaft zur immerwährenden Vermehrung des Wissens zum Wohle der Menschheit.

# 1 Einleitung

---

## 1.1 Endotheliale Permeabilität

### 1.1.1 Permeabilität im Rahmen pathologischer Prozesse

Eine gestörte Regulation der Durchlässigkeit von Blutgefäßen ist bei zahlreichen verschiedenen Krankheiten relevant und trägt zu deren Entstehung und Prognose maßgeblich bei [2]. Die endotheliale Barriere zeigt dabei eine Zunahme der Permeabilität im Rahmen pathologischer Prozesse, wie zum Beispiel bei Entzündungen, Durchblutungsstörungen oder auch bei malignen Entartungen [2, 3].

#### *Entzündungen*

Im Rahmen von akuten Entzündungsreaktion ist die vaskuläre Permeabilität von entscheidender Bedeutung. Bei dem *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) kommt es stressinduziert zu einem rapiden Anstieg der Permeabilität in Lungengefäßen [4]. Das führt zu einer Extravasation von Plasma in das Interstitium bis in die Alveolen. Das so entstandene Gewebsödem schränkt den Gasaustausch massiv ein und führt zu lebensbedrohlichen Zuständen [5]. Aber auch im Vollbild einer fulminanten unkontrollierten Entzündungsreaktion, der Sepsis, kommt es zu einer Flüssigkeitsverschiebung in den Extravasalraum durch eine generalisierte Permeabilitätszunahme und dadurch zu einer erheblichen Störung der Zirkulation [3, 6]. Der relative Volumenmangel führt zum Herzkreislauf-Schock mit arterieller Hypotension und Minderperfusion in lebenswichtigen Organen [6]. Im Rahmen einer Sepsis sind zahlreiche Zytokine involviert. Es kommt zu einer vermehrten Ausschüttung von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , aber auch IL-6 und INF- $\gamma$  [7]. Bisherige therapeutische Ansätze zielen auf eine massive Volumensubstitution ab, was bei anhaltender Dysfunktion des Endothels zu einer weiteren Extravasation von Flüssigkeit führen kann [6]. Es kommt folglich zu massiven Ödemen an den Extremitäten aber auch an Organen, wie Lunge, Leber und Niere, die die Funktion der Organe stark beeinträchtigen können [6, 8]. Dieser Zustand ist lebensbedrohlich und bedarf intensivmedizinischer Betreuung [6, 8]. Neue konservative

Behandlungsansätze könnten sich aus einer Regulation der Permeabilität zu einer verstärkten endothelialen Barriere ergeben.

### *Durchblutungsstörungen*

Die Permeabilität ist auch im Rahmen von ischämischen Zuständen von großer Bedeutung. Nach einem Schlaganfall kommt es im Gehirn zu einem Gewebsödem. Eine Störung der Endothelzellen und der Bluthirnschranke führt zu einer Flüssigkeitsverschiebung in das umliegende Gewebe [9]. Spezielle Zell-Zell-Kontakte, Tight-Junctions (TJ), sind gerade in Blutgefäßen im Gehirn besonders stark ausgeprägt und tragen maßgeblich zur Aufrechterhaltung der Bluthirnschranke bei [10]. Aber auch bei einem Herzinfarkt spielt der Zusammenbruch der endothelialen Barriere eine besondere Rolle. Im infarzierten Areal kommt es innerhalb von wenigen Stunden über VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) zu einer erhöhten Permeabilität, die zum Austritt von Plasma sowie Erythrozyten führt [2]. Auf der einen Seite schädigt das Ödem zusätzlich das ischämische Gewebe, auf der anderen Seite führt die VEGF induzierte Signalkaskade zu einer Revaskularisierung und einem langfristigen Überleben der Myozyten [2].

### *Maligne Entartungen*

Es gibt sowohl gutartige als auch bösartige Neoplasien. Gerade bei bösartigen Neoplasien spielen Blutgefäße eine entscheidende Rolle. So ist die Neovaskularisierung des schnellwachsenden Tumors wichtig, da diese dafür sorgt, dass der Tumor weiterhin mit ausreichend Nährstoffen und Sauerstoff versorgt wird [11]. Viele Tumorzellen sezernieren Hormone, wie VEGF, die diesen Prozess zusätzlich unterstützen [11]. Im Rahmen der Gefäßneubildung kommt es durch VEGF auch zu einer Permeabilitätszunahme, die auf eine gestörte Endothelzell-Zell Interaktion zurückzuführen ist. Darüber hinaus ist es denkbar, dass Endothelzellen an der Metastasierung von Tumoren beteiligt sind [1]. Durch den physiologischen Aufbau der Blutgefäße wird verhindert, dass Zellen aus dem Gewebe in die Blutbahn geraten. Ist die Integrität dieser Barriere gestört, kann der Tumor in Gefäße einbrechen. Es kommt zur Verschleppung von Tumorzellen, der hämatogenen Metastasierung [1, 12]. Auf der anderen Seite behindert die besonders stark ausgebildete Barriere der Bluthirnschranke die Arzneimittelverteilung im Gehirn [13]. Im Rahmen von malignen zerebralen Neoplasien, wie dem Glioblastom, könnten

Chemotherapeutika durch eine gezielte Auflösung der Bluthirnschranke eine höhere Konzentration am Tumor erzielen und damit die Prognose verbessern [14, 15]. Darüber hinaus könnte sich dadurch das Spektrum der einsetzbaren Pharmaka deutlich erhöhen. Bisherige Chemotherapeutika, wie Temozolomid, sind vor allem lipophil, um in das zentrale Nervensystem gelangen zu können [16]. Durch die Auflösung der Bluthirnschranke könnten auch hydrophilere Substanzen eingesetzt werden.

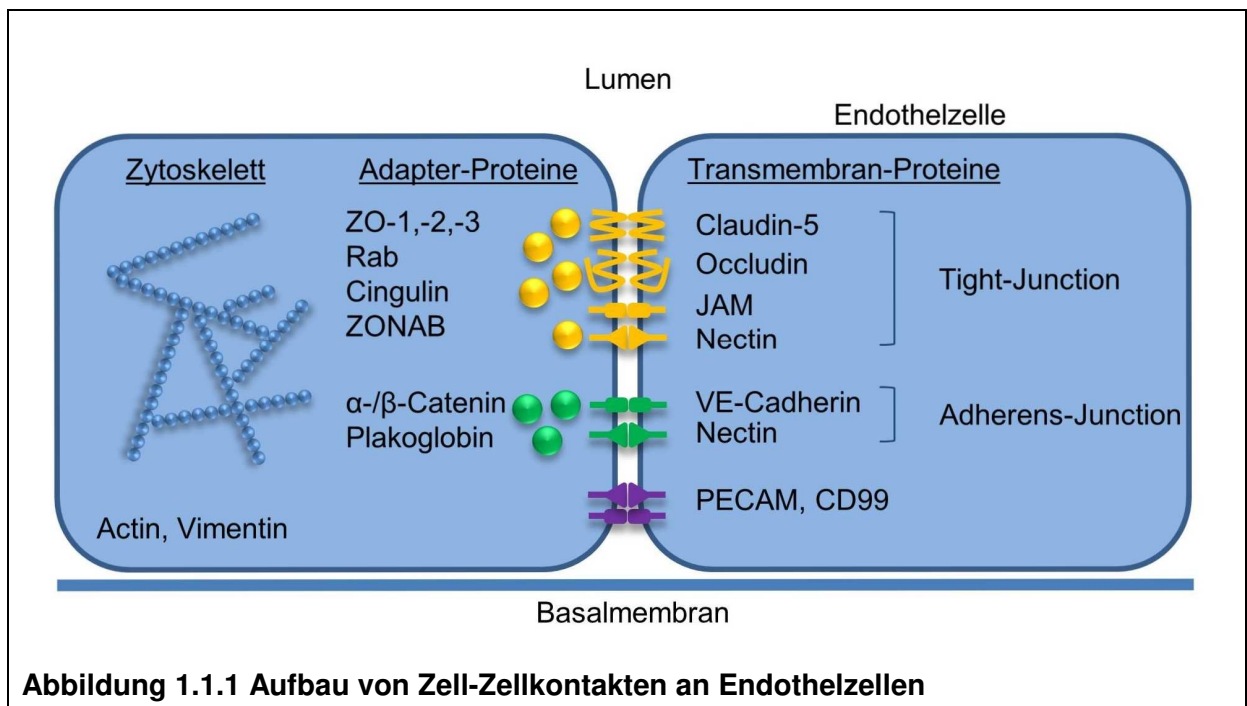
Die Regulation der Permeabilität der Gefäße ist somit ein wichtiger Fokus der wissenschaftlichen Forschung. Endothelzellen übernehmen dabei eine wichtige Rolle im Rahmen von physiologischen und pathologischen Prozessen. Durch die Erforschung der Funktion des Endothels und der Regulation der Permeabilität könnten sich neue Behandlungskonzepte für eine Vielzahl an Krankheiten ergeben.

### **1.1.2 Anatomie von Blutgefäßen und des Endothels**

Das Blutgefäßsystem gliedert sich in Arterien, die vom Herz wegführen und in Venen, die zum Herz hinführen. Beide Gefäßarten haben einen ähnlichen Aufbau. Die äußerste Schicht wird von der Tunica adventitia gebildet, die die Gefäße mit dem umliegenden Gewebe verbindet. Daran angrenzend ist die Tunica media, die aus glatter Gefäßmuskulatur besteht. Die innerste Auskleidung der Gefäße wird von den Endothelzellen gebildet – der Tunica intima [17]. Diese bilden einen Monolayer und stehen durch Zell-Zell-Kontakte (Junctions) in Verbindung, die die Zellen zirkumferentiell umgeben [18].

Die Zell-Zell-Kontakte werden unter anderem von Tight-Junctions (TJ) und Adhärenz-Junctions (AJ) gebildet [19]. Da TJ und AJ in Endothelzellen sowie in Epithelzellen vorkommen, werden zur Erforschung von Zell-Zell-Kontakten sowohl Erkenntnisse aus Experimenten mit Epithelien als auch mit Endothelien herangezogen [19]. In Endothelzellen bilden TJ ein gürtelförmiges Netzwerk, das die Zellen umgibt [18]. Im Unterschied zu polarisierten Epithelien sind in Endothelzellen die TJ nicht nur vorwiegend an der apikalen Seite von den AJ, sondern bilden ein sich vermischendes Netzwerk aus AJ- und TJ-Strängen [20]. Transmembranproteine stellen die Zell-Zell-Kontakte an den Junctions her und sind über Adapterproteine mit dem Zytoskelett der Zelle verbunden. An den TJ finden sich Transmembranproteine

wie Claudin-5, Occludin, JAM, Nectin sowie Adaptermoleküle wie ZO-1, ZONAB und Cingulin [21-26]. Die Adherens-Junctions in Endothelzellen werden von dem Transmembranprotein VE-Cadherin, aber auch von Adapterproteinen wie  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Catenin, p120, Plakoglobin gebildet. Eine Vielzahl von Proteinen, unter anderem auch ZONAB und  $\beta$ -Catenin, haben zusätzlich Funktionen für Signalwege der Zellen und können auch in den Zellkern translozieren [27-31]. Darüber hinaus gibt es noch weitere Proteine die an Zell-Zell-Kontakten von Endothelzellen beteiligt sind, zum Beispiel PECAM oder CD99 [32, 33] (Abbildung 1.1.1).



### 1.1.3 Funktion und Regulation der Endothelialen Barriere

#### *Das Endothel*

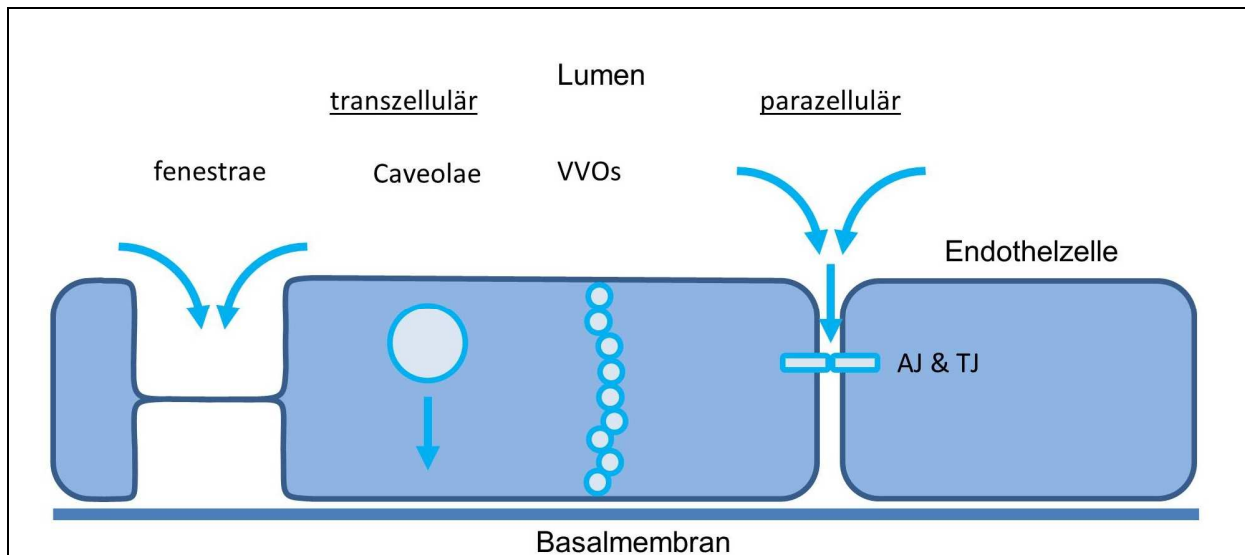
Für die Aufrechterhaltung der Homöostase zwischen der intra- und extravasalen Flüssigkeitsverteilung nimmt das Endothel eine zentrale Funktion ein. Darüber hinaus ist es an der Regulation von Entzündungen beteiligt und spielt eine wichtige Rolle in der Angiogenese, der Blutdruckregulation und der Blutgerinnung [17].

#### *Formen der Permeabilität*

Das Endothel bildet eine semipermeable Barriere zwischen Blut und Gewebe. Somit verhindert es den unkontrollierten Austritt von Zellen, Proteinen und Ionen aus den Blutgefäßen in das umliegende Interstitium [34]. Die Permeabilität beschreibt die



kontrollierte Diffusion über diese Barriere hinweg [35]. Es konnte gezeigt werden, dass es mehrere Wege für diesen Transport gibt. Man unterscheidet zwischen der parazellulären und der transzellulären Permeabilität. Die parazelluläre Permeabilität findet vorwiegend in pathologischen Zuständen statt, wie bei Entzündungsreaktionen oder auch bei der Tumorangio-genese [36]. Für diese Aufgabe sind AJ und TJ von entscheidender Bedeutung. Der transzelluläre Transport hingegen findet eher im physiologischen Zustand statt. Zu ihm werden gezählt: Der Caveolae-abhängige Transport, hierbei werden Vesikel von der apikalen zur basolateralen Seite der Zellen transportiert. Vesikulo-vakuläre Organellen (VVO) formen röhrenähnliche Strukturen über die Zellen hinweg, über die Stoff und Flüssigkeitsaustausch stattfinden kann. Eine weitere Form ist das fenestrierte Endothel, das zum Beispiel in der Niere vorkommt [36] (Abbildung 1.1.2).



**Abbildung 1.1.2 Vergleich von parazellulärer mit transzellulärer Permeabilität**

Zu der transzellulären Permeabilität zählt das fenestrierte Endothel (fenestrae), die Caveolae sowie die Vesikulo-vakulären Organellen (VVO). Der transzelluläre Transport steht im ruhenden physiologischen Zustand der Endothelzellen im Vordergrund. Dagegen überwiegt die parazelluläre Permeabilität zwischen den Zellen bei pathologischen Prozessen und wird durch die Zellverbindungen (AJ und TJ) limitiert.

### *Regulation der parazellulären Permeabilität*

Für die parazelluläre Permeabilität ist die Interaktion zwischen den Zellen durch AJ und TJ von besonderer Bedeutung. Sie sorgen für ein Aneinanderhaften der Zellen und für einen engen Zusammenhalt des Zellverbunds [37]. Die Regulation erfolgt über mehrere Wege, die zum Teil gleichzeitig ablaufen. An AJ führt eine

Internalisierung von Transmembranproteinen wie VE-Cadherin zu einer geringeren Haftung der Zellen und zu einer erhöhten Permeabilität [38]. Nach der Internalisierung wird VE-Cadherin entweder abgebaut oder recycelt und wieder an die Zellmembran transportiert [39]. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Adapterproteine  $\alpha$ - und  $\beta$ -, p120-Catenin und VE-Cadherin mit dem Zytoskelett verbinden und dass sie an der Regulation der Internalisierung beteiligt sind [34, 40, 41]. Die Bedeutung von Transmembranproteinen, wie den Claudinen und dem Occludin, und von Adapterproteinen, wie den Zonula Occludens (ZO) Proteinen an TJ, ist dahingegen noch nicht weitreichend untersucht.

### *Claudine*

Claudine bilden eine große Familie von über 25 verschiedenen Proteinen in Säugetieren. Sie werden sowohl in Endothelien als auch in Epithelien exprimiert [18]. Als Transmembranproteine sind Claudine von sehr großer Bedeutung für TJ. Deren Expression in Fibroblasten, die weder Claudine noch TJ besitzen, führt zu einer Formierung von TJ-Strängen [42]. Darüber hinaus wurden kürzlich durch die Entdeckung der Kristallstruktur von Claudin-15 neue Rückschlüsse auf deren Funktion in TJ gezogen [20, 43]. Bestimmte Claudine verstärken die endotheliale Barriere andere Claudine bilden Poren in den TJ-Strängen. So führt die Expression von Claudin-2 in MDCK Zellen (*Madin Darby Canine Kidney*) zu einer erhöhten Permeabilität, was die Poren-These stützt [42]. Auf der anderen Seite gibt es Claudine, die einen verschließenden Effekt auf die TJ haben. Für Endothelzellen ist das Claudin-5 sehr spezifisch und gehört zu den barriere-bildenden Claudinen [18]. Eine Deletion des Claudin-5-Gens in Mäusen zeigt ein normal ausgebildetes Gefäßsystem. Es kommt jedoch zu einer Permeabilitätszunahme für Moleküle unter 800 Da [44].

### *Occludin*

Occludin ist ebenfalls ein Transmembranprotein an TJ und besitzt wie die Familie der Claudine vier Transmembrandomänen, hat jedoch einen längeren zytoplasmatischen Schwanz als Ziel für diverse post-translationale Modifikationen, wie zum Beispiel Phosphorylierungen [42]. So führt eine geringere Tyrosin-Phosphorylierung von Occludin zu einer verstärkten endothelialen Barriere [45]. Erniedrigte Proteinmengen von Occludin sind assoziiert mit einer geringeren Transepithelialen Impedanz, als

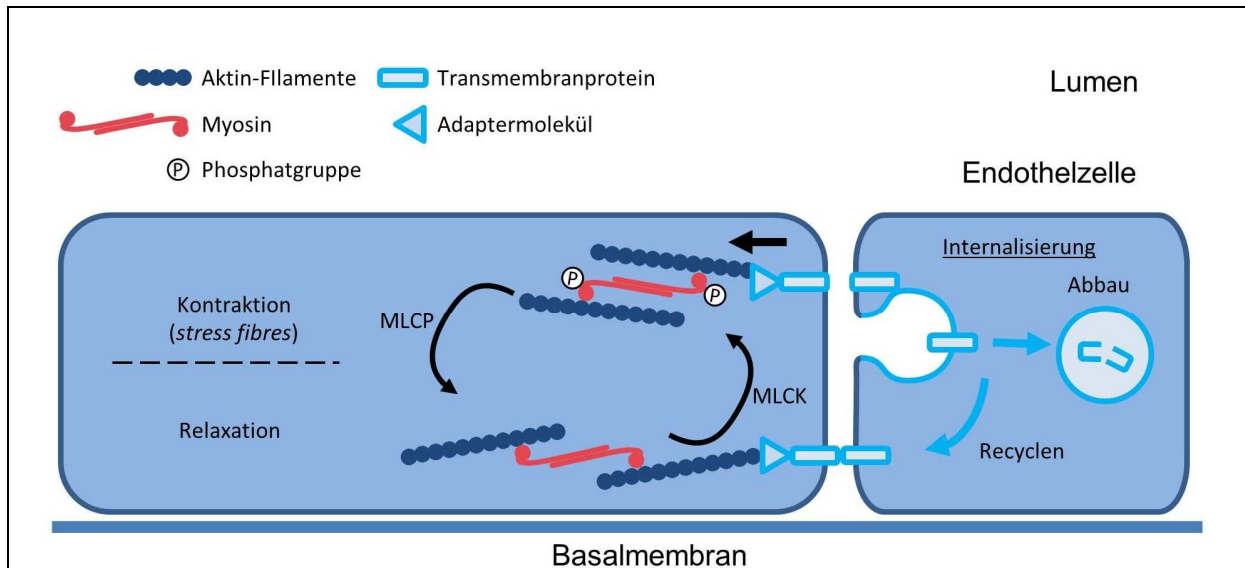
Zeichen für eine erhöhte Permeabilität in vitro [46]. Die Rolle von Occludin in TJ ist noch nicht vollständig geklärt. So führt ein KO von Occludin in Mäusen zwar zu einem normalen Aufbau von TJ, aber zu chronischen Entzündungen in diversen Epithelien [47].

### *Zonula Occludens*

Neben der Regulation der Zell-Zell-Kontakte spielt aber auch die Bildung von sogenannten *stress fibres* (dt. Stress-Fasern) eine besondere Rolle. Hierbei kommt es durch eine Aktivierung des Zytoskeletts zu einer Kontraktion von Aktin-Fasern. Dabei ziehen sich die Endothelzellen zusammen und es formieren sich interzelluläre Räume, die den Stoffaustausch über den Endothelzell-Monolayer ermöglichen. Ähnlich wie in der glatten Muskulatur wird die Kontraktilität über die Phosphorylierung von Myosin durch die *Myosin-light-chain-Kinase* (MLCK) oder die *Myosin-light-chain-Phosphatase* (MLCP) und dem intrazellulären Calciumspiegel reguliert [45]. Sowohl die Internalisierung von Transmembranproteinen als auch die *stress fibre*-Formation können nicht separat voneinander betrachtet werden. So sind sowohl die Transmembran-Proteine an AJ als auch an TJ über Adaptermoleküle mit dem Zytoskelett verbunden (Abbildung 1.1.3).

Die Familie der Zonula Occludens (ZO) Proteine gehört zu den Adaptermolekülen, die Transmembranproteine an TJ mit dem Aktin-Zytoskelett verbinden [34]. Sie umfasst ZO-1, ZO-2 und ZO-3. Für ZO-1 ist eine direkte Interaktion sowohl mit Claudin-5 als auch mit Occludin beschrieben [34]. ZO-1 ist darüber hinaus an der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt. In frühen Stadien der Ausbildung von Zellverbindungen interagiert ZO-1 mit dem AJ-Protein  $\alpha$ -Catenin und stellt so eine Verbindung in der Regulation von Prozessen zwischen AJ und TJ her [20]. ZO-1 ist in der Entwicklung von großer Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass ein *Knock-out* von ZO-1 embryonal letal endet [20]. In hoher Zelldichte ist viel ZO-1 an TJ lokalisiert und bindet den Transkriptionsfaktor ZONAB (*ZO-1-associated nucleic acid-binding protein*), wohingegen bei geringer Zelldichte weniger ZO-1 an TJ lokalisiert ist, was dazu führt, dass ZONAB in den Zellkern transloziert und dort die Genexpression reguliert [31]. Die besondere Rolle von Adaptermolekülen wird bei der Betrachtung von Cateninen an AJ deutlich. Sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Catenin sind Adaptermoleküle an AJ und verbinden VE-Cadherin mit Aktinfilamenten. Der Phosphorylierungsstatus von  $\beta$ -Catenin hat maßgebliche Auswirkungen auf die

Interaktion zwischen Zytoskelett und AJ sowie die Internalisierung von VE-Cadherin [45, 48]. An TJ hingegen im Zusammenhang mit ZOs bleiben regulatorische Effekte auf die Internalisierung und die Zytoskelettinteraktion hingegen noch unklar.



**Abbildung 1.1.3 Regulation der parzellären Permeabilität**

Eine Internalisierung von Membranproteinen erhöht die Permeabilität, anschließend können diese abgebaut oder recycelt werden. Die Bildung von *stress fibres* erhöht die Permeabilität, dabei ist Aktin über Adaptermoleküle wie ZOs oder Catenine mit den TJ/AJ-Membranproteinen verbunden. Die Aktin-Myosin-Kontraktion wird durch die MLCP oder MLCK reguliert.

### *IL-1 $\beta$ vermittelte Signalwege der Permeabilität*

Eine Reihe von Stimuli beeinflussen die Permeabilität von Endothelzellen. In den 1980er Jahren wurde VEGF identifiziert, das die Permeabilität in hypoxischen, malignen oder auch in atherosklerotischen Prozessen beeinflusst [36]. Neben VEGF kommt den Zytokinen eine besondere Rolle in der Regulation der Permeabilität zu. Zu ihnen zählen zum Beispiel Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Histamin oder auch Bradykinin [10, 19].

Interleukin-1 war das erste Interleukin das entdeckt wurde. Es spielt eine wichtige Rolle in inflammatorischen Prozessen, wie zum Beispiel der Sepsis [7, 49-52]. Interleukine erzielen auch noch bei sehr niedrigen Konzentrationen Effekte auf diverse Gewebe- und Zelltypen im Körper. Von der Stimulation im Hypothalamus über T-Lymphozyten bis hin zur Aktivierung von Endothelzellen sind sie maßgeblich an der Regulation von inflammatorischen Prozessen beteiligt [50]. Interleukin-1 ist

unter anderem für die Resistenz gegen Mikroben verantwortlich. Nicht zuletzt hat der Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R) strukturelle Ähnlichkeit mit der Toll-like-Rezeptor-Familie. So besitzen beide Rezeptorgruppen Toll-IL-1-Rezeptor (TIR)-Domänen, die es bei Dimerisierung der Rezeptoren nach Ligandenbindung ermöglichen, dass das zytosolische Adapterprotein MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*) an den Rezeptor bindet und die intrazelluläre Signalweiterleitung ermöglicht [50]. IL-1 $\beta$  gehört zu der IL-1-Familie und wird von hämatopoetischen Zellen, wie Monozyten, Gewebsmakrophagen, dendritischen Zellen aber auch von Mikrogliazellen im Gehirn sezerniert [50]. IL-1 $\beta$  führt in Endothelzellen zu einer Erhöhung der Permeabilität und zu einer Extravasation von Leukozyten. Beides sind wichtige Prozesse im Rahmen von Entzündungen und septischen Zuständen. Dass eine erhöhte Permeabilität die Leukozytenextravasation erleichtert, zeigt den engen Zusammenhang zwischen diesen beiden Prozessen [50, 53].

#### *NF- $\kappa$ B*

In Endothelzellen setzt IL-1 $\beta$  eine Reihe von Signalwegen in Gang. Über eine Kaskade von Kinasen wird NF- $\kappa$ B (Nuklear Faktor  $\kappa$ B) aktiviert. NF- $\kappa$ B besteht aus einer Gruppe von dimerisierenden Proteinen mit verschiedenen Untereinheiten, die verschiedenste Genexpressionen im Zellkern im Rahmen von Entzündungsprozessen steuern [54]. In Bezug auf Endothelzellen führt die NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu einer erhöhten Permeabilität und auch zu einer erhöhten Leukozytenextravasation [54].

Darüber hinaus konnten aber auch Signalwege der IL-1 $\beta$  abhängigen Permeabilitätserhöhung aufgedeckt werden, die unabhängig von der NF- $\kappa$ B sind. Es konnte gezeigt werden, dass IL-1 $\beta$  trotz Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung über eine Internalisierung von VE-Cadherin zu einer erhöhten Permeabilität führt [38].

#### *RhoA/ROCK*

Ein weiterer IL-1 $\beta$  induzierter Signalweg führt über das Aktin-Myosin-System. IL-1 $\beta$  induziert in Endothelzellen des Gehirns (*brain microvascular endothelial cell, BMEC*) eine Aktivierung von RhoA [55]. RhoA (*Ras homolog gene family, member A*) ist eine kleine GTPase, die ROCK aktiviert [20, 31]. ROCK (Rho-assoziierte Protein-Kinase) ist wiederum eine Kinase und kann als Regulator durch Phosphorylierung der Myosin-Leichtkette eine Aktin-Myosin-Kontraktion induzieren [31]. Ferner kann

ROCK die MLCP durch deren Phosphorylierung inaktivieren und unterstützt auf diese Weise ebenfalls die Aktin-Myosin-Kontraktion und die Formierung von *stress fibres* [31]. Deswegen ist die Aktivität von RhoA von entscheidender Bedeutung im Zusammenhang mit der Aktivierung des Zytoskeletts und der Permeabilität und wird von einer Reihe von inhibitorischen und aktivierenden Faktoren reguliert [56]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch weitere Interleukine auf das RhoA/ROCK System Einfluss nehmen [57, 58].

### MAPK

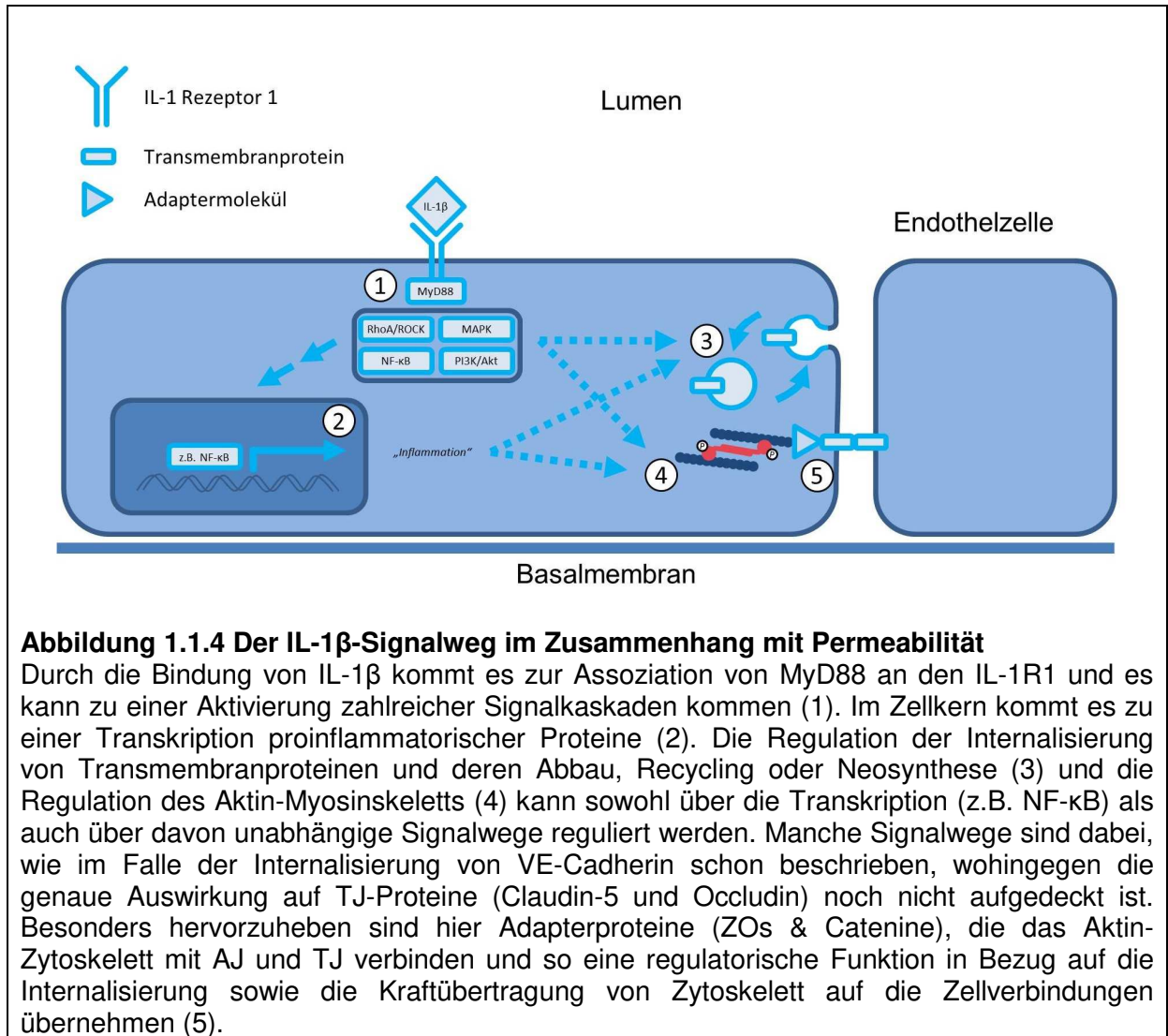
*Mitogen activated protein kinases* (MAPK) sind Kinasen, die sich in einer Kaskade von Phosphorylierungen aktivieren. Raf aktiviert dabei die MAP/ERK Kinase (MEK), die wiederum die *extracellular regulated kinase* (ERK 1/2) aktiviert [59]. Die Regulation der MAPK unterliegt Ras, einer GTPase die Raf aktivieren kann [59]. MAPK regulieren eine Vielzahl von Prozessen in Zellen, die für das Überleben und den Zellzyklus wichtig sind, nicht zuletzt aber auch Prozesse der Angiogenese [59, 60]. IL-1 $\beta$  hat Einfluss auf die MAPK, durch Inhibition der MAPK konnte in Ratten-Hepatozyten IL-1 $\beta$ -induzierte Veränderung von TJ-Proteinen verhindert werden [61].

### PI3K/AKT

Der PI3K/AKT-Signalweg ist eine weitere Kette von Kinasen, die in der Zelle eine wichtige Rolle bei der Steuerung von Apoptose, Tumorentstehung aber auch Zellmigration und Angiogenese haben [60, 62, 63]. Die Phosphoinositid-3 Kinase (PI3K) bildet 3-Phosphoinositid an der Membran, das führt im Weiteren zu einer Phosphorylierung von AKT und dessen Aktivierung der Kinasefunktion [62]. IL-1 $\beta$  hat auch durch den PI3K/AKT-Signalweg Einfluss auf TJ. Es konnte gezeigt werden, dass durch Inhibition der PI3K, ebenfalls in Ratten-Hepatozyten, IL-1 $\beta$ -induzierte Veränderungen von TJ-Proteinen verhindert werden konnten [61].

Die intrazellulären Signalwege von IL-1 $\beta$  sind komplex und können nicht separat voneinander betrachtet werden. Sie bilden vielmehr ein Orchester, das fein aufeinander abgestimmt ist. So konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von AKT aus dem PI3K/AKT-Signalweg durch bestimmte Stimuli auch zu einer NF- $\kappa$ B Aktivierung führt [62]. Es ist anzunehmen, dass auch viele weitere der beschriebenen Signalwege nicht unabhängig voneinander ablaufen. Der Einfluss dieser Signalwege auf TJ-Proteine, die Permeabilität und deren Regulation ist noch nicht ist

ausreichend geklärt. Darüber hinaus gibt es eine große Zahl von weiteren Proteinen, die regulatorisch in die komplexen intrazellulären Signalkaskaden von IL-1 $\beta$  eingreifen, deren Auswirkung ebenfalls nur unzureichend untersucht ist (Abbildung 1.1.4).



## 1.2 Tyrosinphosphatase SHP-2

### 1.2.1 Die klinische Bedeutung von SHP-2

Die zytosolische Tyrosinphosphatase SHP-2 wurde in den frühen 1990er Jahren entdeckt und ist für eine Reihe von Erkrankungen relevant [64]. Sie beeinflusst die Regulation von Stoffwechselwegen in Entwicklung und syndromalen Erkrankungen. Darüber hinaus konnte der Einfluss von SHP-2 bei malignen sowie infektiösen Krankheiten und bei Stoffwechselerkrankungen nachgewiesen werden.

#### *Syndromale Erkrankungen*

Das Noonan-Syndrom zählt zu den autosomal-dominanten Erkrankungen und wurde erstmals 1963 von Jacqueline Anne Noonan beschrieben [64]. Die Inzidenz der Erkrankung liegt bei ca. 1:2000 Geburten. Zu den Merkmalen gehören vor allem die Ausbildung von Herzfehlern, die bei 80-90% der Erkrankten auftreten [64, 65]. Aber auch Kleinwuchs und Gesichtsdysmorphien sind typisch für das Erscheinungsbild [65]. Mutationen im SHP-2-Gen (PTPN11) kommen bei 40-50% der Erkrankten vor und sind mit einer Aktivierung der Phosphatasefunktion assoziiert [64].

#### *Maligne Erkrankungen*

Darüber hinaus gibt es einen Zusammenhang zwischen SHP-2 und der sporadischen juvenilen myelo-monozytären Leukämie. In 20-25% der Fälle konnte hier eine somatische Mutation im SHP-2-Gen (PTPN11) nachgewiesen werden [64]. Auch Patienten mit dem Noonan-Syndrom zeigen eine erhöhte Inzidenz für Leukämien [64]. Darüber hinaus spielt SHP-2 auch noch bei weiteren Malignitäten, wie der akuten myeloischen Leukämie und anderen soliden Tumoren, wie dem Lungenkarzinom oder auch dem Brustkrebs eine Rolle [66].

#### *Stoffwechselerkrankungen*

Ferner konnte gezeigt werden, dass SHP-2 am intrazellulären Signalweg von Insulin beteiligt ist [60]. Auch hier wäre ein Einfluss auf Diabetes mellitus Typ I & II denkbar, auch wenn er noch nicht nachgewiesen ist [60]. Sollte das der Fall sein, würden sich daraus eine Reihe von neuen pharmakologischen Therapien für diese Zivilisationskrankheit ergeben.



### *Infektionserkrankungen*

Nicht zuletzt zeigt SHP-2 eine Assoziation zu *H. pylori* und dem Magenulkus. Es konnte herausgefunden werden, dass *H. pylori* das Protein CagA in Zellen injiziert, das daraufhin an SHP-2 bindet und den ERK-Signalweg beeinflusst [64].

Es gibt eine Reihe von Pathologien im Zusammenhang mit SHP-2, die dessen Bedeutung in der Alteration von intrazellulären Signalwegen zeigen. So ist es denkbar, dass SHP-2 noch Einfluss auf zahlreiche weitere Erkrankungen nimmt. Die Erforschung dieser Erkrankungen ermöglicht es neue Therapie- und Behandlungsansätze zu etablieren.

### **1.2.2 Vorkommen und Funktion von SHP-2**

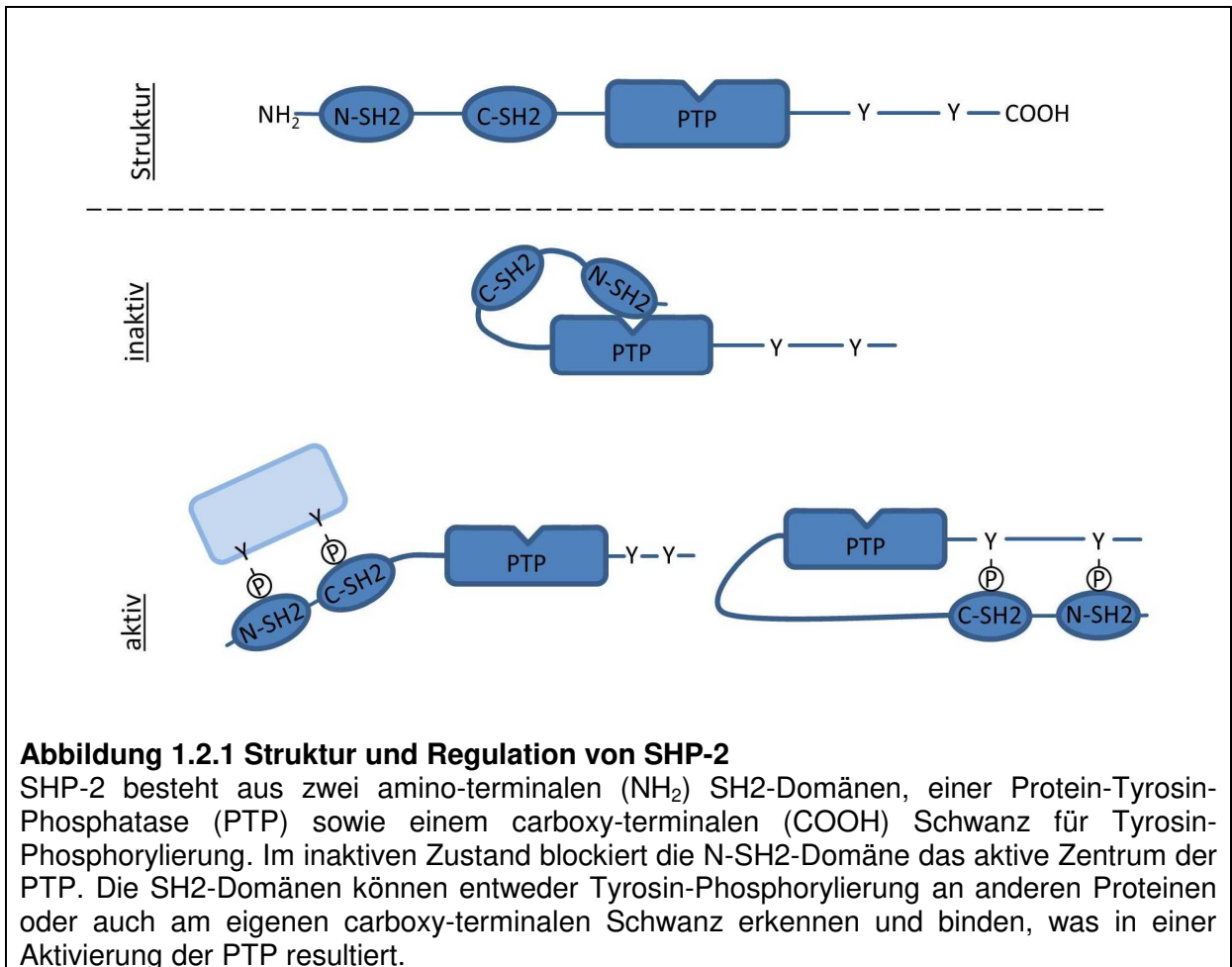
Im Rahmen von intrazellulären Signalwegen kommt Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) und Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) eine besondere Bedeutung zu. Sie kontrollieren den Phosphorylierungsstatus von Proteinen und können auf diese Weise deren Enzymaktivität regulieren und nehmen Einfluss auf die Protein-Proteininteraktion [60].

Die Protein-Tyrosin-Phosphatasen lassen sich zwei großen Familien zuordnen. Auf der einen Seite sind transmembran PTP und auf der anderen Seite zytosolische bzw. nicht-transmembran PTP, zu letzteren gehört SHP-2 [60]. Die wichtige Bedeutung von SHP-2 in Signalwegen wird deutlich bei der Betrachtung anderer Spezies. In Wirbeltieren gibt es SHP-1 und SHP-2 wohingegen in *Drosophila elegans* deren orthologen Formen *Corkscrew* und PTP-2 entdeckt wurden [64]. SHP-2 kommt ubiquitär in Zellen vor. Die Expression von SHP-1 wurde in hämatopoetischen Zellreihen und Endothelzellen nachgewiesen [60, 67].

#### *Src homology-2 (SH2) domain-containing phosphatase 2 – SHP-2*

SHP-2 besitzt zwei amino-terminale *Src-homology-2* (SH2) Domänen, eine zentrale PTP-Domäne sowie einen carboxy-terminalen Schwanz [60]. Die SH2-Domänen sind in der Lage Tyrosin-Phosphorylierungen zu erkennen und zu binden. Die N-SH2-Domäne blockiert im ungebundenen Zustand das katalytische Zentrum und inaktiviert die Phosphatasefunktion von SHP-2. Bindet die N-SH2-Domäne eine Tyrosin-Phosphorylierung, wird das aktive Zentrum frei für Substrat und aktiviert die

PTP [60]. Bindet die C-SH2-Domäne ebenfalls eine Tyrosin-Phosphorylierung, wird die Aktivierung noch weiter verstärkt [60]. Der carboxy-terminale Schwanz von SHP-2 besitzt Tyrosine, wovon zwei ebenfalls für Tyrosin-Phosphorylierung zur Verfügung stehen. Die Aktivierung von SHP-2 geschieht entweder in der Interaktion der SH2-Domänen mit einem anderen tyrosin-phosphorylierten Protein oder durch Interaktion mit Tyrosin-Phosphaten am carboxy-terminalen Schwanz des eigenen Moleküls (Abbildung 1.2.1).



### 1.2.3 SHP-2 in intrazellulären Signalkaskaden und der Regulation der Permeabilität

SHP-2 nimmt Einfluss auf zentrale Signalkaskaden in Zellen, die auch unter IL-1 $\beta$  aktiviert werden, wie zum Beispiel auf die MAPK, den PI3K/AKT-Signalweg aber auch auf die NF- $\kappa$ B Regulation und auf das RhoA/ROCK System.

### *SHP-2 und MAPK*

SHP-2 beeinflusst verschiedene MAPK Signalwege. Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von SHP-2 mit dem Adapterprotein Gab1 für die Aktivierung über Ras von MEK1 und ERK2 wichtig ist [68]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass SHP-2 an den PDGF-Rezeptor bindet und diesen dephosphorylieren kann. Das führt dazu, dass der *RasGTPase activating Factor* (RasGAP) nicht mehr binden kann. RasGAP inaktiviert Ras durch eine verstärkte Hydrolyse von GTP zu GDP. Die Dephosphorylierung des PDGF-Rezeptors durch SHP-2 führt zu einer verlängerten Ras-Aktivierung und somit auch zu einer verlängerten MAPK-Aktivierung [60]. Ferner konnten noch weitere Effekte der SHP-2 Aktivität auf die Aktivierung von MAPK durch verschiedene Wachstumsfaktoren aufgedeckt werden [60]. Ferner zeigten MacGillivray et al. (2003), dass SHP-2 die IL-1 $\beta$ -induzierte ERK Aktivierung in Fibroblasten reguliert [69]. Auch Mannell et al. (2008) konnten zeigen, dass eine Inhibition von SHP-2 mit einer geringeren Phosphorylierung von ERK1/2, PI3K und AKT in Endothelzellen unter FGF-2 assoziiert ist und Einfluss auf die Angiogenese hat [70].

### *SHP-2 und PI3K/AKT*

Der PI3K/AKT-Signalweg wird durch SHP-2 beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass SHP-2 die Regulation der Apoptose über die PI3K/AKT-Signalweg beeinflusst [71]. Darüber hinaus führt die Expression einer katalytisch inaktiven Form von SHP-2 zu einer gestörten Aktivierung von PI3K und AKT [60]. Ein Ansatzpunkt von SHP-2 ist die p85 Untereinheit der PI3K, wobei eine direkte Interaktion zwischen beiden unter EGF nachgewiesen wurde und zu einer veränderten Aktivierung von AKT in Abhängigkeit von der SHP-2 Aktivität führt [72]. Auch die Interaktion mit Gab1 hat nicht nur Auswirkung auf die MAPK sondern auch auf die Aktivierung von PI3K und AKT [60].

Der Einfluss von SHP-2 sowohl auf den PI3K/ AKT als auch auf die MAPK ist abhängig von den jeweiligen Stimuli. Aktivierende Funktion auf die Signalwege zeigt SHP-2 unter IGF und FGF Stimulation wohingegen SHP-2 unter EGF negativ auf die Aktivierung wirkt [60]. Mannell et al. (2008) konnten auch zeigen, dass eine Hemmung der PI3K nicht nur zu einer geringeren AKT Aktivierung sondern auch zu

einer geringeren Aktivierung der MAPK führt [70]. Das verdeutlicht, dass die einzelnen Signalwege eng miteinander verknüpft und aufeinander abgestimmt sind.

#### *SHP-2 und NF- $\kappa$ B*

Auch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist abhängig von SHP-2. Eine Stimulation mit TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\alpha$  führt zu einer Aktivierung der Transkriptionsfunktion von NF- $\kappa$ B [73]. In Fibroblasten, die eine homozygote Mutante von SHP-2 exprimieren, war diese Aktivierung unter TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\alpha$  vermindert [73]. Darüber hinaus konnte durch pharmakologische Hemmung von SHP-2 (PTPi IV), eine Phosphorylierung der NF- $\kappa$ B Untereinheit p65 verhindert werden [74]. Ferner kann eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B auch durch die MAPK erfolgen, dessen Aktivierung von SHP-2 reguliert wird [60, 75, 76].

#### *SHP-2 und RhoA/ROCK*

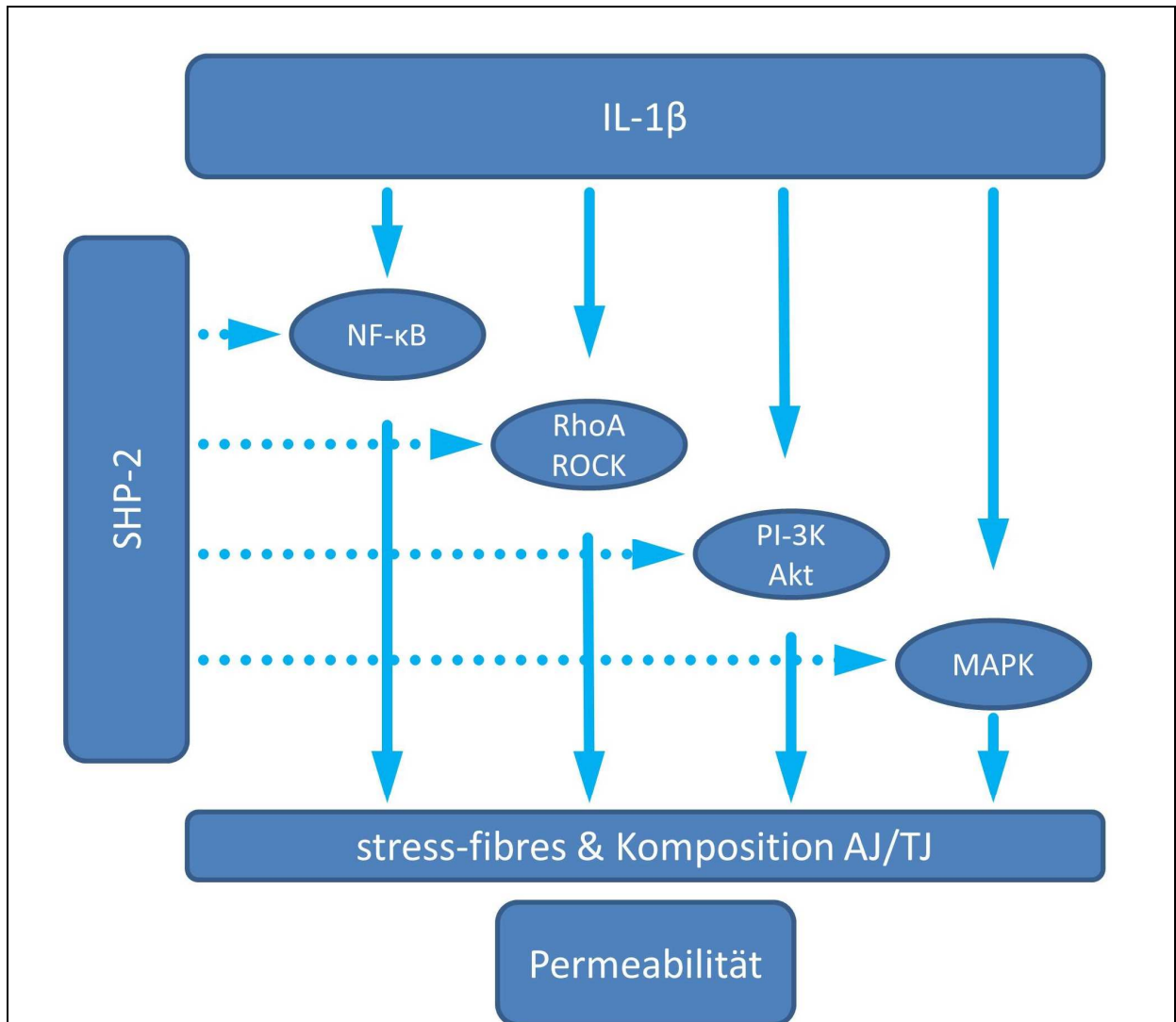
Als Regulatoren des Zytoskeletts spielen auch das RhoA und ROCK System eine wichtige Rolle. SHP-2 hat Einfluss auf die Aktivität von RhoA. Schoenwaelder et al. (2000) zeigten, dass in Fibroblasten, die eine Unterbrechung des Exons 3 in SHP-2 (SHP-2 $^{\Delta 46-110}$ ) aufweisen, eine deutlich stärkere Aktivierung von RhoA nachweisbar war als in Fibroblasten, die den Wildtyp von SHP-2 exprimieren [77].

#### *SHP-2 in der Regulation der Permeabilität*

Nicht zuletzt konnten auch direkte Einflüsse von SHP-2 auf die Permeabilität aufgedeckt werden. SHP-2 nimmt über AJ Einfluss auf die Permeabilität. VE-Cadherin hat mehrere Tyrosinreste, die für Phosphorylierungen (Tyr685 & Tyr731) zur Verfügung stehen. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Tyr685 für die Permeabilität in vivo von Bedeutung ist, die von Tyr731 hingegen ist für die Leukozytentransmigration wichtig. SHP-2 dephosphoryliert Tyr731 durch Leukozyteninteraktion mit dem Endothel, was zur Internalisierung von VE-Cadherin führt [78]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass SHP-2 mit dem AJ-Adapterprotein  $\beta$ -Catenin interagiert und es dephosphoryliert [79]. Ferner konnte gezeigt werden, dass SHP-2 die Cadherin-Catenin-Assoziation und die interzellulären Zell-Zellkontakte beeinflusst [2].

Abschließend lässt sich festhalten, dass SHP-2 in diverse Signalwege involviert ist, die auch durch IL-1 $\beta$  aktiviert werden. IL-1 $\beta$  führt zu einer erhöhten Permeabilität in

Endothelzellen. Die genauen Interaktionen und die Regulation dieser Signalwege bleiben aber noch ungeklärt (Abbildung 1.2.2).



**Abbildung 1.2.2 Potentielle Signalwege von SHP-2 und IL-1β auf die Regulation der Permeabilität**

Sowohl SHP-2 als auch IL-1β beeinflussen Signalwege, die auch auf die Permeabilität Einfluss haben. Die Rolle von SHP-2 in diesem Prozess bleibt noch ungeklärt.

### 1.3 Zielsetzung

Die endotheliale Permeabilität ist an der Entstehung von zahlreichen pathologischen Krankheitsprozessen, wie zum Beispiel von Entzündungen, Durchblutungsstörungen und auch malignen Erkrankungen beteiligt [2, 3]. Bei Entzündungen kommt es zu einer Zunahme der Durchlässigkeit der Endothelzellen. Das führt zu einer Flüssigkeitsverschiebung in den Extravasalraum. Im Rahmen einer Sepsis führt dies zu einer arteriellen Hypotension, Gewebsödemen in den Extremitäten und Organen, was zu Beeinträchtigung der Organfunktion bis hin zum Multiorganversagen führen kann [5, 6, 8]. In der Sepsis sind zahlreiche Zytokine involviert [7, 51, 52]. Aktivierte Leukozyten sezernieren IL-1 $\beta$ , das führt zu einer Zunahme der endothelialen Permeabilität und zu einer Leukozytenextravasation [7, 49, 50].

An der Aufrechterhaltung der endothelialen Barriere und der Regulation der Permeabilität sind sowohl Adherens- als auch Tight-Junctions beteiligt [34, 37]. Sie bilden Zell-Zell-Kontakte und limitieren die parazelluläre Permeabilität [34, 37]. Adherens-Junctions, mit deren Vertretern VE-Cadherin und Cateninen, sind schon sehr gut untersucht. In Bezug auf Tight-Junctions fehlen jedoch Erkenntnisse über die Regulation der endothelialen Permeabilität sowie der Zusammensetzung von Proteinen an Tight-Junctions, welche durch Internalisierung, Degradation oder Expression reguliert wird.

Ziel der Arbeit ist es den Einfluss der Tyrosin-Phosphatase SHP-2, die in zahlreichen vaskulären Signalwegen von Endothelzellen involviert ist, auf die Permeabilität, Leukozyten-Extravasation und die Proteinmenge von Tight-Junction Proteinen zu untersuchen.

Dazu werden folgende Fragestellungen im Einzelnen betrachtet:

- 1) Hat die Aktivität der Phosphatasefunktion von SHP-2 Einfluss auf die endotheliale Permeabilität?
- 2) Hat die Aktivität der Phosphatasefunktion von SHP-2 Einfluss auf die Leukozytenextravasation?
- 3) Hat IL-1 $\beta$  Einfluss auf die Menge von Tight-Junction-Proteinen?
- 4) Beeinflusst die unterschiedliche Aktivität von SHP-2 die Proteinmenge an Tight-Junctions?

- 5) Wenn ja, reguliert SHP-2 Degradation oder Expression von Tight-Junction-Proteinen?

Zur Untersuchung der Auswirkungen auf die Permeabilität werden der FITC-Dextran Extravasations-Versuch am Cremastermodell *in vivo*, die Transendotheliale elektrische Widerstandsmessung *in vitro* sowie Immunofluoreszenz-Mikroskopie *in vitro* verwendet. Die Leukozyten-Extravasation wird anhand eines Cremastermodells *in vivo* gemessen. Und die Proteinmenge von Tight-Junction-Proteinen wird mittels Western Blot *in vitro* ermittelt. Die Expression verschiedener Tight-Junction-Proteine wird anhand einer reversen Transkriptase-PCR quantifiziert.

## 2 Material und Methodik

---

### 2.1 Material

Tabelle 1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
2-Propanolol	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Calcium-Chlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Collagenase A	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Collagen Typ 1 Rat Tail	Ibidi, Planegg / Martinsried, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dinatriumhydrogephosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Endopan 3 Kit	Pan – Biotech, Aidenbach, Deutschland
Ethanol 70 %	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 99 %	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraethansäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fluoresceinisothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran, 150 kDa)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycerin	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Applichem, Darmstadt, Deutschland
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Hanksche Lösung	Apotheke Klinikum der Universität München, Deutschland
HCl 37 %	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Leupeptin	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Luminol	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol 99,8 %	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Natriumdesoxycholat	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumdodecylsulfat	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyrophosphat	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland



p-Cumarsäure	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phenylmethanesulfonylfluoride	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Polyakrylamid 30 %	Applichem, Darmstadt, Deutschland
TRIS-Base	Applichem, Darmstadt, Deutschland
TRIS-HCl	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Trypan Blau 0,4 %	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin (10x)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween 20	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Pierce® BCA Protein Assay	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA

Antikörper

**Tabelle 2 Antikörper**

Antigen	Spezies	Verdünnung in	Hersteller
Claudin-5 (N-terminal)	IgG1 Maus	WB:1:1000 in 5%Milch IF: 1:200 in BP	Invitrogen, Camarillo, CA USA,
Occludin (N-terminal)	Kaninchen	WB:1:1000 in 5%Milch	Invitrogen, Camarillo, CA USA,
VE-Cadherin XP	IgG Kaninchen	WB:1:1000 in TBST IF: 1:200 in BP	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
ZO-1	Kaninchen	WB:1:1000 in 5%Milch IF: 1:200 in BP	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
β-Aktin	Kaninchen	WB:1:1000 in TBST	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
IgG-Maus	Ziege	WB:1:5000 in TBST	Merck Chemicals, Schwalbach Deutschland
IgG-Kaninchen	Ziege	WB:1:5000 in 5%Milch	Merck Chemicals, Schwalbach Deutschland
IgG-Maus (H+L) Alexa Flour 488	Huhn	IF: 1:400 in BP	Invitrogen, Camarillo, CA USA,
IgG-Kaninchen (H+L) Alexa Flour 488	Ziege	IF: 1:400 in BP	Invitrogen, Camarillo, CA USA,
IgG-Kaninchen (H+L) Alexa Flour 546	Ziege	IF: 1:400 in BP	Invitrogen, Camarillo, CA USA,

Tabelle 3 Stimulanzen &amp; Hemmer

Ziel	Substanz	Arbeitskonz.	Hersteller
Hemmt lysosomalen Abbau [80]	Chloroquine-Diphosphat	150 $\mu$ M	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Zytokin	Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )	10 ng/ml	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA
Proteasomen- & Calpain-Inhibitor [81]	MG132	10 $\mu$ M	Tocris Bioscience, Bristol, Vereinigtes Königreich
SHP-2-Inhibitor [82]	PTPi IV	2 $\mu$ M	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

## 2.2 Puffer und Lösungen

1 % entspricht entweder 1 g pro 100 ml oder 1 ml pro 100 ml, abhängig davon ob die Substanz in fester oder flüssiger Form vorliegt.

### PBS –

Substanzen	Konzentration
NaCl	8 g/l
KCl	0,2 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,42 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g/l
In destilliertem Wasser	

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert.

### PBS +

Substanzen	Konzentration
NaCl	8 g/l
KCl	0,2 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,15 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g/l
MgCl <sub>2</sub>	0,04 g/l
CaCl <sub>2</sub>	0,1 g/l
In destilliertem Wasser	

CaCl<sub>2</sub> wurde getrennt gelöst. Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,4 eingestellt.

Anschließend wurde die Lösung steril filtriert.

### **TBST (Waschpuffer)**

Substanzen	Konzentration
TRIS	6,06 g/l
NaCl	8,77 g/l
Tween 20	0,1 %
In destilliertem Wasser	

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.

### **Transferpuffer**

Substanzen	Konzentration
Glycin	18 g/l
TRIS	46,875 g/l
In destilliertem Wasser	

Anschließend werden 1,6 l davon mit 400 ml Methanol vermischt.

### **Laufpuffer**

Substanzen	Konzentration
TRIS	3 g/l
Glycin	14,4 g/l
SDS	1 g/l
In destilliertem Wasser	

**4xAuftragspuffer**

Substanzen	Konzentration
TRIS	250 mM
SDS	8 %
Glycerin	40 %
Bromphenolblau	0,02 %
Mercaptoethanol	400 mM
In destilliertem Wasser	

**ECL-Lösung**

Substanzen	Konzentration
Luminol	0,44 mg/ml
p-Cumarsäure	66 µg/ml
1M-TRIS Base (pH 8,5)	1:9
In destilliertem Wasser	

Zum Schluss wurde 1 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) auf 1 ml ECL-Lösung gegeben.

**RIPA-Puffer**

Substanzen	Konzentration
TRIS	50 mM
NaCl	150 mM
SDS	0.1 %
Natriumdesoxycholat	0.5 %
Triton X 100	1 %
Natriumpyrophosphate	2.5 mM
NaF	10 mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1 mM
Leupeptin	1 µg/ml
PMSF	1 mM
In destilliertem Wasser	

PMSF wurde dem Puffer kurz vor Gebrauch hinzugefügt.

**5%Milch**

Substanzen	Konzentration
Magermilchpulver In TBST	5 %

**5%BSA**

Substanzen	Konzentration
BSA In TBST	5 %

**2.3 Geräte****Tabelle 4 Geräte**

Gerät	Hersteller
Photometer	Spectra Fluor, Tecan Group, Männedorf, Schweiz
pH-Meter	Basic Meter PB-11, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Netzgerät	Standard Power Pack P25, Biometra, Göttingen, Deutschland
Tischzentrifuge	Sprout, Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Kleine Zentrifuge	Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Große Zentrifuge	Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge (Zellkultur)	Laborfuge 400, Kendro Laboratory Products, Osterode, Deutschland
Waage	SBA/SBC, SCALTEC Instruments, Heiligenstadt, Deutschland
Feinwaage	ALC, Acculab Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad (Zellkultur)	WNB 7-45, Memmert, Schwabach, Deutschland
Inkubator	Hera Cell, Kendro Laboratory Products, Osterode, Deutschland
Abzugshaube (Zellkultur)	Microflow Biological safety cabine, Intermed Nunc, Wiesbaden Deutschland

## 2.4 Zellen und Zellkultur

### 2.4.1 Medien und Lösungen

Tabelle 5 Medien und Lösungen

Medium	Zusammensetzung
Endopan-Medium	Endopan 3 Kit mit 9 Supplementen: FCS, EGF, FGF-2, VEGF, Vitamin C Phosphat, R3-IGF-1, GA, Hydrocortison, Heparin
20%HUVEC-Medium	DMEM (1000 mg Glukose / L, L-Glutamin, NaHCO <sub>3</sub> , Pyridoxine; HCl, Phenolrot), 100 ml FCS, 6 ml PS
10%HMEC-Medium	DMEM (1000 mg Glukose / L, L-Glutamin, NaHCO <sub>3</sub> , Pyridoxine; HCl, Phenolrot), 50 ml FCS, 6 ml PS
1:1-HUVEC-Medium	Endopan-Medium : 20%HUVEC-Medium (1:1)

### 2.4.2 Zellen

Die HUVEC (*Human umbilical vein endothelial cells*) wurden aus humanen Nabelschnüren gewonnen. Zurückgebliebenes Blut wurde durch vorsichtiges ausdrücken aus den Blutgefäßen entfernt. Metallkanülen, versehen mit Dreiwegehähnen, wurden von beiden Seiten in die Umbilikalvene eingeführt und mit Kabelbindern fixiert. Anschließend wurde die Nabelschnur mit 10 ml Hankscher-Lösung gespült und erneut vorsichtig ausgedrückt. Danach wurden 10 ml Collagenase A (1700 U/ml in Hankscher-Lösung) in die Nabelschnüre gespritzt, die Dreiwegehähne verschlossen und sie wurden für 10 min in 0,9%NaCl(aq) bei 37 °C inkubiert. Die Flüssigkeit, in der sich die abgelösten Endothelzellen befanden, wurde in einem 50ml-Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Danach wurden die Nabelschnüre mit 10 ml DMEM gespült und die Flüssigkeit wurde ebenfalls aufgefangen. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm. Hiernach wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 4 ml Endopan-Medium gelöst. Die Zellsuspension wurde nun in eine T-Flasche überführt. Am Tag darauf wurden die Zellen mit PBS+ gewaschen und erneut mit Endopan-Medium kultiviert. Die folgenden Tage wurde täglich das Medium erneuert bis die Flaschen konfluent bewachsen waren. Es folgte nun ein Splitten in die erste Passage.

HMEC (*Human microvascular endothelial cells*) sind eine immortalisierte Zelllinie aus Hautendothelzellen und wurden von Ades et al. zur Verfügung gestellt [83].

### 2.4.3 Kultivierung

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert. Dabei wurden für HUVEC gleiche Teile Endopan-Medium und 20%HUVEC-Medium und für HMEC 10%HMEC-Medium verwendet. Sobald die Zellen konfluent zusammengewachsen waren, wurden sie je nach Bedarf in ein Verhältnis von 1:2 bis 1:3 neu ausgesäht. Dazu wurde das Medium abgesaugt und anschließend mit PBS- das restliche Medium gewaschen und abgesaugt. Anschließend wurde Trypsin (in PBS-) auf die Zellen gegeben und bei 37 °C inkubiert bis die Zellen sich vom Untergrund gelöst hatten. Es wurde nun neues Medium hinzugegeben. Die Zell-Medium-Suspension wurde nun mehrmals aspiriert und ausgespritzt, sodass die Zellen voneinander getrennt und homogen verteilt werden konnten. Die Suspension wurde nun erneut auf Petrischalen aufgebracht und weiter inkubiert.

### 2.4.4 Stimulation von Zellen

Die Stimulationen wurden mit 20%HUVEC-Medium bzw. 10%HMEC-Medium ohne Zusatz von Endopan-Medium durchgeführt. Das gesamte Medium wurde zuvor entfernt. Wenn nicht anders angegeben wurden die jeweiligen Stimulanzen gemäß Tabelle 3 Stimulanzen & Hemmer eingesetzt.

### 2.4.5 Transduktion von HUVEC mittels lentiviralem Gentransfers

Tabelle 6 Transduktion SHP-2 Viren

Name	Konstrukt	Effekt / Funktion
SHP-2 Wt	Wildtyp	Normales SHP-2
SHP-2 CS	Austausch von Zystein an Position 459 zu Serin	Permanente Inaktivierung der Phosphatasefunktion

Für die Transduktion der Zellen wurden wie vorher beschrieben die verschiedenen Vektoren in VSV-G pseudotypisierte Lentiviren der dritten Generation verpackt [84]. Die Virusproduktion geschah als Kooperation mit Prof. Pfeifer, Uni Bonn, Institut für Pharmakologie und Toxikologie innerhalb der DFG Forschergruppe 917. Die pDNA für den Wildtyp (Wt) und die konstitutiv inaktive Mutante SHP-2 CS erhielten wir aus dem Benett Laboratory, Yale University School of Medicine, Department of Pharmacology. Die Zellen wurden zweimal mit Hankscher-Lösung gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen mit dem Virus für drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Es wurde ein Verhältnis von fünf infektiösen Partikeln pro Zelle benutzt (MOI = 5). Nach der Stimulation wurde Medium hinzugefügt ohne den Virus abzusaugen. Am nächsten Tag wurde das Medium komplett gewechselt. Die Zellen wurden nach insgesamt 72 Stunden für die entsprechenden Versuche verwendet.

## 2.5 Western Blot

### 2.5.1 Material

Tabelle 7 Western Blot Material

Gerät / Material	Hersteller
Insulinspritze	BD Consumer Healthcare, Franklin Lakes, NJ, USA, 1 ml, 29G
Gelkammer	Vertikale Doppeltgelsysteme PerfectBlue™, PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Blotkammer	Tank-Elektroblotter PerfectBlue™, PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Whatmanpaper	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Controller /Kamera	Camera Controller ORCA-ER / C4742-80, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching, Deutschland
Software	HoKaWo Version 2.9, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching, Deutschland
Proteinmarker	Colored Prestained Protein Standard, Broad Range (11–245 kDa), New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

### 2.5.2 Prozedere

#### *Lysatgewinnung*

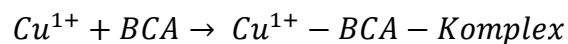
Mit dem Ende der Stimulation wurden die Zellen ein- bis zweimal mit kaltem PBS+ gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurden 150-200 µl (für 6cm-Schalen) oder 400-500 µl (für 10cm-Schalen) RIPA-Puffer auf die Schalen hinzugefügt und bei -20 °C eingefroren. Nachdem die Zellen vollständig gefroren waren, wurden die Zellen angetaut und es wurde auf Eis weitergearbeitet. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgekratzt, in eine Insulinspritze aufgezogen und fünfmal vollständig resuspendiert, um die Zellen zu zerstören und die Proteine zu



lösen. Die Lysate wurden in 1,5 ml-Gefäßen bei 14.000 g und 4 °C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet verworfen.

### *Proteinbestimmung*

Um gleichbleibende Mengen Protein auf die Polyacrylamidgele zu laden wurde eine Proteinbestimmung mit Pierce® BCA Protein Assay (Reagenz A, Reagenz B, Albumin Standard) durchgeführt. Grundlage hierfür ist die Biuretreaktion und anschließende Kupferkomplexbildung, die anschließend photometrisch gemessen werden kann [85]:



Es wurden 7 µl Lysat auf eine 96-Well-Platte in Duplets pipettiert. Ferner wurde ein Proteinstandard (0,0 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1,0 mg/ml; 1,5 mg/ml; 2,0 mg/ml Albumin Standard) ebenfalls mit je 7 µl in Duplets aufgetragen. Anschließend wurde 200 µl pro Well vom Pierce-Reagenz (1:50; Reagenz B : Reagenz A) hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C wurde die Absorption bei 550 nm gemessen.

### *SDS-Acrylamid-Gelelektrophorese*

Gemäß der Proteinbestimmung wurden 40 µg Proteinlysate aliquotiert und im Volumenverhältnis von eins zu drei mit 4xAuftragspuffer vermischt. Die Proben wurden nun für 5 min bei 95 °C inkubiert, Kondenswasser wurde schließlich mit einer Tischzentrifuge in Lösung gebracht.

Die Gelkammern wurden so zusammengebaut, dass eine Geldicke von 1,5 mm erreicht wurde. Anschließend wurden Trenngel und Sammelgel getrennt gegossen. TEMED und 10%-APS-Lsg. wurden zuletzt hinzugefügt, um die Polymerisation zu starten und unmittelbar danach in die Gelkammern gefüllt. Durch das vorsichtige hinzufügen von ca. 0,5 ml Isopropanol wurden Luftblasen an der Oberkante des Gels entfernt. Nach ca. 45 min konnte das Sammelgel gegossen werden. TEMED und 10%-APS-Lsg. wurden auch hier zuletzt hinzugefügt. Die Gelkämme wurden gleich im Anschluss eingefügt. Nach 15 min wurden die Gelkammern mit Laufpuffer befüllt und die Gelkämme entfernt.

**Tabelle 8 Western Blot Trenngel 45,5 ml**

Substanz / Gel	10%-Gel	12%-Gel
30%-Polyacrylamid-Lsg.	15 ml	18 ml
1,5 M Tris pH 8,8 Lsg.	11,25 ml	11,25 ml
10%-SDS-Lsg.	450 µl	450 µl
destilliertes Wasser	18,3 ml	15,3 ml
TEMED	50 µl	50 µl
10%-APS-Lsg.	500µl	500µl

**Tabelle 9 Western Blot Sammelgel 20 ml**

Substanz	
30%-Polyacrylamid-Lsg.	2,55 ml
0,5 M Tris pH 8,8 Lsg.	5 ml
10%-SDS-Lsg.	200 µl
destilliertes Wasser	12 ml
TEMED	40 µl
10%-APS-Lsg.	200µl

Mit einer Glaspipette wurden nun 3-5 µl Proteinmarker sowie alle Proben vorsichtig und vollständig aufgetragen. Leere Geltaschen wurden mit 10 µl 4xAuftragspuffer befüllt.

Das Durchqueren des Sammelgels der Lauffront erfolgte bei 120 Volt, des 12%-Trenngels ebenfalls bei 120 Volt, des 10%-Trenngels hingegen bei 160 Volt. Beendet war der Gellauf sobald die Lauffront bei dem 10%-Trenngel fast die Unterkante und bei dem 12%-Trenngel circa die Hälfte des Trenngels erreicht hatte.

#### *Proteintransfer*

Das Trenngel wurde nun vorsichtig auf die Nitrozellulosemembran gelegt und beidseitig von jeweils einem Schwamm und einem Whatmanpaper umschlossen. Es folgte eine Inkubation für zwei Stunden im Transferpuffer bei 70 Volt. Anschließend wurden die Membranen mehrmals mit TBST gewaschen.

#### *Immunmarkierung*

Die Membranen wurden nun zuerst mit Blockingpuffer (5%Milch oder 5%BSA) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Erstantikörper wurde entweder für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in stetiger Bewegung inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen der Membranen mit TBST. Der

Zweitantikörper wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur in stetiger Bewegung inkubiert. Zuletzt wurde erneut mit TBST gewaschen.

### *Entwicklung*

Die Membranen wurden aus dem TBST genommen, überschüssige Flüssigkeit wurde durch Abtropfen entfernt. Nun wurde 1 ml fertige ECL-Lösung auf die Membranen appliziert. Die Flüssigkeit wurde gleichmäßig verteilt und anschließend mit einer durchsichtigen Folie abgedeckt. Die Membranen wurden nun von einer DCC-Kamera bei einer Belichtungszeit von circa 10 – 90 Sekunden in einer dunklen Kammer entwickelt. Die Membranen wurden nach wiederholtem Waschen erneut mit einem Erstantikörper inkubiert.

### *Auswertung*

Anschließend wurden mit dem Programm HoKaWo Version 2.9 die Tonwerte der Pixel (Densitometrie) der einzelnen Banden gemessen, wobei der Hintergrund von den einzelnen Messwerten abgezogen wurde.

## **2.6 Quantitative reverse Transkriptase-PCR**

### **2.6.1 Material**

**Tabelle 10 qRT-PCR Material**

<b>Geräte / Material</b>	<b>Hersteller</b>
peqGOLD Total RNA Kit	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
High-Capacity RNA-to-cDNA Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Master Mix	Power Up™ SYBR™ Green Master mix, Thermo Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland
Thermozykler	Step onePlus™ Real-time PCR system, Thermo Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland
StepOne™ Software 2.3	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

### 2.6.2 Prozedere

Um mRNA zu isolieren, wurden HUVEC mit PBS+ gewaschen und anschließend wurde die RNA mittels „*peqGOLD Total RNA Kit*“ gemäß Herstellerangaben aufbereitet. Danach wurde je Probe 1 µg RNA mit dem „*High-Capacity RNA-to-cDNA Kit*“ gemäß Herstellerangaben in cDNA umgewandelt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die reverse Transkription verhältnismäßig gleiche Mengen RNA in gleiche Mengen cDNA umwandelt. Hiernach erfolgte die Aufbereitung der Proben gemäß Tabelle 11. Dabei erfolgte der Nachweis der Menge an doppelsträngiger DNA mit SYBR Green I. Die Datenakquisition erfolgte mittels der Programmeinstellung „Comparative  $\Delta\Delta CT$ “ und den in Tabelle 12 aufgeführten Protokoll. Es erfolgte die Quantifizierung der cDNA mittels der in Tabelle 13 aufgeführten Primer, wobei die Amplifikation von 18S als Referenzwert genommen wurde.

**Tabelle 11 qRT-PCR Proben**

	Volumen
<i>Master Mix</i>	10 µl
<i>Primer Fwd 10 µM</i>	0,6 µl
<i>Primer Rev 10 µM</i>	0,6 µl
<i>cDNA 1 ng</i>	5 µl
Destilliertes Wasser	3,8 µl

**Tabelle 12 qRT-PCR Protokoll**

	Temperatur	Zeit
<i>Holding I</i>	50 °C	2 min
<i>Holding II</i>	95 °C	2 min
<i>Cycling (x45)</i>	95 °C	15 s
	x °C	1 min
	95 °C	15 s
<i>Melt Curve</i>	x °C	1 min
	95 °C	15 s
	95 °C	15 s
<i>x: Annealing Temperature</i>		
18S	52,5 °C	
Claudin-5 Occludin ZO-1	57,5 °C	

**Tabelle 13 qRT-PCR Primer**

Primer	Sequenz	Tm (°C)	Größe in Basenpaaren (bp)
Claudin-5 Fwd	GAGGCGTGCTCTACCTGTTT	60.0	118
Claudin-5 Rev	AGCTCGTACTTCTGCGACAC	60.0	
Occludin Fwd	ACAAGCGGTTTTATCCAGAGTC	60.3	89
Occludin Rev	GTCATCCACAGGCGAAGTTAAT	60.4	
ZO-1 Fwd	CAACATACAGTGACGCTTCACA	60.8	105
ZO-1 Rev	CACTATTGACGTTTCCCCACTC	60.6	
18S Fwd	AGAAACGGCTACCATCCA	59.02	158
18S Rev	CCCTCCAATGGATCCTCGTT	59.16	

## 2.7 Immunofluoreszenz

### 2.7.1 Material

Tabelle 14 Immunofluoreszenz Material

Gerät / Material	Hersteller
Slides	μ-Slide 8 Well, Ibidi, Planegg / Martinsried, Deutschland
Mikroskop	Axiovert 200 M Carl Zeiss Werk, Göttingen, Deutschland
Objektiv 63x	Carl Zeiss Werk, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzlichtfilter	Ebq 100 isolated Leistungselektronik Jena GmbH, Jena, Deutschland
Bildverarbeitungsprogramm	Axiovision 40x64 V4.9.1.0, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena Deutschland

### 2.7.2 Prozedere

#### *Fixieren und Färben*

Nachdem die Zellen eingesät und stimuliert wurden, wurde das Medium abgesaugt und einmal mit PBS+ gewaschen. Anschließend wurde auf jedes Well 200 µl eiskaltes Methanol gegeben und bei -20 °C für 30 min inkubiert. Danach wurde zweimal mit PBS+ gewaschen. Die Zellen wurden nun mit Blockingpuffer (BP, 1%BSA in PBS+) für eine Stunde bei Raumtemperatur in stetiger Bewegung inkubiert. Die Erstantikörper wurden gemäß Tabelle 2 Antikörper – IF eingesetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur in stetiger Bewegung inkubiert. Danach wurde dreimal mit Blockingpuffer gewaschen. Nun wurde der Zweitantikörper gemäß Tabelle 2 Antikörper – IF eingesetzt. Zusammen mit DAPI (1 µg/ml in BP) wurde nun für 15 min bei Raumtemperatur in stetiger Bewegung inkubiert. Danach wurde dreimal mit Blockingpuffer gewaschen.

#### *Aufnahme der Fluoreszenzbilder*

Das Objektiv wurde mit Immersionsöl benetzt und der Slide in die Halterung eingesetzt. Die Belichtungszeit wurde in einem Well für die entsprechenden Kanäle optimal eingestellt und gespeichert. Nun wurden in den Wells entsprechende Bildausschnitte ausgewählt, scharf eingestellt und anschließend für die ausgewählten Kanäle belichtet und aufgenommen. Zur Kontrolle der

Hintergrundfluoreszenz wurde eine Aufnahme eines Wells angefertigt, das nur mit dem Zweitantikörper behandelt wurde.

## 2.8 Transendotheliale elektr. Widerstandsmessung (TEER)

### 2.8.1 Material

Tabelle 15 TEER Material

Gerät / Material	Hersteller
Impedanzmessgerät	ECISz, Applied BioPhysics, Troy, NY, USA
Slides	8W10E, Applied BioPhysics, Troy, NY, USA
Programm	ECIS Software v1.2.156.0 PC Applied BioPhysics, Troy, NY, USA

### 2.8.2 Prozedere

Um den Boden zu beschichten, wurde pro Well 300 µl Collagen Typ 1 (35 µg/ml in 0,9%NaCl(aq)) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Für die Versuche wurden nur HUVEC bis Passage 2 verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit PBS- gewaschen und anschließend mit Trypsin abgelöst. Anschließend wurde 20%HUVEC-Medium auf die Zellen gegeben und es wurde eine Konzentration von 225 Zellen/µl eingestellt. Aus den Wells wurde nun die Collagen-Lösung abgesaugt und 400 µl der Zelllösung pro Well appliziert. Die Slides wurden nun im Gerät installiert, in den Inkubator gestellt und das Programm am PC gestartet. Über Nacht sanken die Zellen ab und es stellte sich ein stabiles Niveau in der Impedanz ein. Für die Stimulation wurde die Messung pausiert, es wurden 100 µl Medium pro Well entfernt und anschließend wurden 100 µl Stimulanz gelöst in 20%HUVEC-Medium hinzugefügt. Danach wurde die Messung wieder aufgenommen. Für jeden Versuch wurde der Mittelwert aus zwei gleichbehandelten Wells gebildet.

## 2.9 Permeabilitäts- und Leukozyten-Extravasation-Assay in vivo

### 2.9.1 Material

Tabelle 16 In vivo Versuche Material

Gerät / Material	Hersteller
Operationsinstrumente	Fine Science Tools GmbH (FST), Heidelberg, Deutschland
Operationsmikroskop	Stereomicroscope Stemi 2000-C with stand S, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland
Cremastertisch	Wurde selbst zum Aufspannen des Musculus Cremaster zur Lichtmikroskopie über ein Deckglas montiert
150-Watt Halogenlampe	KL 1500 LCD, Lighting and Imaging SCHOTT AG, Mainz, Deutschland
Fluoreszenzlichtfilter	Filter Set 09, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop	Axiotech vario, modifiziert, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland
Objektiv 5x	EC Plan – NeoFLUAR 5x/0,15, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland
Bildverarbeitungsprogramm	Axiovision Rel. 4.8, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland

### 2.9.2 Tierversuchsgenehmigung und Haltungsbedingungen

Die Versuche wurden unter Beachtung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Ref.: AZ55.2-1-54-2532-172-2013). Alle Tierversuche wurden nach dem „Guide for the care and use of laboratory animals“ (US National Institute of Health, NIH Publication No. 85-23, revised 1996) durchgeführt. Für die Versuche wurden männliche C57B2/6J-Mäuse von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Haltung erfolgte in Tierställen des physiologischen Instituts an der medizinischen Fakultät. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Futter und Wasser und wurden in ventilierten Käfigen (IVC Tecniplast, Hohenpeißenberg, Deutschland) bei 22-23 °C und 50 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Es wurde ein 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus mit Dämmerungsphasen simuliert.

### 2.9.3 Anästhesie

Die Eingriffe wurden unter tiefer Anästhesie durchgeführt. Dabei wurden die Medikamente zur Anästhesie gemäß Tabelle 17 Anästhetika in 0,9%NaCl(aq) gelöst und intraperitoneal verabreicht. Die Tötung nach Durchführung der Versuche erfolgte durch eine zervikale Dislokation unter bestehender Narkose.

**Tabelle 17 Anästhetika**

Medikament	Dosis (mg/kgKG)	Hersteller
Midazolam	5	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Fentanyl	0,005	Cura MED Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Medetomidinhydrochloride	0,5	Pfizer, Berlin, Germany; produced by Orion Pharma Espoo, Finland

### 2.9.4 Präparation des Musculus cremaster

Die Maus wurde auf dem Cremastertisch positioniert und fixiert. Anschließend wurde das Skrotum mit stumpfen Pinzetten vorgespannt und mit einer feinen Federschere eröffnet. Der Cremaster wurde vorsichtig aus dem Skrotum mobilisiert und auf dem Deckglas platziert. Danach wurde das Bindegewebe mit einer Pinzette vorsichtig entfernt und der Muskel der Länge nach aufgeschnitten. Der Cremaster wurde mit Pins fixiert, dabei wurde vermieden in Blutgefäße zu stechen oder zu schneiden. Der Nebenhoden wurde vorsichtig an den Rand mobilisiert und ebenfalls mit Pins fixiert. Größere Gefäße, die auf den Cremaster ziehen, wurden dabei elektrokauterisiert. In regelmäßigen Abständen wurde der Muskel mit 0,9%NaCl(aq) benetzt.

### 2.9.5 Messung der Endothelpermeabilität

30 min vor Versuchsbeginn wurden 100 µl des pharmakologischen Inhibitors von SHP-2 (PTPi IV, 2 µM in 0,9%NaCl(aq)) intrascrotal injiziert. Die Versuche wurden gemäß 2.9.3 Anästhesie und 2.9.4 Präparation des Musculus cremaster vorbereitet. Anschließend wurde eine geeignete Stelle unter Durchlicht aufgesucht. Alle weiteren Aufnahmen wurden mit Fluoreszenzlicht aufgenommen. 20 µl FITC (150 kDa, 5% in 0,9%NaCl(aq)) wurden über die Schwanzvene appliziert und die erste Aufnahme mit einer Belichtungszeit von 2 ms gestartet. Die Versuchszeit startete mit der lokalen



Applikation von 50  $\mu$ l Stimulanz (IL-1 $\beta$ , 10 ng/ml in 0,9%NaCl(aq)) und von PTPi IV, 2  $\mu$ M in 0,9%NaCl(aq)) auf den Musculus cremaster. Alle weiteren Aufnahmen folgten in Abständen von 5 min. Nach jeder Aufnahme wurde der Cremaster mit ein paar Tropfen 0,9%NaCl(aq) befeuchtet. Als Kontrolle wurde sowohl bei der Vorinkubation als auch bei der Stimulation die entsprechende Menge DMSO in 0,9%NaCl(aq) verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Axiovision 4.8. Bei jeder Aufnahme wurden jeweils drei ROIs gemessen, aus denen der Mittelwert gebildet und zur besseren Vergleichbarkeit zu anderen Messreihen in ein Verhältnis zu den Mittelwerten vom Stimulationsstart gesetzt (Relative Permeabilitäts Einheit = RPE).

### **2.9.6 Messung der Leukozyten-Extravasation**

Es wurden 100  $\mu$ l des pharmakologischen Inhibitors von SHP-2 (PTPi IV, 2  $\mu$ M in 0,9%NaCl(aq)) und IL-1 $\beta$  (10 ng/ml in 0,9%NaCl(aq)) intrascrotal injiziert und für vier Stunden inkubiert. Unmittelbar nach der Tötung des Tiers wurde der Musculus cremaster in 4 % Formalin in PBS fixiert und anschließend mit Hemacolor® (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) gemäß Herstellerangaben gefärbt. Unter zehnfacher Vergrößerung erfolgte die Aufnahme mehrerer Gesichtsfelder. Die Anzahl ausgetretener Leukozyten wurden in jedem Sichtfeld von zwei verschiedenen Personen und getrennt voneinander gezählt.

## 2.10 Statistische Auswertung

Bei dem Vergleich von zwei voneinander unabhängigen normalverteilten Gruppen wurde der studentsche t-Test angewandt. Bei dem Vergleich zweier abhängiger Gruppen wurde ein gepaarter t-Test angewandt. Bei dem Vergleich von zwei voneinander unabhängigen nicht normalverteilten Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Bei einem Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde ein ANOVA durchgeführt. Waren die Daten hier normalverteilt wurde der one way ANOVA angewandt, anschließend bei gleicher n-Zahl und normalverteilten Daten der Student-Newman-Keuls-Test. Waren die Daten nicht normalverteilt wurde eine ANOVA on ranks (Kruskal-Wallis-Test) ausgeführt und anschließend eine paarweise Kontrolle nach der Dunns-Methode. Bei einem p-Wert von  $< 0,05$  wurden die Ergebnisse als signifikant betrachtet.

Die Daten werden, wenn nicht anders angegeben, in folgender Form präsentiert:

Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n = Anzahl der Versuche.

### 3 Ergebnisse

---

#### 3.1 Die Bedeutung der Aktivität von SHP-2 für die Aufrechterhaltung der endothelialen Barriere

##### 3.1.1 Ein Funktionsverlust von SHP-2 erhöht die endotheliale Permeabilität in vitro

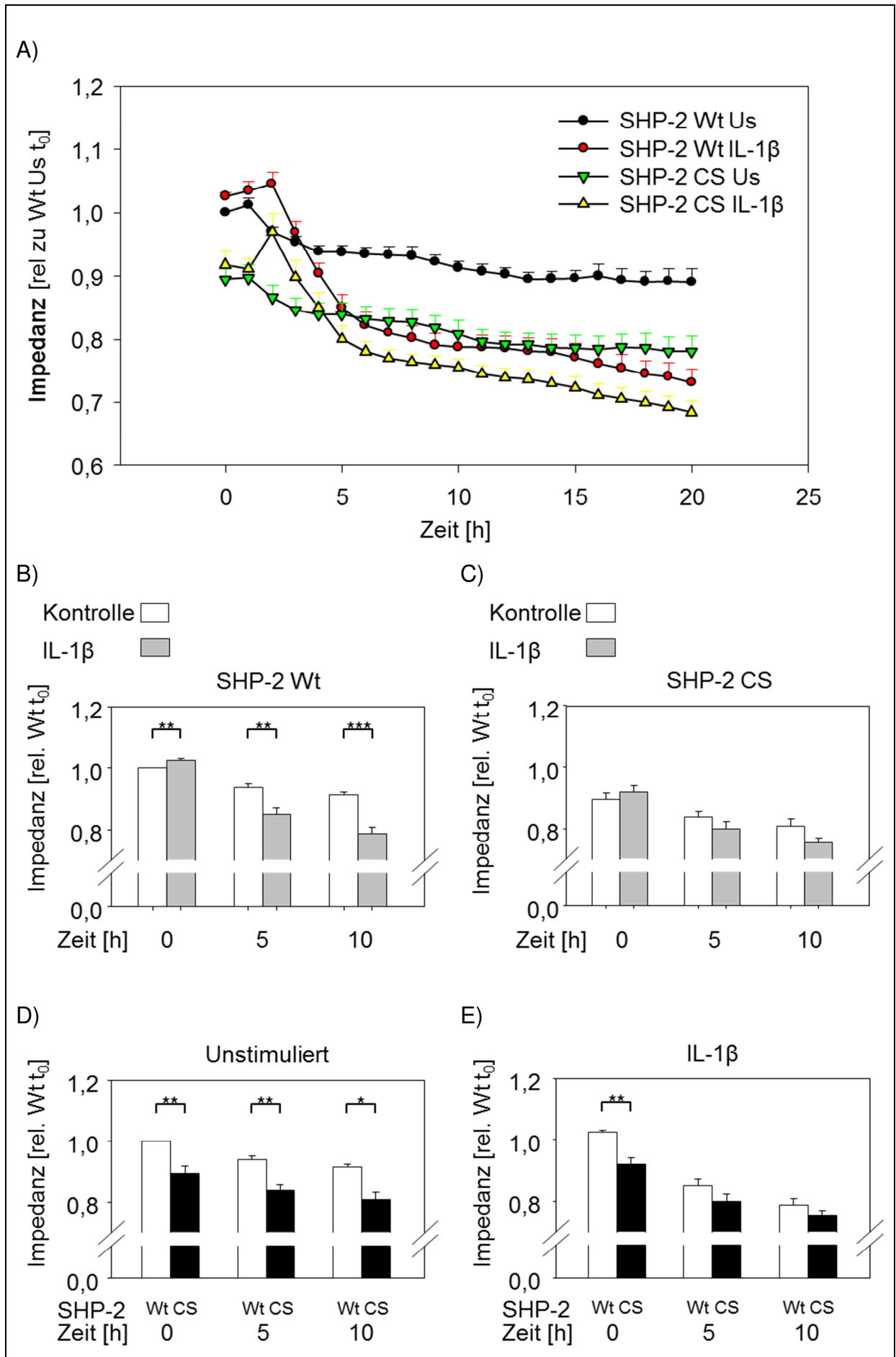
Um zu untersuchen, ob die Aktivität von SHP-2 die Permeabilität der Endothelzellen beeinflusst, wurde die transendotheliale elektrische Widerstandsmessung (TEER) an HUVEC durchgeführt, welche eine inaktive Mutante von SHP-2 (SHP-2 CS) überexprimieren und mit Zellen verglichen, die den Wildtyp von SHP-2 (SHP-2 Wt) überexprimieren. Bei der TEER werden Zellen auf flache Elektroden eingesät. Die Zellschicht bildet eine Isolierung auf den Elektroden. Bei einer Zunahme der Permeabilität der Endothelzellen vergrößern sich die Zellzwischenräume, was in der TEER einer Widerstandsabnahme entspricht, da die Isolierung der Elektroden durch die Zellschicht abnimmt [86].

Für die Versuche wurden HUVEC mit SHP-2 Wt und SHP-2 CS transduziert und anschließend in Wells für die transendotheliale Widerstandsmessung eingesät. Nachdem die Impedanz ein stabiles Niveau erreicht hatte, wurde zum Zeitpunkt Null mit IL-1 $\beta$  [10 ng/ml] stimuliert (Abbildung 3.1.1 A). Für eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Messreihen untereinander wurden aus je zwei identisch behandelten Wells Mittelwerte gebildet und ins Verhältnis zum Mittelwert der SHP-2 Wt exprimierenden HUVEC zum Zeitpunkt Null gesetzt (Relative Impedanz Einheiten = RIE). Für Darstellungszwecke wurden aus der Impedanzmessung drei Zeitpunkte (0 h, 5 h und 10 h nach Stimulationsbeginn) ausgewählt und näher untersucht.

Bei der TEER konnte gezeigt werden, dass HUVEC, die SHP-2 Wt exprimieren, nach 5 Stunden IL-1 $\beta$ -Stimulation mit  $0,85 \pm 0,05$  RIE eine signifikant geringere Impedanz aufwiesen als die unstimulierte Vergleichsgruppe mit  $0,94 \pm 0,02$  RIE ( $n=5$ ,  $p<0,01$ ). Nach 10 Stunden Stimulation mit IL-1 $\beta$  war dieser Unterschied immer noch signifikant nachweisbar (Abbildung 3.1.1 B). Beim Vergleich mit der unstimulierten Gruppen zeigte sich, dass mit SHP-2 CS transduzierte Zellen im Vergleich zu mit

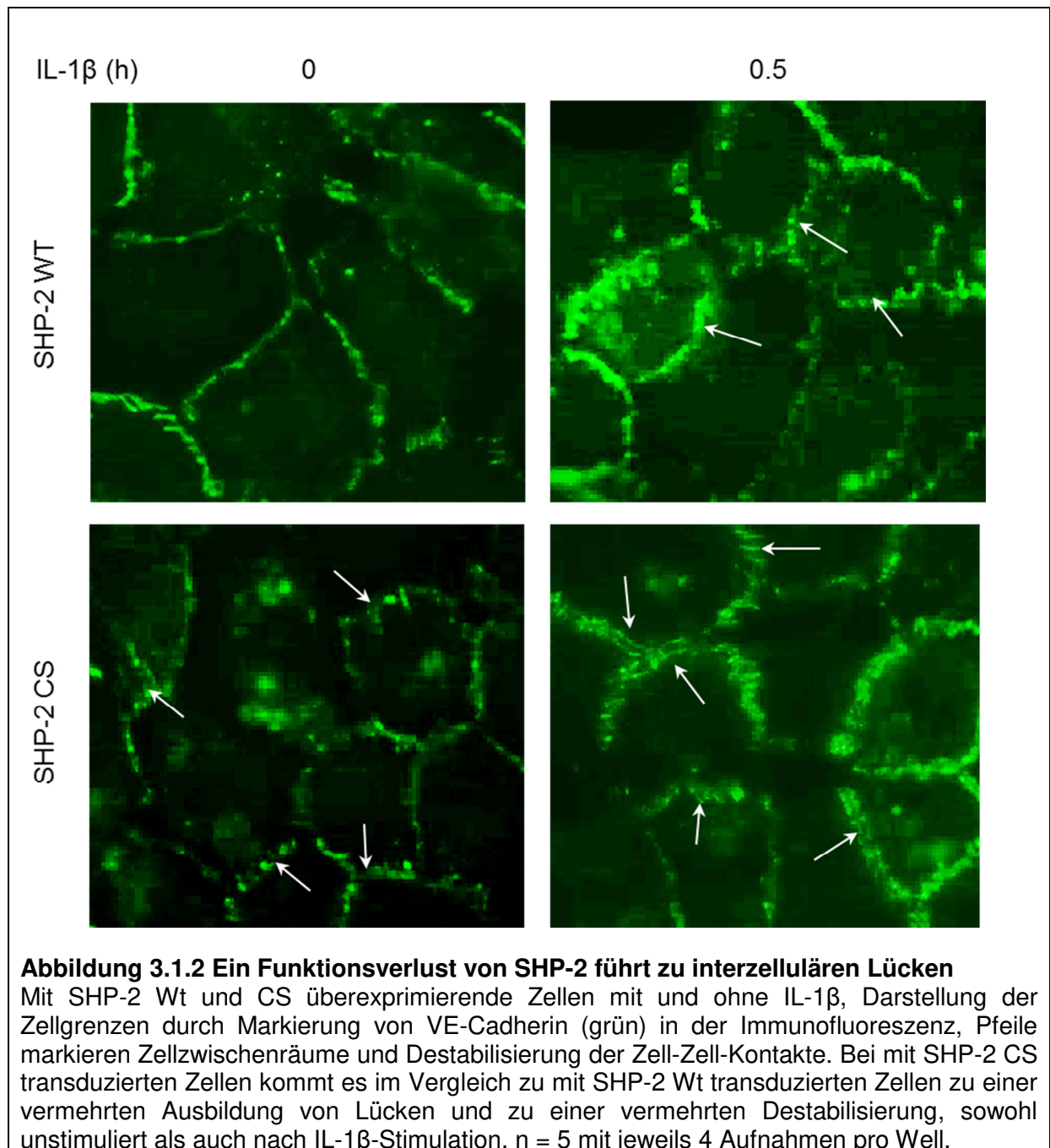
SHP-2 Wt transduzierten Zellen eine signifikant geringere Impedanz aufwiesen (Abbildung 3.1.1 D). Nach der Stimulation mit IL-1 $\beta$  zeigten sowohl SHP-2 Wt als auch SHP-2 CS exprimierende HUVEC ähnliche Impedanzen, wobei auch hier SHP-2 CS exprimierende Zellen tendenziell geringere Impedanzen aufwiesen (Abbildung 3.1.1 E).

Diese Ergebnisse konnten durch Immunfärbung von VE-Cadherin bestätigt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass es bei einer Stimulation mit IL-1 $\beta$  bei SHP-2 Wt überexprimierenden HUVEC zu einer Ausbildung von vermehrten Zellzwischenräumen und zu einer Formation eines „zig-zag“-Musters von VE-Cadherin kam, das ein Anhalt für eine Destabilisierung von Zell-Zell-Kontakten ist [87]. Ferner zeigte sich, dass die SHP-2 CS überexprimierenden HUVEC im Vergleich zu SHP-2 Wt überexprimierenden HUVEC mehr Zellzwischenräume zwischen den Zellen haben und ein vermehrtes „zig-zag“-Muster als Anhalt für eine Destabilisierung der Zell-Zellkontakte aufwiesen. Bei der Betrachtung der mit IL-1 $\beta$  stimulierten Gruppe kam es ebenfalls bei SHP-2 CS überexprimierenden HUVEC im Vergleich zu SHP-2 Wt überexprimierenden HUVEC zu einer vermehrten Lückenbildung und erhöhten Destabilisierung der Zell-Zellkontakte (Abbildung 3.1.2).



**Abbildung 3.1.1 Ein Funktionsverlust von SHP-2 erhöht die endotheliale Permeabilität**

A) Impedanzmessung in mit SHP-2 Wt und CS überexprimierenden Zellen mit und ohne IL-1 $\beta$  [10 ng/ml], n = 5; Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. B) Vergleich des Effekts der IL-1 $\beta$ -Stimulation in SHP-2 Wt exprimierenden HUVEC, \*\*p<0,01 bei 0 h und bei 5 h, \*\*\*p<0,001 bei 10 h. C) Vergleich des Effekts der IL-1 $\beta$ -Stimulation in SHP-2 CS exprimierenden HUVEC, wobei eine Tendenz zu geringeren Impedanzen nach IL-1 $\beta$ -Stimulation zu erkennen ist. D) Vergleich des Effekts der Expressierung der inaktiven Mutante SHP-2 CS mit Wt in der unstimulierten Gruppe, \*\*p<0,01 bei 0 h und 5 h, \*p<0,05 bei 10 h. E) Vergleich des Effekts der Expressierung der inaktiven Mutante SHP-2 CS mit Wt in der mit IL-1 $\beta$  stimulierten Gruppe, \*\*p<0,01 bei dem Zeitpunkt 0 h ohne Stimulation. Nach der Stimulation ist kein signifikanter Unterschied mehr festzustellen, wobei SHP-2 CS exprimierende Zellen tendenziell geringere Impedanzen aufweisen.

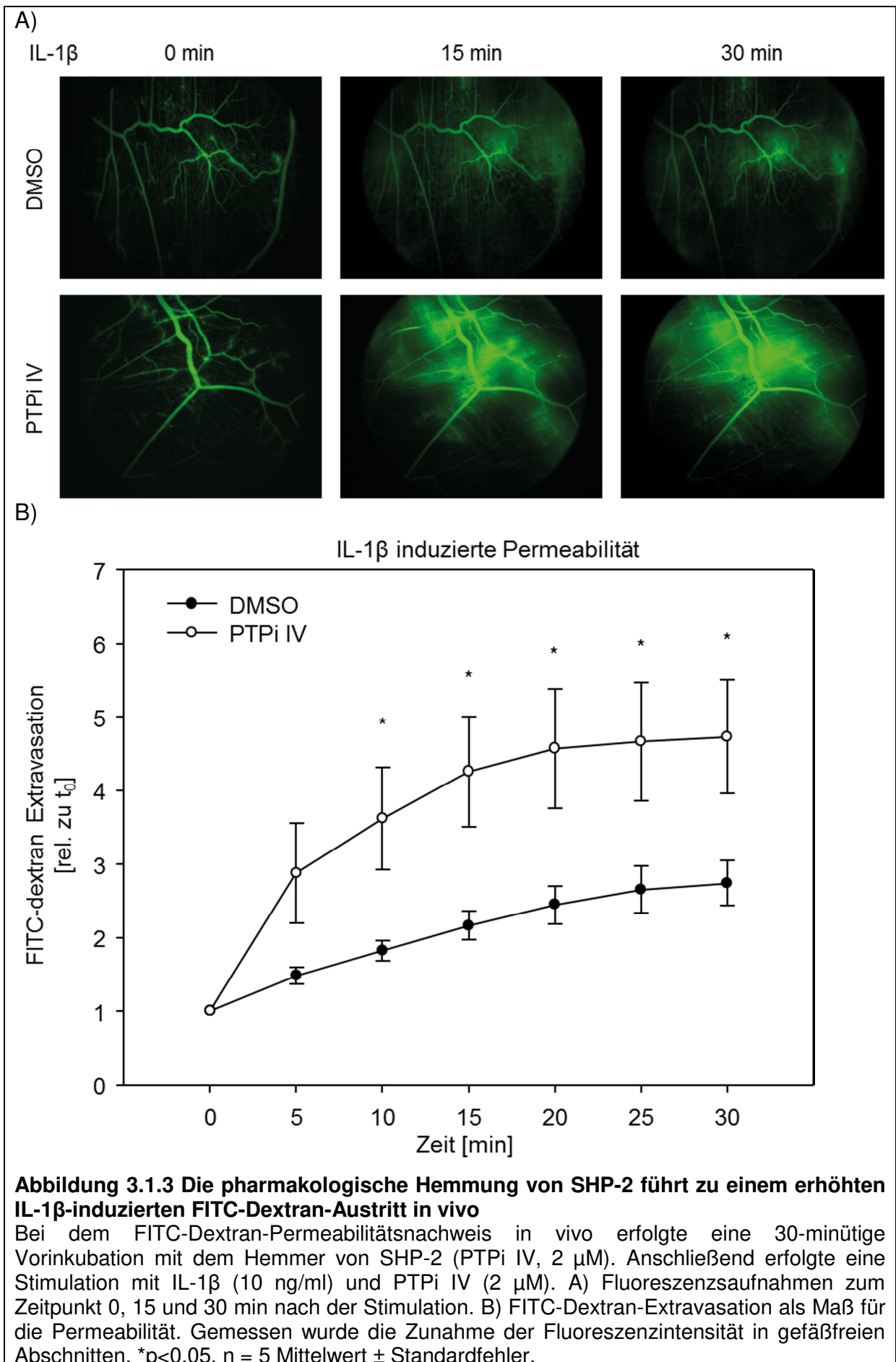


### **3.1.2 Die Inhibition der Aktivität von SHP-2 zeigt eine erhöhte IL-1 $\beta$ -induzierte Permeabilität in vivo**

Nachdem gezeigt wurde, dass SHP-2 einen Einfluss auf die Permeabilität in Endothelzellen in vitro hatte, sollte ferner untersucht werden ob die Aktivität von SHP-2 auch die Permeabilität in vivo beeinflusst. Dazu wurde ein pharmakologischer Hemmer von SHP-2 (PTPi IV) in einem Cremastermodell an Mäusen verwendet, in dem der Austritt eines Fluoreszenzfarbstoffes (150 kDa FITC-Dextran) aus den Gefäßen nach einer Stimulation mit IL-1 $\beta$  gemessen wurde (Abbildung 3.1.3 A).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der SHP-2-Aktivität durch eine Behandlung mit PTPi IV schon nach 10 min IL-1 $\beta$ -Stimulation im Vergleich zur Kontrollbehandlung ( $1,82 \pm 0,31$  Relative Permeabilitäts Einheit = RPE, n = 5) in einer signifikant höheren Permeabilität resultierte ( $3,62 \pm 1,55$  RPE, n = 5,  $p < 0,05$ ). Auch bei späteren Zeitpunkten ließ sich dieser Effekt signifikant nachweisen (Abbildung 3.1.3 B).

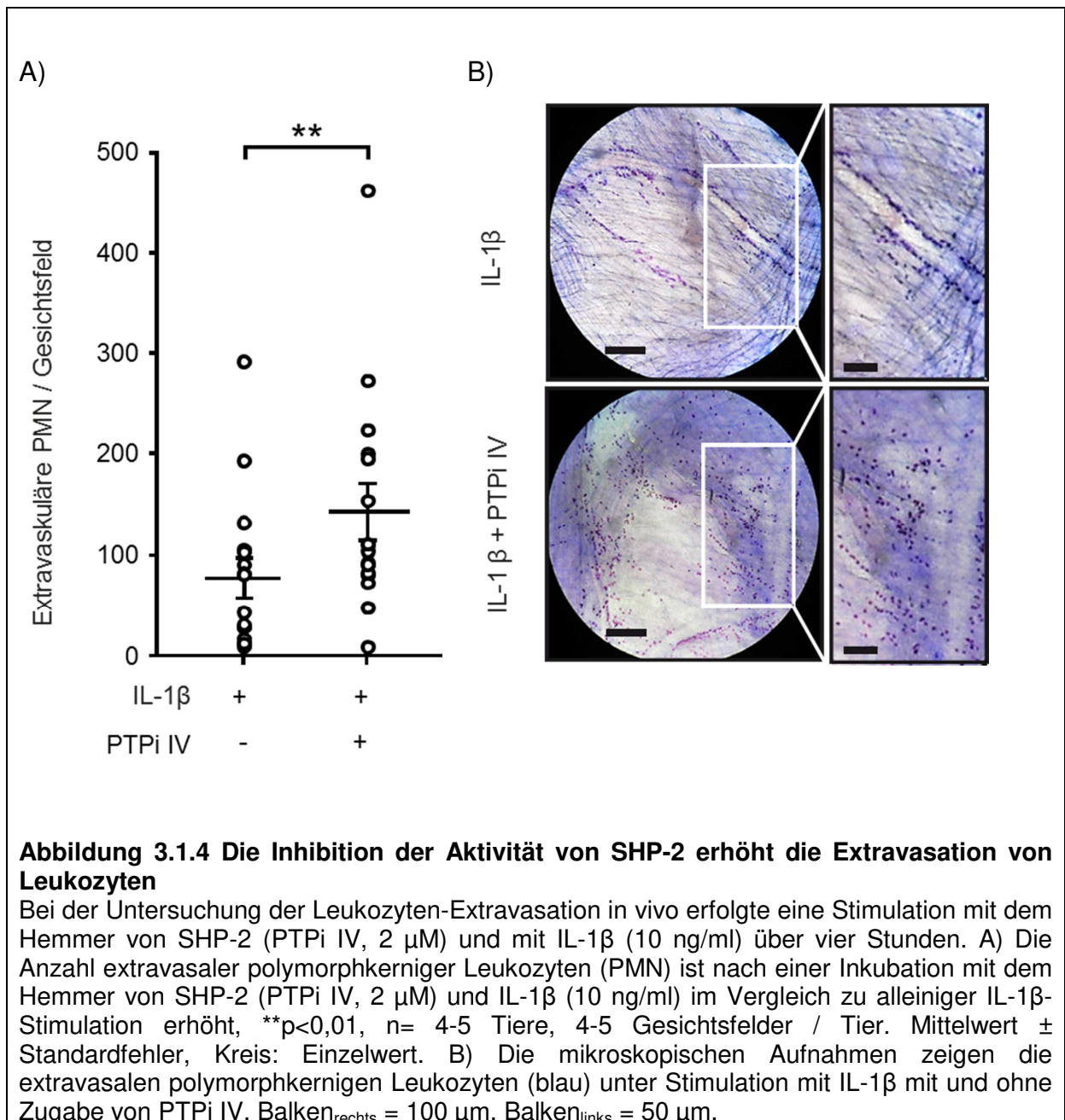




### **3.1.3 Die pharmakologische Hemmung der SHP-2 Aktivität fördert die Extravasation von Leukozyten in vivo**

Im Rahmen von Entzündungsreaktionen kommt es neben einer Permeabilitätserhöhung auch zu einer Leukozyten-Extravasation [19]. Diese wird durch eine erhöhte Permeabilität begünstigt [53]. Nachdem gezeigt wurde, dass eine Hemmung von SHP-2 in einer erhöhten Permeabilität und einer vermehrten Lückenbildung zwischen den Endothelzellen resultiert, sollte ferner untersucht werden, ob eine pharmakologische Hemmung von SHP-2 (PTPi IV, 2  $\mu$ M) auch zu einer vermehrten Extravasation von Leukozyten in vivo führt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass es durch eine Inkubation mit PTPi IV unter einer Stimulation von IL-1 $\beta$  im Vergleich zu einer alleinigen IL-1 $\beta$ -Stimulation zu einer vermehrten Anzahl von extravasalen Leukozyten kommt ( $p < 0.01$ ,  $n = 4-5$  Tiere, 4-5 Gesichtsfelder / Tier; Abbildung 3.1.4).

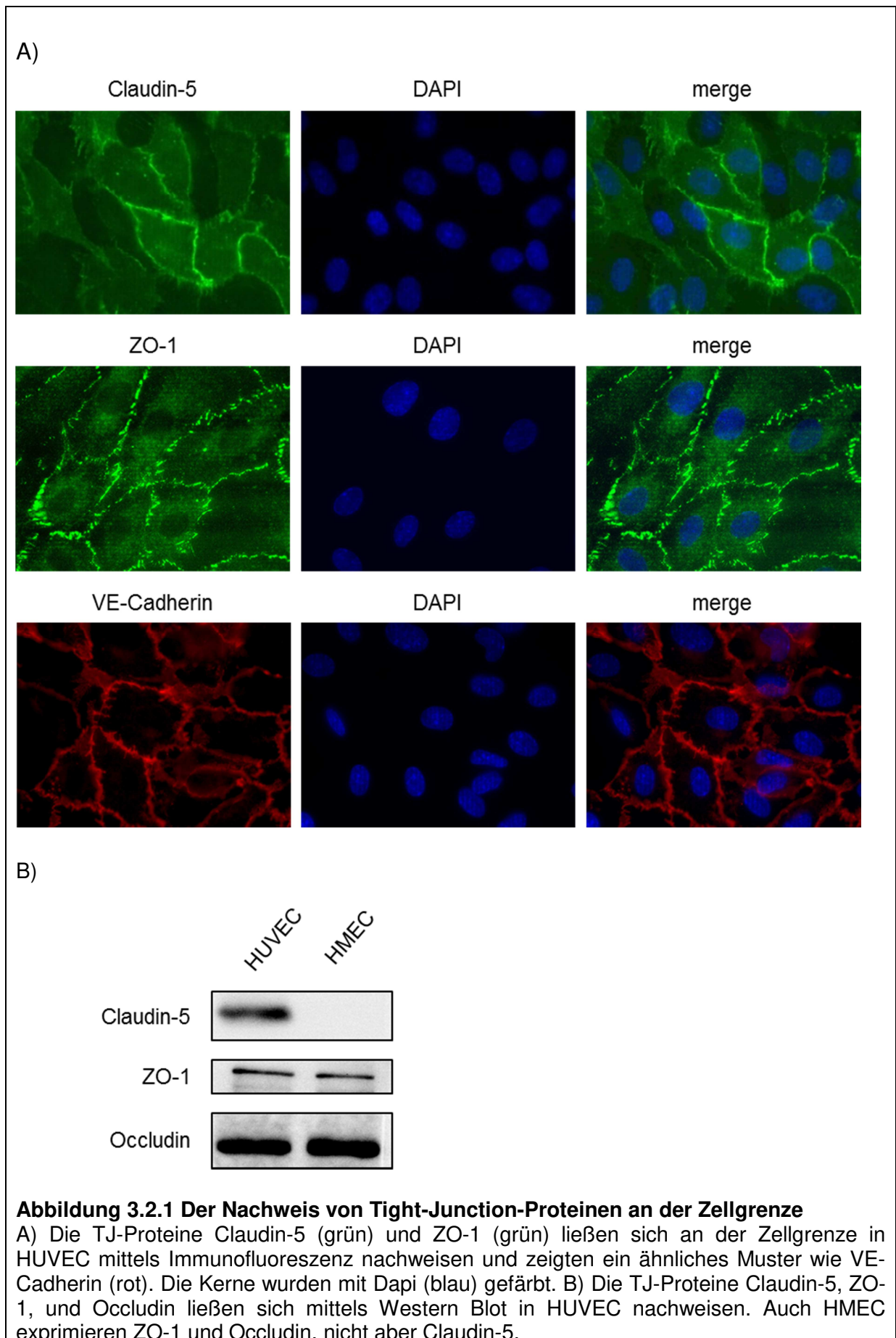


## **3.2 SHP-2 beeinflusst die Proteinmenge von Tight-Junction-Proteinen in Endothelzellen**

### **3.2.1 Nachweis von Tight-Junction-Proteinen in HUVEC**

Nachdem festgestellt werden konnte, dass SHP-2 die Durchlässigkeit der Endothelzellen beeinflusst, wurde als nächstes untersucht, ob SHP-2 das Vorhandensein von TJ-Proteinen beeinflusst. Als erstes wurde untersucht, welche TJ-Proteine in HUVEC vorhanden sind. Dabei konzentrierten wir uns auf Occludin, das als erstes Transmembranprotein TJ zugeordnet wurde [21], auf Claudin-5, dessen Expression hochselektiv für Endothelzellen ist [23] sowie auf das Adapterprotein ZO-1, das als zentraler Adapter für Transmembranproteine und das Zytoskelett gilt [19]. Mittels Immunofluoreszenz erfolgte eine Anfärbung der TJ-Proteine Claudin-5 und ZO-1. Zum Vergleich wurde VE-Cadherin als bekanntes Molekül von endothelialen Zellgrenzen angefärbt [88]. Da Endothelzellen je nach Herkunft unterschiedliche TJ-Proteine exprimieren, wurden sowohl HUVEC als auch HMEC untersucht.

In den Versuchen zeigten Claudin-5 und ZO-1 ein ähnliches Anfärbeverhalten an der Zellgrenze wie VE-Cadherin (Abbildung 3.2.1 A). Eine Anfärbung von Occludin gelang in der Immunofluoreszenz nicht, was auf die Antikörper zurückzuführen ist. Im Western Blot gelang der Nachweis sowohl von Occludin als auch von Claudin-5 und ZO-1. Es konnte hierdurch gezeigt werden, dass alle drei TJ-Proteine in HUVEC vorhanden sind, wohingegen lediglich ZO-1 und Occludin in HMEC nachgewiesen werden konnten (Abbildung 3.2.1 B).

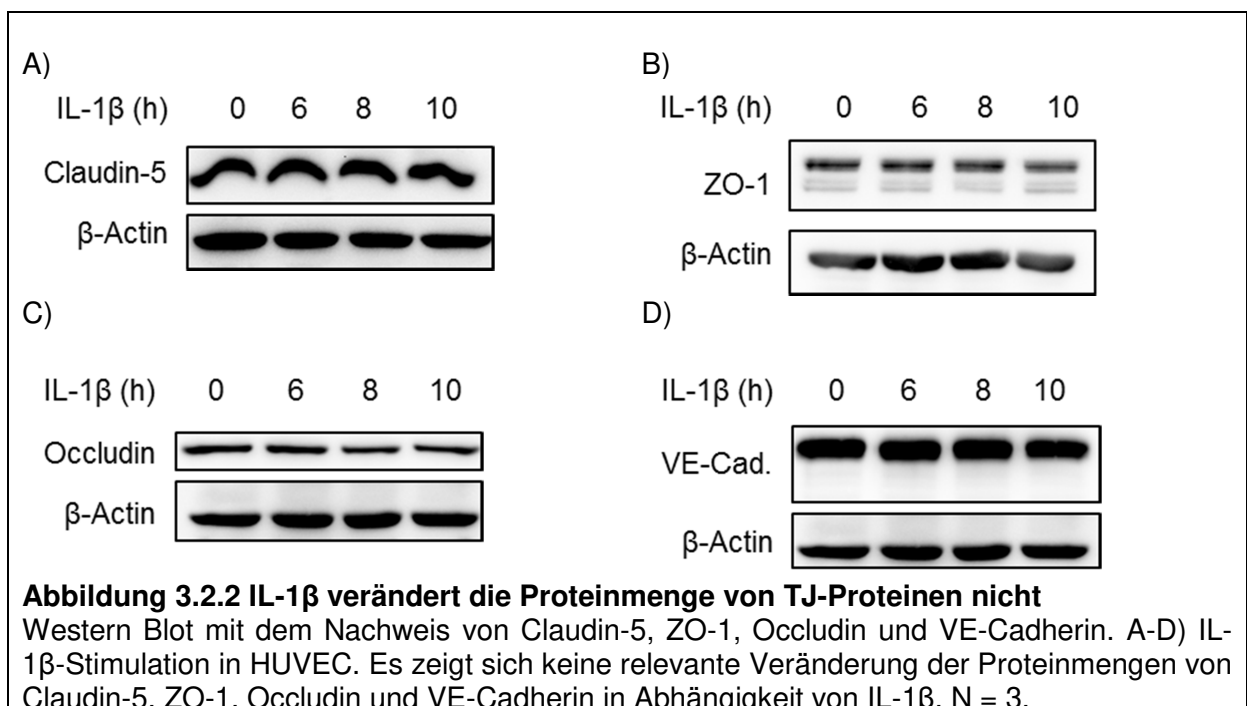


### 3.2.2 IL-1 $\beta$ hat keinen Einfluss auf die Proteinmengen von Claudin-5, ZO-1 und Occludin

Bisher konnte gezeigt werden, dass SHP-2 einen Einfluss auf die endotheliale Permeabilität hat. Dieser Effekt konnte auch während IL-1 $\beta$ -Stimulation beibehalten werden. Anschließend sollte daher untersucht werden, inwiefern IL-1 $\beta$  einen Einfluss auf TJ-Proteine hat. Dazu wurde eine Stimulationsreihe mit IL-1 $\beta$  in HUVEC durchgeführt.

Für die Versuche wurden HUVEC mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen lysiert. Im Western Blot erfolgte der Nachweis der Proteine Claudin-5, ZO-1, Occludin und VE-Cadherin.

Bei der IL-1 $\beta$ -Stimulation in HUVEC konnte gezeigt werden, dass die Proteinmenge von Claudin-5, ZO-1 und Occludin keine relevante Veränderung zeigt. Auch das bereits gut untersuchte VE-Cadherin an AJ zeigte keine Veränderungen der Proteinmenge unter IL-1 $\beta$  (Abbildung 3.2.2)

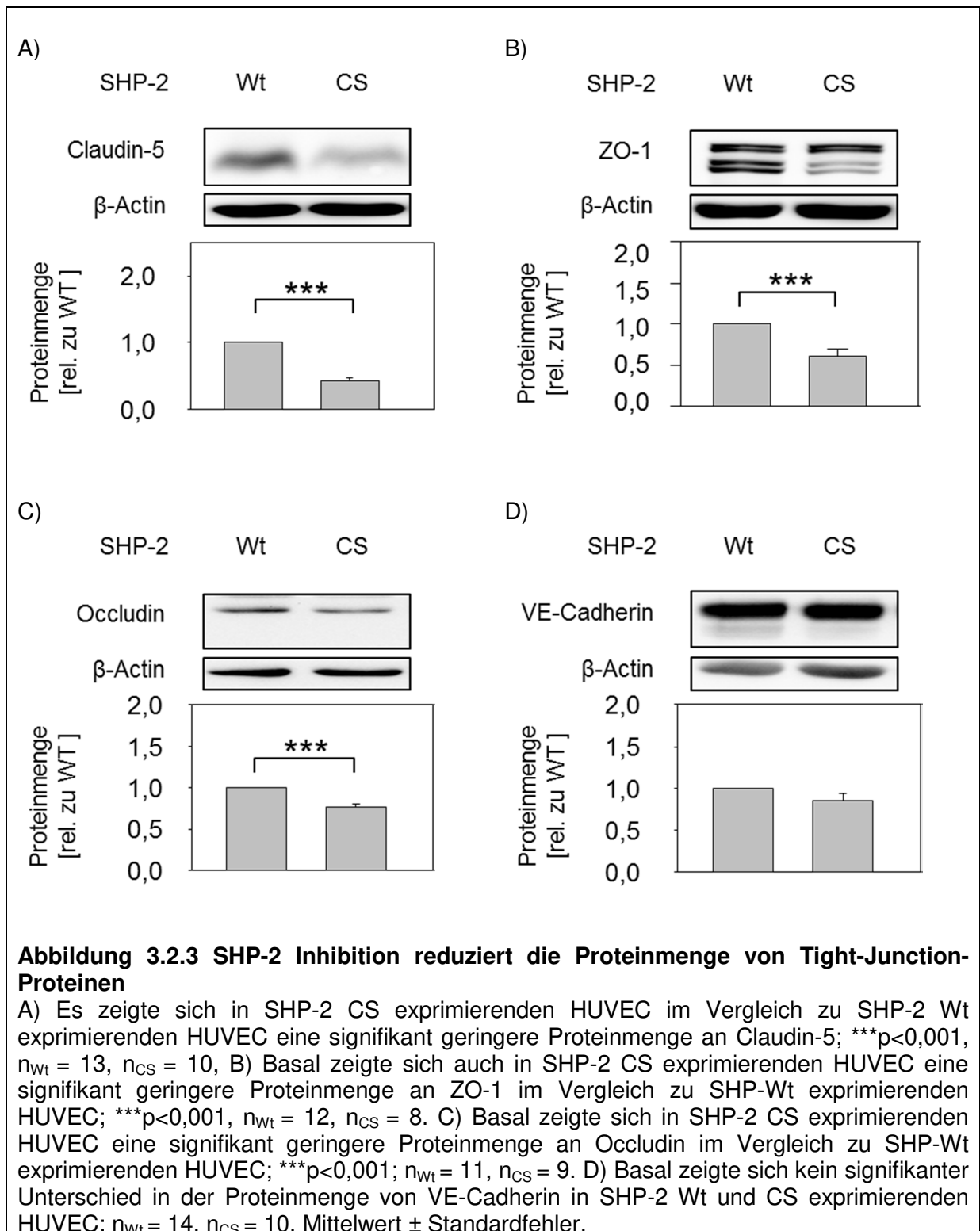


### **3.2.3 Der Verlust der Phosphatasefunktion von SHP-2 führt zu erniedrigten Proteinmengen von Claudin-5, ZO-1 und Occludin, nicht aber von VE-Cadherin**

Es konnte gezeigt werden, dass SHP-2 einen Einfluss auf die endotheliale Permeabilität hat und dass die Proteinmenge von den TJ-Proteinen Claudin-5, ZO-1 und Occludin nicht durch IL-1 $\beta$  verändert wird. Als nächstes sollte untersucht werden, ob SHP-2 einen Einfluss auf die Proteinmenge von TJ-Proteinen hat. Dazu wurden die inaktive Mutante SHP-2 CS und der Wildtyp von SHP-2 in HUVEC exprimiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der TJ-Proteine mittels Western Blot. Als Vergleich diente VE-Cadherin als bekanntes Molekül der endothelialen Barriere.

HUVEC wurden mit SHP-2 Wt und CS (inaktiv) mittels lentiviralem Gentransfer transduziert. 72 Stunden nach der Transduktion wurden die Zellen lysiert. Im Western Blot erfolgte der Nachweis der Proteine ZO-1, Claudin-5, Occludin und VE-Cadherin. Mittels Densitometrie wurden die Proteinmengen in den Proben quantifiziert. Zur besseren Vergleichbarkeit zu anderen Messreihen, wurden die Messwerte in ein Verhältnis zu den Messwerten vom SHP-2 Wt gesetzt (Relative Densitometrie Einheit = RDE).

Es konnte gezeigt werden, dass die Proteinmenge von Claudin-5 in HUVEC mit SHP-2 CS exprimierenden HUVEC im Vergleich zu den Wildtyp exprimierenden HUVEC signifikant erniedrigt war ( $***p < 0,001$ ,  $n_{Wt} = 13$ ,  $n_{CS} = 10$ ). Auch bei dem Nachweis von ZO-1 ( $***p < 0,001$ ,  $n_{Wt} = 12$ ,  $n_{CS} = 8$ ) und Occludin ( $***p < 0,001$ ,  $n_{Wt} = 11$ ,  $n_{CS} = 9$ ) zeigte sich eine signifikante Erniedrigung bei SHP-2 CS exprimierenden HUVEC (Abbildung 3.2.3 A – C). Im Gegensatz dazu hatte die SHP-2 Aktivität keinen Einfluss auf die Proteinmenge von VE-Cadherin ( $n_{Wt} = 14$ ,  $n_{CS} = 10$ ). Interessanterweise war der Einfluss von SHP-2 auf die TJ-Proteinmenge von Claudin-5 am größten und zeigte hier die stärkste Reduktion bei SHP-2 CS überexprimierenden HUVEC.



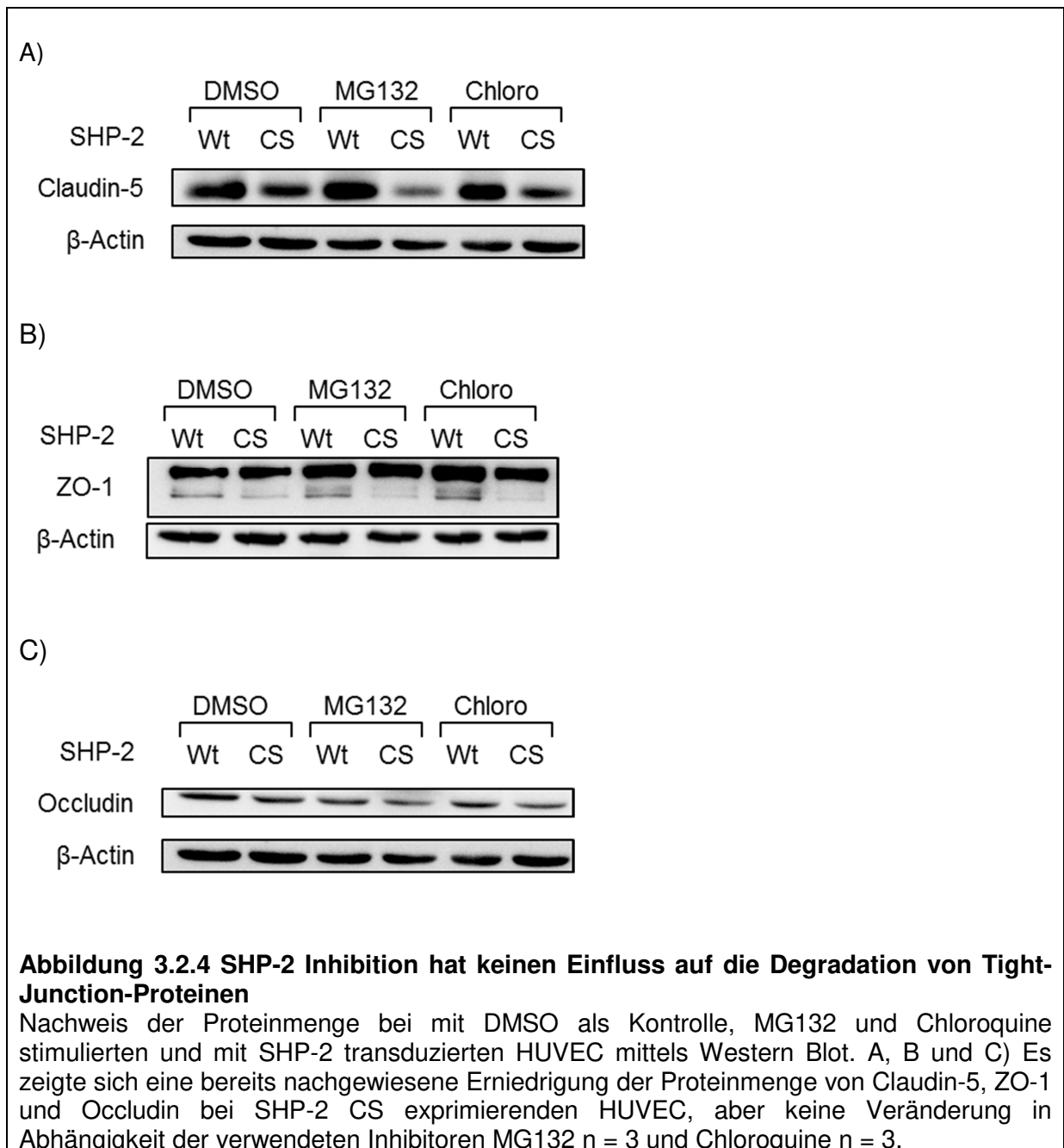


### **3.2.4 SHP-2 hat keinen Einfluss auf den Abbau von Tight-Junction-Proteinen**

TJ-Proteine können vermehrt abgebaut werden oder vermindert exprimiert werden. Für einen Abbau müssen die membranständigen Proteine durch Endozytose internalisiert werden. Der Abbau erfolgt entweder in Lysosomen oder durch das Proteasom. Um zu untersuchen, inwiefern es durch den Verlust der Phosphatasefunktion von SHP-2 zu einer erniedrigten Menge der TJ-Proteine kommt, wurde in HUVEC ermittelt, ob die Reduktion der TJ-Proteine in SHP-2 CS exprimierenden HUVEC mittels Hemmung des Abbaus verhindert werden konnte.

Für die Versuche wurden HUVEC mit SHP-2 Wt und CS mittels lentiviralem Gentransfers transduziert. 72 Stunden nach der Transduktion wurden die Zellen für 6 Stunden mit dem pharmakologischen Proteasominhibitor MG132 (10  $\mu$ M) und mit einem Hemmer des lysosomalen Abbaus (Chloroquine, 150  $\mu$ M) inkubiert und anschließend lysiert. Im Western Blot erfolgte der Nachweis der Proteine Claudin-5, ZO-1, und Occludin.

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass es basal zu einer Erniedrigung der Proteinmenge von Claudin-5, ZO-1 und Occludin in SHP-2 CS exprimierenden HUVEC kommt (analog zu den Ergebnissen in Kap. 3.2.3). Nach Inkubation mit den verschiedenen Hemmern des Abbaus konnte im Vergleich zu SHP-2 Wt überexprimierenden Zellen immer noch eine verminderte Menge von TJ-Proteinen in SHP-2 CS überexprimierenden Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 3.2.4 A-C).

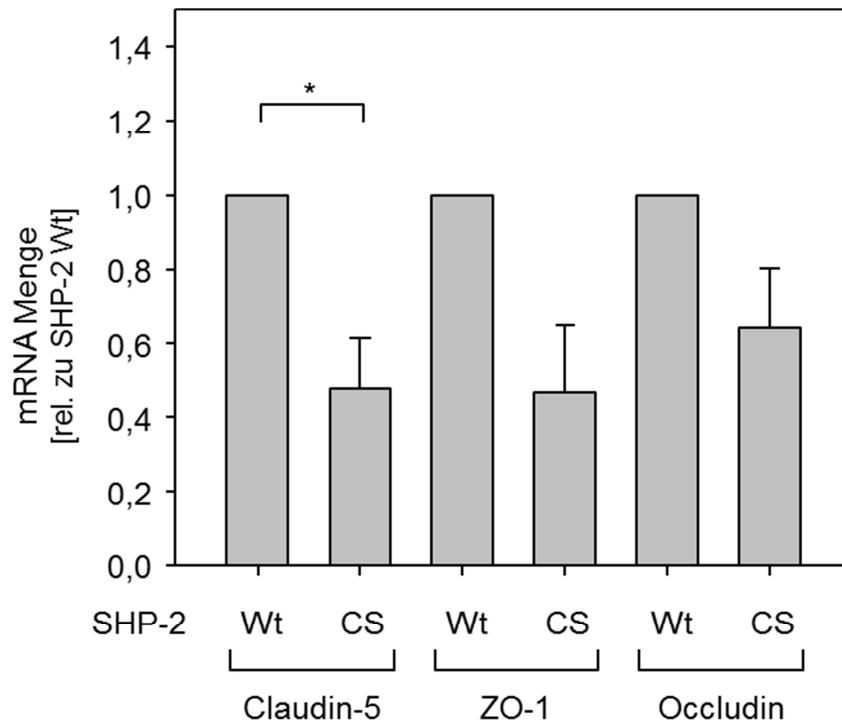


### **3.2.5 SHP-2 wird für die Expression von Tight-Junction-Proteinen benötigt**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Verlust der Phosphatasefunktion von SHP-2 zu einer erniedrigten Proteinmenge von TJ-Proteinen führt, die scheinbar nicht durch die Degradation verursacht wurde, sollte ferner untersucht werden, ob die verminderte TJ-Proteinmenge durch eine verminderte Expression zu Stande kommt. Hierfür wurde untersucht, ob es zu veränderten Mengen an mRNA unter der Expression der inaktiven Mutante CS von SHP-2 kommt.

Für die Versuche wurden HUVEC mit SHP-2 Wt und CS mittels lentiviralem Gentransfers transduziert. 72 Stunden nach der Transduktion wurden die Zellen lysiert und RNA extrahiert. Danach erfolgte der mRNA Nachweis mittels quantitativer reverser Transkriptase-PCR.

Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Menge von Claudin-5 unter SHP-2 CS exprimierenden HUVEC im Vergleich zu SHP-2 Wt exprimierenden HUVEC signifikant erniedrigt war ( $p < 0,05$ ,  $n = 4$ ). Auch die mRNA-Menge von ZO-1 ( $n = 5$ ) und Occludin ( $n = 6$ ) war bei SHP-2 CS exprimierenden HUVEC im Vergleich zu SHP-2 Wt exprimierenden HUVEC tendenziell erniedrigt (Abbildung 3.2.5).



**Abbildung 3.2.5 Eine Inhibition von SHP-2 führt zu einer geringeren Menge an mRNA von Claudin-5**

Nachweis von mRNA mittels quantitativer reverser Transkriptase-PCR in SHP-2 Wt und CS transduzierten HUVEC. In SHP-2 CS exprimierenden HUVEC zeigte sich im Vergleich zu SHP-2 Wt exprimierenden HUVEC eine signifikante Erniedrigung der mRNA-Menge von Claudin-5, \*  $p < 0,05$ ,  $n = 4$ . Auch die mRNA-Menge von ZO-1 und Occludin war tendenziell erniedrigt, aber nicht so stark wie bei Claudin-5.  $N(\text{ZO-1}) = 5$ ,  $n(\text{Occludin}) = 6$ , Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

## 4 Diskussion

---

### 4.1 Die Aktivität von SHP-2 hat Einfluss auf die endotheliale Permeabilität

Die Permeabilität ist in zahlreichen pathologischen Prozessen relevant [2]. Eine erhöhte Permeabilität kommt bei Entzündungen, wie der Sepsis oder auch bei malignen Tumoren und Ischämien vor und trägt zu dem Verlauf und der Prognose der Erkrankungen bei [8-11]. Zwar ist die endotheliale Permeabilität schon seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Arbeit, dennoch sind Regulierung und Limitationen noch nicht hinreichend erforscht. So ist es nicht verwunderlich, dass es bei dieser Betrachtung verschiedene Meinungen gibt. Gunzel et al. (2013) betonen die wichtige Bedeutung von TJ in der Regulation der Permeabilität, wohingegen Komarova et al. (2017) AJ mit VE-Cadherin in den Mittelpunkt stellen [18, 89]. Darüber hinaus gibt es bisher noch keine Publikation, die den Zusammenhang zwischen IL-1 $\beta$  induzierter Permeabilität und SHP-2 untersucht hat. In dieser Arbeit konnte dieser Zusammenhang zwischen SHP-2 und der endothelialen Permeabilität nachgewiesen werden. Im Folgenden wird der Einfluss von AJ und TJ auf diesen Prozess diskutiert.

Die Inaktivierung von SHP-2 führt zu einer erhöhten endothelialen Permeabilität in der Transendothelialen elektrischen Widerstandsmessung (TEER) *in vitro* und *in vivo*. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression einer inaktiven Mutante von SHP-2 im Vergleich zu Wt exprimierenden HUVEC basal eine geringere Impedanz aufweist (Kap. 3.1.1). Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Inhibition von SHP-2 mit einem pharmakologischen Hemmer zu einer erhöhten IL-1 $\beta$  induzierten Permeabilität am Cremastermodell *in vivo* führt (Kap. 3.1.2). Ferner konnte in den Immunofluoreszenz-Untersuchungen festgestellt werden, dass es im Vergleich zur Kontrolle zu einer vermehrten Lückenbildung in SHP-2 CS exprimierenden HUVEC kommt (Kap. 3.1.1). Die in diesem *in-vitro*-Modell beobachteten Lücken könnten das mikroskopische Korrelat für die Impedanzabnahme *in vitro* und die Permeabilitätszunahme *in vivo* sein. Um den Einfluss der TJ-Proteine auf die Permeabilität zu untersuchen, wurden HUVEC mit IL-1 $\beta$  inkubiert. Nachdem gezeigt wurde, dass es durch IL-1 $\beta$  nicht zu einer

wesentlichen Änderung der Proteinmenge von Claudin-5, ZO-1, Occludin und VE-Cadherin, dem bekannten Molekül an AJ, kommt (Kap. 3.2.2.), sollte untersucht werden, ob SHP-2 basal die Menge der TJ-Proteine beeinflusst. Dabei konnte unter der Expression der inaktiven Mutante von SHP-2 im Vergleich zur Kontrolle basal eine signifikant geringere Menge an TJ-Proteinen wie Claudin-5, ZO-1 und Occludin, nicht aber von VE-Cadherin gemessen werden (Kap. 3.2.3). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit denen von Coulombe et al. (2013), die in epithelialen CaCo-Zellen bei einem *Knock-out* von SHP-2 im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls verminderte Impedanzen in Korrelation mit verminderten Proteinmengen an Claudin-1,-2,-4,-8,-15, nicht aber E-Cadherin nachweisen konnten [90].

Hierbei kommen den TJ und speziell Claudin-5 eine besondere Bedeutung zu. Schon 1973 zeigten Claude et al., dass mit abnehmender Zahl der TJ-Stränge auch die Impedanz abfällt und somit die Permeabilität zunimmt [91]. Nitta et al. (2003) haben herausgefunden, dass ein *Knock-out* von Claudin-5 zwar zu einem normal entwickelten Gefäßsystem, aber zu einer Dysfunktion der endothelialen Barriere führt. Sie konnten dabei nachweisen, dass es im Gehirn von Claudin-5-*Knock-out*-Mäusen zu einer verstärkten Akkumulierung von Hoechst-Färbung (<0,5 kDa) kommt, die vor der Fixierung intravenös appliziert wurde. Dahingegen zeigte die Gabe von größeren Molekülen, wie zum Beispiel der Mikroperoxidase (1,9 kDa) oder auch Albumin (68 kDa) keine Akkumulation im Extravasalraum [44]. Folglich könnte die beobachtete Erniedrigung der TEER-Messung in SHP-2 CS exprimierenden HUVEC auf die verminderte Menge an Claudin-5 zurückzuführen sein. Die Rolle von Occludin bleibt hingegen kontrovers. Zwar konnte bei geringeren Proteinmengen von Occludin eine erhöhte Permeabilität festgestellt werden, diese Erkenntnisse stehen aber im Widerspruch zu anderen Ergebnissen aus *Knock-out*-Modellen [19]. Dabei konnte festgestellt werden, dass ein *Knock-out* von Occludin in Mäusen normale TJ-Stränge in Epithelien und keine erhöhte Impedanz über die Darmmukosa aufweist, es jedoch zu erheblichen intestinalen Entzündungen kommt [92].

Bei den *in vivo* Versuchen wurde die Extravasation von FITC-Dextran mit einer Größe von 150 kDa gemessen. Dabei scheint der alleinige Einfluss von Claudin-5 auf diesen Effekt eher unwahrscheinlich. Die Ergebnisse von Nitta et al. (2003), mit einer größen-selektiven Permeabilitätszunahme für Moleküle unter 1 kDa unter einem Claudin-5-*Knock-out*, können nicht erklären wie es zu einer Extravasation von

dem 150 kDa großen FITC-Dextran kommt [44]. Crosby et al. (2005) zeigten, wie eine selektive Inhibition der VE-Cadherin-VE-Cadherin-Interaktion durch Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen VE-Cadherin zu einer Unterbrechung der AJ und zu einer erhöhten Permeabilität führt [93].

VE-Cadherin scheint weiterhin eine wichtige Rolle in der Permeabilitätszunahme unter IL-1 $\beta$  zu haben. Zhu et al. (2012) haben beschrieben, wie es unter IL-1 $\beta$  zu einer erhöhten Permeabilität in Korrelation mit der Internalisierung von VE-Cadherin kommt. Dabei konnten sie nachweisen, dass IL-1 $\beta$  zu einer NF- $\kappa$ B unabhängigen Internalisierung von VE-Cadherin führt. Dabei identifizierten sie den MyD88-ARNO-ARF6 Signalweg [38]. MyD88 als Adapterprotein am IL-1-Rezeptor-1 bindet ARNO. ARNO ist wiederum ein GEF für die GTPase ARF6 und aktiviert es, was zu einer Internalisierung von VE-Cadherin führt [38]. Diese Internalisierung korreliert mit der Permeabilitätszunahme, die anhand eines *transwell-assays* in vitro durchgeführt wurde [38].

SHP-2 kann an mehreren Stellen ansetzen und diesen Prozess beeinflussen. Wessel et al. (2014) haben mehrere Tyrosin-Phosphorylierungen von VE-Cadherin beschrieben. Sie zeigten, dass der Tyrosinrest 685 von VE-Cadherin (VEC-Y685) wichtig für die Regulation der Permeabilität ist [78]. Unter basalen Zuständen ist VEC-Y685 nicht oder nur sehr gering phosphoryliert, unter Histamin und VEGF kommt es zu einer Phosphorylierung und Internalisierung von VE-Cadherin, was eine erhöhte Permeabilität zur Folge hat. Mutanten, die anstelle des Tyrosins ein Phenylalanin hatten (VEC-Y685F), konnten nicht phosphoryliert werden. Das hatte zur Folge, dass es unter Histamin und VEGF nicht mehr zu einer Internalisierung von VE-Cadherin kam und eine Permeabilitätszunahme ausblieb [78]. Die Phosphorylierung von VEC-Y685 steht im Zusammenhang mit der Tyrosinkinase Src, deren Aktivität wiederum mit SHP-2 assoziiert ist [53, 64]. Ha et al. (2008) konnten zeigen, dass es unter VEGF zu einer erhöhten Tyrosin-Phosphorylierung und Aktivierung von Src kommt, was bei einem *Knock-out* von SHP-2 nicht beobachtet werden konnte [94].

Ein weiterer Ansatzpunkt von SHP-2 ist die von Biswas et al. (2006) beschriebene Tyrosin-Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin, die im Zusammenhang mit der Aktivität von SHP-2 Auswirkung auf die Histamin induzierte Permeabilität zeigt [79].  $\beta$ -Catenin interagiert mit VE-Cadherin und dem Zytoskelett [31]. Auch Timmermann et al.

(2012) zeigten, dass es unter Thrombin zu einer Impedanzabnahme und nach zwei bis drei Stunden zu einer Wiederherstellung der Impedanz kommt. Eine Depletion von SHP-2 zeigte dabei auch erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und eine Verlängerung der Wiederherstellungsphase. Da sowohl die durch Histamin als auch die durch Thrombin induzierte Permeabilität abhängig von der Aktivität von SHP-2 im Zusammenhang mit der Tyrosin-Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin ist, ist es denkbar, dass ein so zentraler Regulator an AJ auch in der IL-1 $\beta$  induzierten Permeabilität eine entscheidende Rolle im Zusammenhang mit der Aktivität von SHP-2 spielt.

In noch nicht veröffentlichten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe haben Heun et al. herausgefunden, dass SHP-2 das Adapterprotein MyD88 bindet. Dafür notwendig ist ein *SH2-binding-motif* mit einer Tyrosin-Phosphorylierung an MyD88. Unter IL-1 $\beta$  kam es zu einer Bindung von SHP-2, die die weitere Signaltransduktion einschränkt. Eine Mutante des MyD88, das nicht mehr phosphoryliert werden konnte (MyD88-Y257F), führte zu einer fehlenden Interaktion von SHP-2 und MyD88. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die fehlende Phosphorylierung von MyD88 zu einer geringeren Phosphorylierung von AKT, IKK und MAPK führte. Dies deutet darauf hin, dass SHP-2 MyD88 bindet und durch eine Dephosphorylierung den IL-1 $\beta$ -Signalweg negativ reguliert. Eine Inaktivierung von SHP-2 führte nicht nur zur verstärkten Signaltransduktion, sondern auch zur vermehrten Leukozytenadhäsion in Korrelation mit einer erhöhten Expression von den Leukozytenadhäsions-Molekülen ICAM-1 und VCAM-1. MyD88, als zentrales Adaptermolekül in der Signalweiterleitung am IL-1-Rezeptor-1, mit SHP-2 als dessen Regulator, ist wahrscheinlich auch an der Regulation der Permeabilität beteiligt. Dies muss allerdings noch untersucht werden.

Neben den TJ und den AJ kommt auch dem Zytoskelett eine Rolle in der Regulation der Permeabilität zu. ZO-1 verbindet Claudin-5 und Occludin mit dem Zytoskelett der Endothelzellen [34]. Eine Aktivierung des Zytoskeletts und die Bildung von *stress fibres* führt zur einer Kontraktion der Endothelzelle und zu einer Unterbrechung der Zell-Zellkontakte von TJ und AJ [34]. Der Phosphorylierungsstatus der Myosinleichtkette bestimmt die Kontraktilität, eine erhöhte Phosphorylierung führt zur Kontraktion und *stress fibre* Bildung [34]. Diese Phosphorylierung wird durch die MLCK, MLCP und ROCK kontrolliert [45, 95]. Zum Beispiel zeigten Clark et al. (2015), dass es durch eine Inhibition von ROCK zu einer geringeren TNF- $\alpha$



induzierten Permeabilität kommt [96]. Auch konnte gezeigt werden, dass SHP-2 Src dephosphoryliert und damit inaktiviert [64]. Src aktiviert die MLCK, was wiederum zu einer Aktin-Myosin-Kontraktion führt [95]. Folglich müsste eine Inaktivierung von SHP-2 zu einer erhöhten Aktivität von Src führen, was über die MLCK zu einer erhöhten Permeabilität führt [95]. Herrera et al. (2006) zeigten in Fibroblasten einen weiteren potentiellen Interaktionspunkt für die Modulation der IL-1 $\beta$  induzierten Permeabilität. So wird SHP-2 für die Ausbildung von *focal adhesions* benötigt [97]. *Focal adhesions* verbinden das Zytoskelett der Zelle mit Integrinen und somit mit der extrazellulären Matrix und stehen im Zusammenhang mit *stress fibres* und der Permeabilität [95]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter der Expression der inaktiven Mutante SHP-2 CS im Vergleich zur Kontrolle eine geringere Proteinmenge an ZO-1 in HUVEC nachgewiesen wurde (Kap. 3.2.3). Es ist beschrieben, dass eine Runterregulation der Proteinmenge von ZO-1 zur Bildung von *stress fibres* und von *focal adhesion* führt [20]. SHP-2 könnte möglicherweise auch über den ZO-1-*stress-fibre* Signalweg zu einer erhöhten Permeabilität führen.

In dieser Arbeit konnte herausgefunden werden, dass die Aktivität von SHP-2 Einfluss auf die endotheliale Permeabilität von Endothelzellen unter IL-1 $\beta$  nimmt. Dabei müssen folgende Einschränkungen vorgenommen werden. Bei der TEER-Messung in vitro wurde die elektrische Leitfähigkeit gemessen und somit die Nettodiffusion von geladenen Teilchen. Deswegen kann bei einer Widerstandsabnahme nicht unterschieden werden, ob diese durch eine Permeabilitätszunahme für Ionen oder durch die Bildung von interzellulären Lücken, die auch größere Moleküle diffundieren lassen, verursacht wird. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit nicht unterschieden, ob die Proteine an der Zelloberfläche oder in Vesikeln lokalisiert sind, da der Proteinnachweis in Western Blots aus kompletten Zelllysaten erfolgte. Auch bei der Immunofluoreszenz kann nicht unterschieden werden, ob VE-Cadherin an der Oberfläche oder internalisiert vorliegt. Diese Eigenschaft ist aber von essentieller Bedeutung, da die Internalisierung von Membranproteinen, wie VE-Cadherin mit der Zunahme der Permeabilität assoziiert ist [38]. Mögliche Ansätze wären zum Beispiel die Fraktionierung der Zelllysate in eine Membranfraktion, Vesikelfraktion und Zytosolfraktion und eine anschließende Untersuchung mittels Western Blot. Eine weitere Methode kombiniert die Immunofluoreszenz mit einem *Internalisierungs-Assay* [38]. Dabei werden auf lebende Endothelzellen in vitro Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von

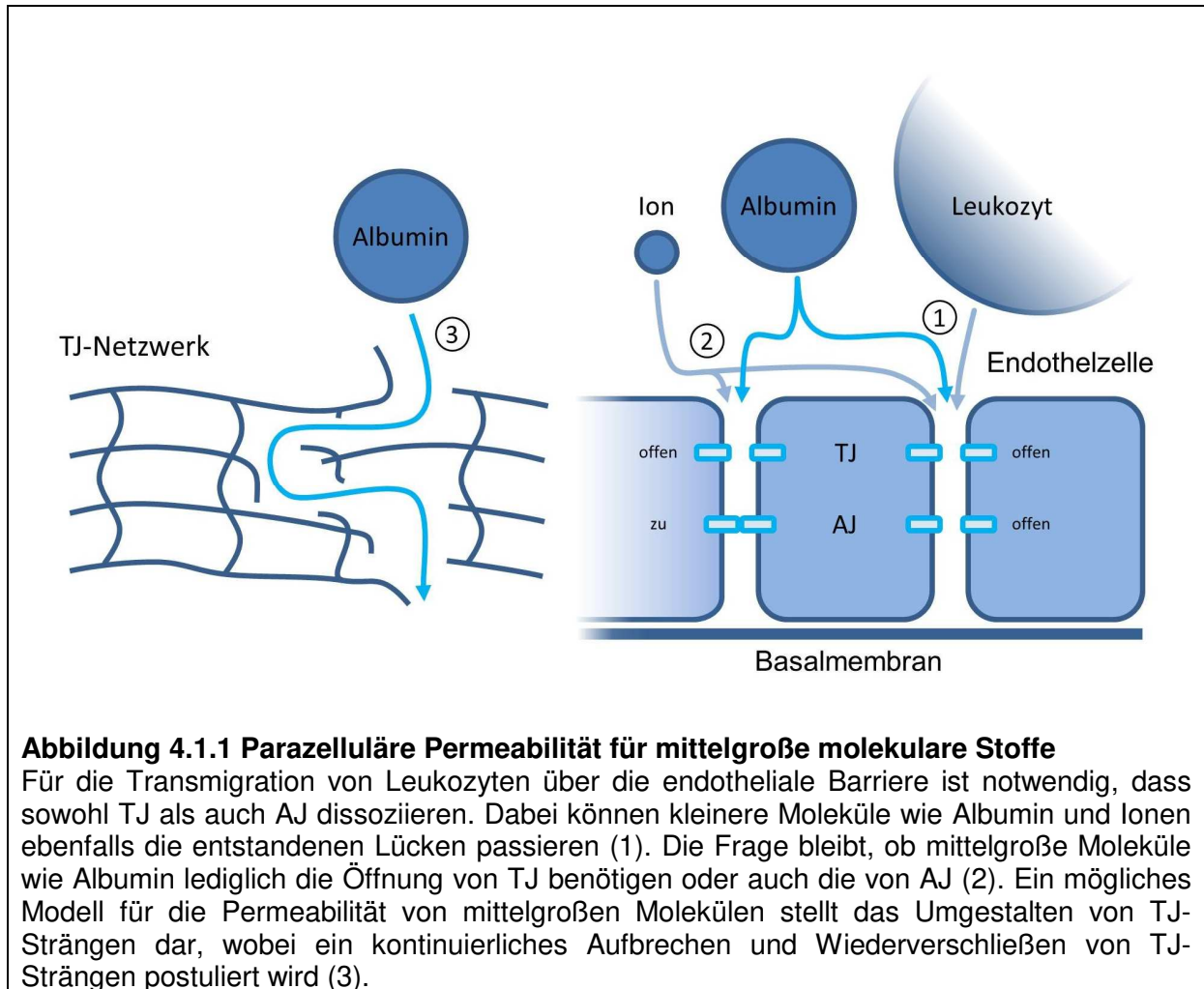
Membranproteinen appliziert. Durch eine Stimulation wird zum Beispiel VE-Cadherin mitsamt Antikörper internalisiert. Anschließend erfolgt ein Spülen der Zellen mit einer sauren Lösung, dadurch werden die Antikörper entfernt, die Membranproteine an der Zelloberfläche binden. Zurück bleibt der mit dem Membranprotein internalisierte Antikörper, der mit einem Sekundärantikörper mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden kann [38]. Letztendlich steht auch noch die FACS-Untersuchung zu Verfügung. Dabei wird ein Antikörper benutzt, der die extrazelluläre Domäne der Membranproteine bindet. Bei einer Internalisierung sollte bei der Messung von oberflächigen Proteinen an nicht permeabilisierten Endothelzellen eine geringe Menge feststellbar sein. Etwaige Experimente wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, hatten aber eine eingeschränkte Reliabilität und Validität. Bei der TEER wurde eine erhöhte Permeabilität nach 5 beziehungsweise nach 10 Stunden festgestellt, was auf eine erniedrigte Proteinmenge von TJ-Proteinen zurückzuführen sein könnte. In den vivo Versuchen am Mausmodell zeigte sich bereits nach 10 min ein signifikanter Unterschied. Dieser kurzfristige Effekt ist wahrscheinlich weniger auf die Proteinmenge zurückzuführen als auf die Lokalisation der TJ-Proteine. Das verdeutlicht, dass SHP-2 sowohl langfristige als auch kurzfristige Auswirkungen auf die Permeabilität hat.

Eine generelle Problematik bei der Betrachtung der Permeabilität bleibt der Einfluss von TJ und AJ. Anatomisch liegen beide Zell-Zellverbindungen sehr nah beieinander. Bei der Transmigration von Leukozyten ist es notwendig, dass sowohl AJ als auch TJ voneinander trennen. Eine Bildung von optisch sichtbaren Lücken, wie zum Beispiel in der Immunfluoreszenz erfordert auch die Dissoziation sowohl von TJ als auch von AJ (Kap. 3.1.1). Fraglich ist, ob das in vitro Modell auch in vivo die pathologischen Zustände der Permeabilitätszunahme widerspiegelt oder ob es hier zu sehr viel subtileren Veränderungen am Endothel kommt. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte festgestellt werden, dass die Zellmembran zweier aneinander angrenzender Zellen an AJ 200 Å (20 nm) voneinander entfernt ist, im Gegensatz zu TJ, wo sich sogenannte *kissing points* bilden, an denen der Interzellularspalt komplett verschwindet [98, 99]. Albumin ist im Körper maßgeblich an der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes beteiligt [100]. Die Untersuchung der Kristallstruktur von humanen Serum-Albumin ergab eine Größe von ca. 80x80x60 Å (8x8x6 nm) [101]. Da Albumin kleiner ist als der maximale Abstand der Zellmembranen an AJ könnte es möglich sein, dass

Albumin intakte AJ passieren kann. Der unkontrollierte Austritt von Albumin aus den Gefäßen könnte durch TJ-Stränge limitiert sein. So könnte die Permeabilität mittelgroßer Stoffe wie Albumin auf der einen Seite durch Internalisierung von TJ-Membranproteinen und/oder auf der anderen Seite durch Umgestaltung von TJ-Strängen durch dynamisches Aufbrechen und Wiederverschließen der Stränge reguliert werden [20] (Abbildung 4.1.1).

Um den Einfluss von TJ und AJ auf die Permeabilität weiter aufzudecken, bieten sich *Knock-out*-Modelle an, in denen mehrere TJ oder AJ Proteine zum Beispiel mit siRNA runterreguliert werden. Anschließend könnten *in vitro* Permeabilitätsversuche, wie die TEER oder auch *transwell-assays* mit Albumin durchgeführt werden. Umgekehrt könnte man versuchen TJ oder AJ Proteine in Zellen zu exprimieren, die normalerweise keine AJ und TJ besitzen. Anschließend könnten ebenfalls die genannten Permeabilitätsversuche durchgeführt werden.

Es lässt sich abschließend sagen, dass die Phosphataseaktivität von SHP-2 die endotheliale Permeabilität von Endothelzellen beeinflusst. Dabei konnte auch festgestellt werden, dass SHP-2 Einfluss auf die Proteinmengen der TJ-Proteine Claudin-5, Occludin und ZO-1 nimmt, nicht aber auf VE-Cadherin an AJ. Der Einfluss von AJ und TJ auf die endotheliale Permeabilität ist komplex und kann nicht separat voneinander betrachtet werden. So ist es wahrscheinlich, dass beide Zell-Zell-Kontakte synergistisch die endotheliale Permeabilität regulieren und untereinander kommunizieren.



#### Abbildung 4.1.1 Parazelluläre Permeabilität für mittelgroße molekulare Stoffe

Für die Transmigration von Leukozyten über die endotheliale Barriere ist notwendig, dass sowohl TJ als auch AJ dissoziieren. Dabei können kleinere Moleküle wie Albumin und Ionen ebenfalls die entstandenen Lücken passieren (1). Die Frage bleibt, ob mittelgroße Moleküle wie Albumin lediglich die Öffnung von TJ benötigen oder auch die von AJ (2). Ein mögliches Modell für die Permeabilität von mittelgroßen Molekülen stellt das Umgestalten von TJ-Strängen dar, wobei ein kontinuierliches Aufbrechen und Wiederverschließen von TJ-Strängen postuliert wird (3).

## 4.2 Die Phosphatasefunktion von SHP-2 beeinflusst die Leukozyten-Extravasation

Im Rahmen von pathologischen Veränderungen am Endothel kommt es nicht nur zu einer Zunahme der Permeabilität, sondern auch zu einer erhöhten Leukozyten-Extravasation (LE) vom Blut in das Gewebe. Im Rahmen einer Sepsis kann neben dem Gewebsödem auch die unkontrollierte Aktivierung und Diapedese von Leukozyten zu einer Gewebeschädigung führen [4]. Aber auch in Ischämien kommt es durch eine vermehrte Bildung von IL-1 zu einer Extravasation von neutrophilen Granulozyten, einem Gewebsödem, Tod von Neuronen und einem ausgeprägten Gewebeschaden [9]. Der Prozess der LE beginnt mit einer initialen Rollen von Leukozyten an der inneren Gefäßwand. Durch eine erhöhte Chemokinkonzentration kommt es lokal zu einer Formveränderung von runden zu ausgebreiteten Leukozyten, die über Integrine und die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 der Endothelzellen einen festen Halt haben. Anschließend erfolgt das *Crawling* (Krabbeln) bis hin zu Diapedese zwischen den Endothelzellen hindurch [53]. Woodfin et al. (2011) haben gezeigt, dass die LE unter IL-1 $\beta$  in vivo hauptsächlich parazellulär stattfindet. Dafür ist es notwendig, dass die Zell-Zellkontakte an AJ und TJ zumindest kurzweilig unterbrochen werden [102]. Eine erhöhte Permeabilität fördert auch die LE, auch wenn dafür mehrere Prozesse notwendig sind, wie die Adhäsion der Leukozyten an das Gefäßendothel [53]. Dennoch sind die genauen Prozesse noch nicht bekannt. Adamson et al. (1999) und van Wetering (2003) haben herausgefunden, dass eine Quervernetzung von ICAM-1 oder VCAM-1, die die Leukozyteninteraktion mit dem Endothel nachahmen soll, zu einer Rho induzierten Bildung von *stress fibres* und zur vermehrten interzellulären Lückenbildung führt und haben eine Verbindung zwischen den Leukozyten und der Permeabilität hergestellt [103, 104]. Im Gegensatz dazu haben Schnoor et al. (2011) herausgefunden, dass ein Verlust von dem Adaptermolekül Cortactin zwar zu einer erhöhten Permeabilität, aber zu einer geringeren LE führt [105]. Cortactin steht wiederum im Zusammenhang mit ICAM-1 [105]. Nachdem festgestellt wurde, dass die Aktivität von SHP-2 Einfluss auf die Permeabilität in vivo und in vitro hat, sollte ferner untersucht werden, ob auch die Leukozyten-Extravasation dadurch beeinflusst ist.

Es konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von SHP-2 mittels eines pharmakologischen Hemmers zu einer erhöhten Leukozyten-Infiltration unter IL-1 $\beta$  in

vivo führt (Kap. 3.1.3). Diese Ergebnisse bestätigen den zuvor erläuterten Zusammenhang und zeigen, dass SHP-2 sowohl an der Regulation der Permeabilität als auch an der Leukozytenextravasation beteiligt ist. SHP-2 könnte dabei in verschiedene Signalwege der Endothelzelle eingreifen.

VE-Cadherin könnte hierbei von besonderer Bedeutung sein. Schulte et al. (2011) haben herausgefunden, dass die Expressierung eines Fusionsproteins von VE-Cadherin mit dem Adaptermolekül  $\alpha$ -Catenin sowohl die LE als auch die Permeabilität unter IL-1 $\beta$  bzw. VEGF und Histamin im Vergleich zur Kontrolle reduziert [106]. Wessel et al. (2014) beschreiben den Tyrosinrest 731 von VE-Cadherin (VEC-Y731) im Zusammenhang mit LE [78]. Sie fanden heraus, dass die Interaktion mit T-Zellen zu einer verminderten Phosphorylierung von VEC-Y731 führt. Die Transmigration von Leukozyten war in VEC-Y731F *Knock-in* Mäusen im Vergleich zur Kontrollpopulation verringert [78]. Bei diesen Mäusen konnte VEC-Y731F nicht (de-)phosphoryliert werden. Wessel et al. brachten diese Beobachtung in Zusammenhang mit SHP-2. Zellen, die mit siRNA gegen SHP-2 transfiziert wurden, zeigten nach einer Stimulierung mit T-Zellen eine höhere Phosphorylierung von VEC-Y731 und eine geringere LE in vitro als die Kontrolle. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu den Beobachtungen aus dieser Arbeit, bei denen eine Inhibition von SHP-2 zu einer vermehrten LE führt. Erklärt werden könnten diese Unterschiede zum einen durch eine mögliche Adapterfunktion von SHP-2, die unter der pharmakologischen Hemmung in den Versuchen dieser Arbeit möglich war, nicht aber in der kompletten Depletion des Proteins durch siRNA und zum anderen durch unterschiedliche Beobachtungszeitpunkte und Stimulanzen. So konnten Heun et al. in noch nicht veröffentlichten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass ähnlich wie bei dem Einfluss auf die Permeabilität aus Kapitel 4.1 der Tyrosinrest von MyD88 am IL-1-Rezeptor-1 Ziel von SHP-2 ist. Das konnten sie durch die Beobachtung der Hochregulation der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 in SHP-2 CS (inaktive Mutante) transduzierten HUVEC unterstützen.

Ferner konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es unter der Expression von SHP-2 CS zu einer Runterregulation von Claudin-5, Occludin und ZO-1 kommt (Kap. 3.2.2). So kann die Zusammensetzung von TJ sowohl einen Einfluss auf die Permeabilität als auch auf die Extravasation von Leukozyten haben. Lanz et al. (2013) zeigten, dass eine Inhibition der Protein Kinase C $\beta$  (PKC $\beta$ ) zu einer

verminderten Permeabilität und einer verringerten Transmigration *in vitro* führt. Diese Beobachtung korrelierte mit der Hochregulation von Claudin-5 unter der Inhibition von der PKC $\beta$ . In einem experimentellen Modell zur Autoimmun-Enzephalitis konnten die Autoren zeigen, dass die Beobachtungen auch mit einer geringeren Anzahl an Marklagerläsionen im zentralen Nervensystem korrelieren. Damit boten sie einen neuen pharmakologischen Ansatzpunkt in der Behandlung der Multiplen Sklerose [107]. Dieser protektive Effekt könnte auf die Hochregulation von Claudin-5 zurückzuführen sein, umgekehrt könnte die Runterregulation von Claudin-5 daher auch zu der erhöhten Permeabilität und LE beitragen.

Auch die beobachtete Runterregulation von ZO-1 unter der Expression von SHP-2 CS kann Einfluss auf die LE haben. Tasaka et al. (2005) zeigten, dass eine Inhibition von ROCK, die im Zusammenhang mit der Aktivierung des Zytoskeletts, der Bildung von *stress fibres* und der Permeabilität steht, zu einer geringeren LE in der Lunge von Mäusen unter LPS führt [108]. Auch hier könnte ZO-1 ein wichtiges Bindeglied in der Mechanotransduktion auf TJ sein, die auch die LE regulieren könnte. Ferner wären JAMs an TJ ein weiterer Interaktionspunkt von SHP-2. JAM-A ist an der Leukozytenmigration beteiligt, Antikörper gegen JAM-A reduzieren die LE [109]. Zwischen ZO-1 und JAM-A ist eine Interaktion nachgewiesen [20]. Deswegen könnte es möglich sein, dass SHP-2 über ZO-1 die Leukozyteninteraktion im Rahmen der LE reguliert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Phosphataseaktivität von SHP-2 die Permeabilität der Endothelzellen beeinflusst, welche wiederum zur Extravasation von Leukozyten führt. Beides sind wichtige Prozesse im Rahmen von Entzündungen und tragen zum Beispiel zu der Pathogenese der Sepsis bei. Die genauen molekularen Mechanismen bleiben dabei weiterhin unzureichend erforscht. SHP-2 könnte die LE durch eine ganze Reihe an Interaktionspartnern innerhalb der Zelle regulieren, angefangen am IL-1-Rezeptor mit MyD88, an VE-Cadherin an AJ, an Claudin-5 an TJ, über das Adapterprotein ZO-1 oder auch die Expression der Leukozyten-Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1.

### **4.3 Eine Inaktivierung von SHP-2 führt zu einer geringeren Expression von Tight-Junction-Proteinen**

Es wurde bereits gezeigt, dass die Phosphatasefunktion von SHP-2 sowohl Auswirkung auf die Permeabilität als auch auf die Menge an TJ-Proteinen hat. Als nächstes sollte untersucht werden, ob SHP-2 die Menge dieser Proteine über den Abbau oder die Expression reguliert.

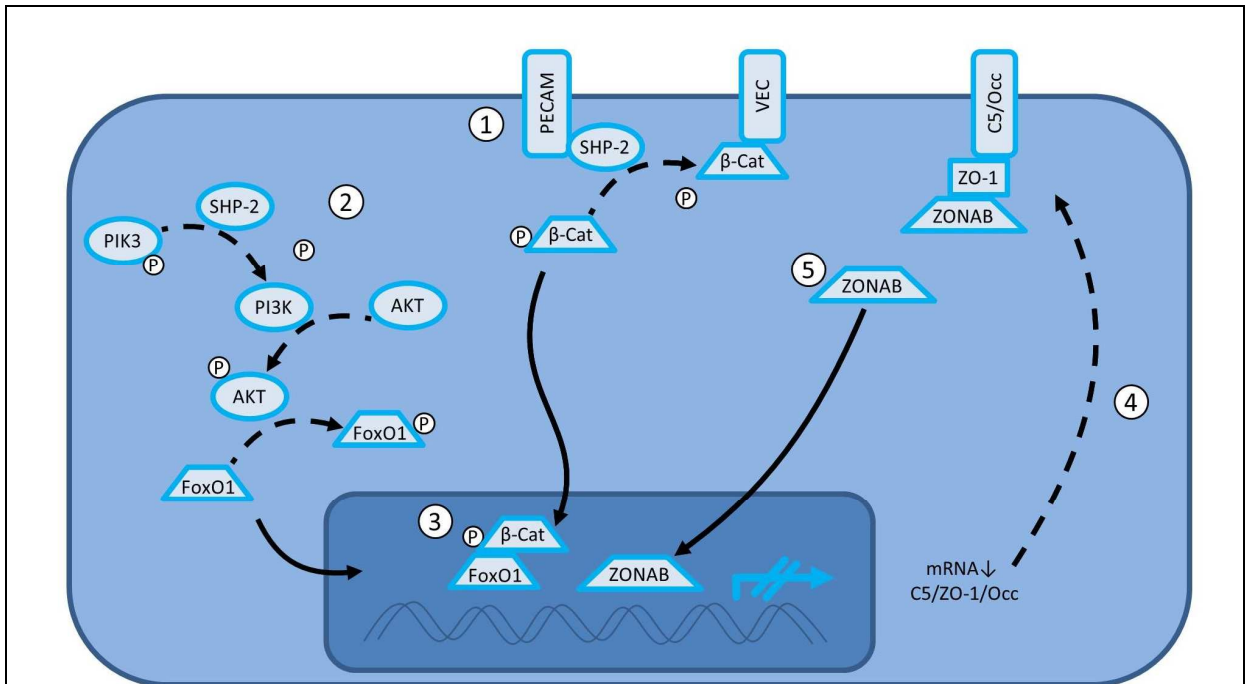
Eine Inaktivierung von SHP-2 führt nicht über den Abbau der Proteine zu einer verminderten TJ-Proteinmenge. Unter der Inkubation mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 oder dem Hemmer des lysosomalen Abbaus Chloroquin konnte die Reduktion der Proteinmenge von Claudin-5, ZO-1 und Occludin unter der Expression der inaktiven Mutante von SHP-2 (CS) nicht zu einer Wiederherstellung auf das Niveau bei Wildtyp exprimierenden Zellen führen (Kap. 3.2.4). Ferner wurde untersucht, inwiefern die Inaktivierung von SHP-2 die Expression der TJ-Proteine beeinflusst. Dabei konnte festgestellt werden, dass es im Vergleich zu Wildtyp exprimierenden Zellen zu einer Reduktion der mRNA bei SHP-2 CS exprimierenden Zellen kommt (Kap. 3.2.5). Am stärksten zeigte sich dieser Effekt bei Claudin-5. Dieses TJ-Protein zeigte bereits im Western Blot den größten Effekt in der Runterregulation unter SHP-2 CS exprimierenden HUVEC.

SHP-2 nimmt durch verschiedene Ansatzpunkte Einfluss auf die Expression von Proteinen. Dabei könnten  $\beta$ -Catenin, FoxO1 und ZONAB eine besondere Rolle in Bezug auf die Expression von TJ-Proteinen spielen.  $\beta$ -Catenin ist ein Adaptermolekül und bindet an VE-Cadherin [48]. Timmerman et al. (2012) zeigten, dass SHP-2  $\beta$ -Catenin dephosphoryliert [110]. Biswas et al. (2006) zeigten, dass eine Tyrosin-Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin zu einer geringeren Assoziation zu VE-Cadherin führt [79]. Über eine Assoziation zu PECAM-1 kann SHP-2  $\beta$ -Catenin dephosphorylieren [79]. Ist SHP-2 inaktiv liegt folglich mehr freies tyrosinphosphoryliertes  $\beta$ -Catenin vor. Freies stabiles  $\beta$ -Catenin kann in den Zellkern translozieren und die Expression vieler Proteine im Rahmen des Wnt-Signalwegs regulieren [111-113]. Diese nukleäre Translokation von  $\beta$ -Catenin resultiert in einer verminderten Expression von TJ-Proteinen und wird durch unterschiedliche Mechanismen beschrieben.



$\beta$ -Catenin kann nach dieser nukleären Translokation Einfluss auf den ZO-1-ZONAB Signalweg nehmen. ZONAB ist ein weiterer Transkriptionsfaktor der an TJ lokalisiert ist und an ZO-1 bindet [114]. Eine Überexpression von  $\beta$ -Catenin führt zu einer Runterregulation der mRNA und Proteinmenge von ZO-1 [115]. Das hat zur Folge, dass vermehrt freies ZONAB im Zytosol vorliegt und auf diese Weise in den Zellkern translozieren kann [47, 114]. Liu et al. (2015) zeigten kürzlich, dass eine Überexpression von ZONAB zu einer nukleären Translokation und zu einer geringeren Menge an Occludin und Claudin-5 führt. Dabei stellten sie eine direkte Interaktion von ZONAB an den Promotorregionen der Genregionen der beiden Proteine fest [25]. Somit könnte eine Inaktivierung von SHP-2 über  $\beta$ -Catenin und dem Wnt-Signalweg über ZO-1 und ZONAB zu einer verminderten mRNA-Menge der TJ-Proteine führen.

Ein weiterer Ansatzpunkt von SHP-2 auf die Expression der TJ-Proteine beinhaltet den Transkriptionsfaktor FoxO1 (*forkhead box transcriptional factor O1*).  $\beta$ -Catenin kann auch zusammen mit FoxO1 an das Claudin-5 Gen binden wo es als Repressor fungiert, was in verminderten mRNA- und Proteinmengen von Claudin-5 resultiert. Eine Inaktivierung von SHP-2 führt dabei, wie schon beschrieben, zu erhöhten Mengen nukleären  $\beta$ -Catenins und über den PI3K-AKT Signalweg auch zu erhöhten Mengen von nukleären FoxO1: Eine Inaktivierung von SHP-2 führt zu einer verminderten Aktivierung von der PI3K [71]. Eine verminderte Aktivierung der PI3K führt zu einer verminderten Aktivierung von AKT [48, 116]. AKT phosphoryliert FoxO1 und verhindert dessen nukleäre Translokation [117]. Eine geringere Aktivierung der PI3K führt über FoxO1 zu erniedrigten mRNA- und Proteinmengen an Claudin-5 [117]. Eine Inaktivierung von SHP-2 könnte sowohl durch gestörte Inaktivierung der PI3K als auch durch vermehrtes freies  $\beta$ -Catenin die Expression von TJ-Proteinen regulieren (Abbildung 4.3.1). Diese Mechanismen sind in Einzelschritten nachgewiesen und theoretisch denkbar, bedürfen aber der Bestätigung im Gesamtkontext und in der gleichen Zelllinie. Wichtig wäre hier der Nachweis, dass zum Beispiel eine Inaktivierung von SHP-2 wirklich zu erhöhten Mengen an  $\beta$ -Catenin und FoxO1 im Zellkern führt.



**Abbildung 4.3.1 Mögliche Signalwege zur Runterregulation von TJ-Proteinen unter der Inaktivierung von SHP-2**

Die inaktive Mutante SHP-2 CS kann  $\beta$ -Catenin ( $\beta$ -Cat) und die PI3K nicht dephosphorylieren (1&2). Das führt zu einer Translokation von  $\beta$ -Catenin und FoxO1 in den Zellkern. Hier kommt es zu einer Runterregulation der Genexpression der TJ-Proteine Claudin-5 (C5), ZO-1 und Occludin (Occ) (3). Das führt zu einer geringeren Proteinmenge dieser Proteine (4). Ein weiterer Mechanismus umfasst ZONAB. Durch eine Runterregulation von ZO-1 kann ZONAB in den Zellkern translozieren und hier die Genexpression von Claudin-5 und Occludin verhindern (5). Durchgezogene Pfeile: Auswirkungen der Inaktivierung der Phosphatasefunktion von SHP-2. Gestrichelte Pfeile: Signalwege unter der Expression des Wildtyps von SHP-2 im aktivierten Zustand.

In vitro stehen zur Untersuchung der Wirkung und Funktion von Enzymen nur eine begrenzte Anzahl von physiologischen Methoden zur Verfügung. Da bei einer Depletion mit siRNA das Protein nicht als Adaptermolekül fungieren kann, entschlossen wir uns die lentivirale Transduktion und den pharmakologischen Inhibitor von SHP-2 zu verwenden. Auch bei *Knockout*-Modellen in Tierversuchen ist man mit dieser Problematik konfrontiert, weswegen wir auch hier den pharmakologischen Inhibitor von SHP-2 verwendeten. Bei der lentiviralen Transduktion wurde die jeweilige Mutante von SHP-2 (Wt oder CS) über einen Zeitraum von über 72 Stunden in den HUVEC exprimiert. Dieser konstitutiv inaktive Zustand von SHP-2 ist unnatürlich und findet sich mit hoher Sicherheit nicht in einem physiologischen Organismus. In der Zellkultur fehlen den Endothelzellen auch weitere Einflussfaktoren, wie zum Beispiel die laminare Strömung des Blutflusses,

die Interaktion mit Leukozyten der Basalmembran oder parakrine Hormone aus dem umliegenden Gewebe und den glatten Muskelzellen mit Auswirkung auf die Regulation und Expression von Proteinen [2, 78, 118, 119]. Darüber hinaus ist nicht bekannt, inwiefern SHP-2 den Abbau der mRNA zum Beispiel durch siRNA oder andere regulatorische Proteine beeinflusst. Auch hier wäre es denkbar, dass SHP-2 nicht durch die veränderte Genregulation, sondern durch posttranskriptionale Modifikation die Menge der mRNA der TJ-Proteine beeinflusst. Dennoch lassen sich aus den verwendeten Methoden Rückschlüsse auf die Interaktionen und Auswirkungen von SHP-2 auf die Regulation und Expression von TJ-Proteinen ziehen.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der Phosphatasefunktion von SHP-2 zu einer geringeren Proteinmenge von Claudin-5, ZO-1 und Occludin führt. Eine Hemmung des proteasomalen Abbaus und der Lysosomen konnte diesen Effekt nicht rückgängig machen. Schließlich konnte nachgewiesen werden, dass die Inaktivierung von SHP-2 zu geringeren mRNA-Mengen von Claudin-5, ZO-1 und Occludin führt, was letztendlich in der geringeren Proteinmenge resultiert.

#### 4.4 Ausblick in Forschung und klinischer Anwendung

Die endotheliale Permeabilität ist ein komplex regulierter Prozess, der schon seit mehreren Jahrzehnten Gegenstand der wissenschaftlichen Forschung ist. Die Sepsis hat trotz neuer Errungenschaften immer noch eine Mortalität von 18% [6]. Dabei kommt es zu einer unkontrollierten Aktivierung von Leukozyten und einer erhöhten Permeabilität [4]. Durch die Ausschüttung von Zytokinen, wie IL-1 $\beta$ , kommt es zu einer Störung der endothelialen Barriere [6]. Das führt zu einer Ausbildung von Ödemen sowohl in der Peripherie als auch in Organen, was die Organfunktion zum Beispiel von Lunge und Niere beeinträchtigt [4, 120]. Bisherige therapeutische Ansätze zielen auf eine frühe Antibiose, Flüssigkeitssubstitution, den Einsatz von Vasopressoren und weiteren supportiven Maßnahmen ab [6]. Gerade die Flüssigkeitssubstitution kann aber auch negative Auswirkungen bei einer anhaltenden gestörten Gefäß-Permeabilität haben und kann die Mortalität von kritisch kranken Patienten weiter erhöhen [120]. Darüber hinaus kommt es durch die massiven Flüssigkeitseinlagerungen zu einem Verdünnungseffekt der eingesetzten Medikamente [120]. Es gibt bisher keinen immunmodulatorischen Ansatz in der Therapie der Sepsis. Und die erhöhte Permeabilität und erhöhte Aktivierung von Leukozyten bleiben weiterhin bestehen. Es gibt zwar schon mehrere Studien zu der Wirksamkeit von Glukokortikoiden, TNF- $\alpha$ -Inhibitoren und Interleukin-1-Rezeptor Antagonisten, die aber leider noch keinen klinischen Vorteil erbrachten [6]. Deswegen ist die weitere Forschung an AJ, TJ und der Regulation der Permeabilität zur Identifizierung weiterer Signalwege und Ansatzmöglichkeiten für neue Therapien von entscheidender Bedeutung.

Es sind schon viele Proteine an TJ und AJ identifiziert worden, die an der Aufrechterhaltung der endothelialen Barriere beteiligt sind. Die TJ bilden dabei nicht nur eine simple Barriere zwischen Blut und Gewebe. Sie sind an der Regulation der Permeabilität und dem selektiven Stoffaustausch zwischen der apikalen und basolateralen Seite der Endothelzellen beteiligt [20]. Darüber hinaus nehmen sie an der Weiterleitung von Signalen, bis hin zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und der Regulation des Zytoskeletts teil [20]. Bisher konnte zwar gezeigt werden, dass Occludin und Claudin-5 an TJ vorhanden sind, deren genaue Struktur und Organisation innerhalb dieses Komplexes bleibt aber weiterhin unklar [20]. Das beschriebene Modell zur Umstrukturierung aus Kapitel 4.1 ist hypothetisch denkbar

aber noch nicht experimentell bestätigt [20]. Auch die Internalisierung von Membranproteinen spielt eine entscheidende Rolle. Dabei sind eine Reihe von Rab-GTPasen von besonderer Bedeutung. Sie regulieren den Vesikel-Verkehr innerhalb der Zelle zu frühen Endosomen, zum Recycling an die Oberfläche oder in späte Endosomen und zum Abbau [121]. Durch weitere Forschung auf diesem Gebiet ist es möglich weitere therapeutische Ansätze zur anti-inflammatorischen Therapie für eine Vielzahl von Erkrankungen zu entwickeln. Bisher konnte der genaue Einfluss von TJ und AJ auf die Permeabilität nicht geklärt werden. Es ist bis auf Weiteres nicht klar, ob TJ oder AJ die Permeabilität maßgeblich beeinflussen. Vieles deutet darauf hin, dass TJ die Permeabilität für Ionen und sehr kleine lösliche Stoffe regulieren, wohingegen AJ die Diffusion größerer Moleküle limitieren [20, 89]. Wenn das der Fall sein sollte, stellt sich die Frage bis zu welcher Größe welcher Zell-Zell-Kontakt die entscheidende Barriere bildet. Auch ist noch nicht geklärt wie AJ und TJ untereinander kommunizieren. AJ könnten hierbei regulatorisch über den TJ stehen und diese beeinflussen [20]. Für die Reifung von Zell-Zell-Kontakten kommt es zur Ausbildung von Cadherin-Cadherin Interaktionen, dabei spielt auch ZO-1 eine Rolle [20]. Der genaue Prozess wie sich aus primordialen Zell-Zell-Kontakten ausgereifte AJ und TJ entwickeln bleibt noch offen. TJ haben innerhalb der Zelle Einfluss auf die Proliferation, die Polarität und das Überleben, wobei die genauen Signalwege und Proteininteraktionen noch nicht geklärt sind. Tyrosinkinasen, wie Src, und Protein-Tyrosin-Phosphatasen, wie SHP-2, kommen dabei in Endothelzellen eine besondere Bedeutung zu. Wie in anderen Zellen regulieren sie auch in Endothelzellen eine Reihe von Stoffwechselwegen und Signalkaskaden und sind an der Regulation der Permeabilität beteiligt [60, 89]. Ein Beispiel dafür sind die von Wessel et al. (2014) beschriebenen verschiedenen Tyrosin-Phosphorylierungen, die die Permeabilität bzw. die Extravasation von Leukozyten beeinflussen [78]. Deswegen ist es für das weitere Verständnis der molekularen Steuerung dieser komplexen Prozesse von essentieller Bedeutung weitere Forschung im Bereich der Permeabilität und der Regulation von Kinasen und Phosphatasen zu unternehmen.

Durch neue Erkenntnisse von physiologischen und pathologischen molekularen Prozessen, ist es möglich neue und effektivere Therapien für sehr viele Erkrankungen zu etablieren. Die Bluthirnschranke bildet im Gehirn eine effektive Barriere und wird maßgeblich durch TJ ausgebildet [18]. Im Rahmen von Tumoren im Gehirn, wie zum Beispiel dem Glioblastom, stellt das jedoch ein Problem dar, da

Chemotherapeutika die Bluthirnschranke nur schwer überwinden können [13]. Diese Arbeit zeigt neue Einsatzmöglichkeiten für den pharmakologischen Inhibitor von SHP-2 PTPi IV auf. PTPi IV könnte theoretisch die Arzneimittelverteilung im ZNS begünstigen. Durch eine Runterregulation von Claudin-5 nimmt die Permeabilität für kleine gelöste Stoffe zu, zu deren Größenordnung auch die meisten Medikamente gehören [15]. Durch die gezielte Hemmung der Phosphataseaktivität von SHP-2 könnte durch eine erhöhte Permeabilität die Konzentration des Chemotherapeutikums am Tumor erhöht werden. Darüber hinaus könnten auch andere Substanzen, die bisher aufgrund ihrer Hydrophilie nicht geeignet waren, die Bluthirnschranke überwinden und das Therapiespektrum deutlich erweitern. Bei dieser Theorie ist der Einfluss der Inaktivierung von SHP-2 auf die Zusammensetzung von AJ und TJ von besonderer Bedeutung. Tumorzellen können durch ein verändertes, gestörtes Endothel in die Blutgefäße gelangen und hämatogene Metastasen verursachen [12]. Inwieweit eine pharmakologische Hemmung von SHP-2 die Integrität von TJ stört und es ermöglicht, dass Pharmaka die Bluthirnschranke passieren können oder auch die Metastasierung begünstigt, muss unbedingt beachtet werden.

Lanz et al. (2013) zeigten dabei neue Behandlungsansätze durch die pharmakologische Inhibition der PKC $\beta$  zur Reduzierung von Läsionen durch geringere Gewebsödeme und eine erniedrigte Leukozyten-Extravasation bei Modellen der Multiplen Sklerose [107]. Ferner konnten Zhu et al. (2012) durch die Entdeckung des MyD88-ARNO-ARF6 Signalwegs und der davon abhängigen Internalisierung von VE-Cadherin zeigen, dass es in Mausmodellen der Arthritis durch Behandlung mit SecinH3, einem Hemmer von ARNO, sowohl zu einer klinischen als auch zu einer histopathologischen Besserung der Erkrankung führt, das sich an einer geringeren periartikulären Entzündung und weniger Knochen- und Knorpelschäden zeigt. Dabei hat SecinH3 ähnliche Effekte wie Enbrel®, das für die Behandlung der rheumatoiden Arthritis zugelassen ist (Fachinformation Enbrel® Pfizer, Eterncept, TNF $\alpha$ -Inhibitor, Stand März 2017) [38]. Auch Mannell et al. (2012) haben herausgefunden, dass SecinH3 die endotheliale Barriere verstärkt. Sie stellten fest, dass durch SecinH3 die VEGF-induzierte Permeabilität im Mausmodell im Vergleich zur Kontrolle signifikant erniedrigt war [122].

Ein weiterer potentieller pharmakologischer Inhibitor für die klinische Anwendung ist Y-27632, der ROCK hemmt. Tasaka et al. (2005) haben herausgefunden, dass es durch die Verwendung dieses Inhibitors in Mausmodellen zur Behandlung der Sepsis zu weniger interstitiellen Ödemen und geringerer Leukozyten-Extravasation kommt [108]. In Japan ist der ROCK-Inhibitor Fasudil bereits für die Behandlung von zerebralen Vasospasmen nach Aneurysmarupturen zugelassen und in den USA wurde Fasudil bereits in klinischen Studien für Angina pectoris und pulmonale Hypertonie getestet [89]. Ferner haben London et al. (2010) den Slit-Robo4 Signalweg beschrieben. Sie fanden heraus, dass es durch Bindung des Liganden Slit an den Rezeptor Robo4 zu einer Verstärkung der endothelialen Barriere kommt. Das zeigte sich darin, dass Mäuse die mit Slit behandelt wurden im Vergleich zur Kontrollpopulation in murinen Sepsismodellen eine geringere Permeabilität in der Lunge und höhere Überlebensraten zeigten [123]. VEGF ist bekannt für seine erhöhte Expression in Tumoren, was zu einer erhöhten Permeabilität führt [2]. Schon 2005 wurde in Deutschland der Anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab für die Behandlung zahlreicher Malignome zugelassen (Fachinformation Avastin® Roche, Bevacizumab, Juni 2017). VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , SecinH3, Slit, und Y-27632 haben alle Einfluss auf die Permeabilität. Zum Teil sind sie schon in der klinischen Anwendung etabliert, im Fall von SecinH3, Slit und Y-27632 liegen bisher nur präklinische Ergebnisse vor. Es ist gerade in der Sepsis schwierig neue Behandlungskonzepte in klinischen Studien zu testen. Oftmals sind Ansätze die theoretisch vielversprechend erscheinen in der klinischen Testung ineffizient oder schaden dem Patienten gar [6]. Aslan et al. (2017) haben herausgefunden, dass es in septischen Zuständen im Mausmodell in unterschiedlichen Organen zu unterschiedlicher Transkription von Genen für TJ- und AJ-Proteine kommt. So kann ein Therapieansatz die Funktion eines Organes verbessern, aber möglicherweise einem anderen Organ schaden [124]. Ferner kommt es bei der Betrachtung der Sepsis zu einem sehr inhomogenen Patientenkollekt mit unterschiedlichen Grundvoraussetzungen: zum Beispiel eine 19-jährige mit Meningokokken-Sepsis ohne Nebenerkrankungen oder ein 80-jähriger mit einer E.coli-Bakteriämie und multiplen Nebenerkrankungen [6]. All diese Patienten werden in klinischen Studien betrachtet. Um dennoch Aussagen über die Wirksamkeit von Medikamenten machen zu können, müssen ausreichend große Studien durchgeführt werden [6].

Die weitere Forschung an Signalwegen zur Permeabilität und der Rolle der Tyrosin-Phosphatasen und Kinasen ermöglicht die Translation von Laborergebnissen an das Krankenbett und den Patienten und ist deshalb von essentieller Bedeutung.



## 5 Zusammenfassung

---

Die endotheliale Permeabilität wird durch Adherens- und Tight-Junctions aufrechterhalten und durch zahlreiche Signalwege beeinflusst [20]. Die Regulation der Permeabilität ist im Rahmen von zahlreichen Krankheiten gestört, wie zum Beispiel bei der Sepsis, dem ARDS, bei malignen Tumoren oder auch bei Durchblutungsstörungen [2-4]. Dabei kommt es häufig zu einer gesteigerten Permeabilität der Endothelzellen mit Einschränkungen der Organfunktion oder dem Fortschreiten der Grunderkrankung [4]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Tyrosinphosphatase SHP-2 ebenfalls in diverse Signalwege innerhalb der Zelle eingreift und dabei regulatorische Funktionen durch Dephosphorylierungen vornimmt [60]. Gegenstand dieser Arbeit war zu untersuchen, inwiefern SHP-2 die endotheliale Permeabilität beeinflusst.

Dabei sollte untersucht werden, ob die Inaktivierung der Phosphatasefunktion von SHP-2 Auswirkungen auf die Permeabilität und, eng damit zusammenhängend, die Leukozyten-Extravasation hat [53]. Dazu wurde die transendotheliale elektrische Widerstandsmessung an humanen umbilikalen Gefäßendothelzellen (HUVEC) durchgeführt, die SHP-2 Wt oder eine inaktive Mutante überexprimieren. Dabei wird der Widerstand über einen Monolayer von basal nach apikal gemessen, je mehr geladene Teilchen von apikal nach basal diffundieren können, desto niedriger ist der Widerstand und höher die Permeabilität [36]. Darüber hinaus sollte mittels eines FITC-Dextran-Extravasations-Versuchs die Auswirkung eines pharmakologischen Hemmers von SHP-2 auf die Permeabilität am Tiermodell getestet werden. Die Leukozyten-Extravasation steht im engen Zusammenhang mit der Permeabilität und wurde ebenfalls unter Verwendung eines pharmakologischen Inhibitors von SHP-2 in vivo untersucht [53]. Anschließend sollte untersucht werden, inwiefern SHP-2 die Tight-Junction-Proteine reguliert.

Sowohl in der elektrischen Widerstandsmessung in vitro als auch in dem FITC-Extravasations-Versuch in vivo konnte unter der Inaktivierung der Phosphatasefunktion von SHP-2 eine erhöhte Permeabilität im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Auch die Leukozyten-Extravasation in vivo war unter der Hemmung von SHP-2 signifikant erhöht und korrelierte mit der erhöhten

Permeabilität. Auf molekularer Ebene konnte festgestellt werden, dass eine Inaktivierung von SHP-2 zu einer geringeren mRNA- und Proteinmenge der Tight-Junction-Proteine Claudin-5, ZO-1 und Occludin führt. Diese Moleküle sind an der Aufrechterhaltung der Permeabilität beteiligt und deren Runterregulation erklärt im in-vitro-Modell die Zunahme der Permeabilität über 5 bis 10 Stunden. Im in-vivo-Modell kommt es bereits nach 10 min zu einer erhöhten Permeabilität unter Verwendung eines pharmakologischen Inhibitors von SHP-2. Dieser kurzfristige Effekt ist nicht allein auf die Expression der Proteine zurückzuführen. Vielmehr hat die Verteilung der Tight-Junction- und Adherens-Junction-Proteine eine entscheidende Auswirkung auf die Permeabilität. Bei der Internalisierung dieser Transmembranproteine kommt es zu einer erhöhten Permeabilität [38]. Weiterführende Untersuchungen könnten diesen potentiellen Einfluss von SHP-2 auf die endotheliale Barriere weiter aufdecken.

Die Untersuchung dieser physiologischen und pathologischen Signalwege ist besonders wichtig im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapien. Im Rahmen der Sepsis gab es bereits mehrere Versuche immunmodulatorisch mithilfe eines IL-1 $\beta$ -Antagonisten die Therapie zu optimieren, leider jedoch ohne Erfolg [125]. Deswegen ist die weitere Forschung an diesen Pathomechanismen und Signalwegen wichtig, um neue Ansatzpunkte für die Pharmakotherapie zu entdecken. Auch bei malignen Erkrankungen spielt die Permeabilität eine Rolle. Erhöhte Permeabilität kann auf der einen Seite die Metastasierung von Tumoren begünstigen, auf der anderen Seite erschwert die restriktive Permeabilität der Bluthirnschranke die Verteilung von Arzneimitteln im Gehirn [36, 126, 127]. Die Inhibition der Tyrosinphosphatase SHP-2 mittels des pharmakologischen Inhibitors PTPi IV und der dadurch resultierenden erhöhten Permeabilität könnte hierbei einen neuen Ansatzpunkt zur verbesserten lokalen Verfügbarkeit von Chemotherapeutika bei Hirntumoren, wie dem Glioblastom, darstellen.

## 6 Veröffentlichungen

---

### Vortrag

Georg Hupel, „Regulatorische Effekte der Tyrosinphosphatase SHP-2 auf die endotheliale Barriere“. Vortrag am 9. Mai 2015 im Rahmen des Statusseminars für das Förderprogramm für Forschung und Lehre „Molekulare Medizin“ und „Systembiologische Medizin“ (13. Jahrgang) der Medizinische Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München.

### Artikel

Teilergebnisse dieser Arbeit werden für eine geplante Publikation verwendet. Das Manuskript ist unter Bearbeitung.

Yvonn Heun, Raffaella Rotter, Thomas Czermak, Philipp Bluem, Georg Hupel, Joachim Pircher, Bjoern S. Kraemer, Alexander Pfeifer, Markus Woernle, Max Hübner, Simone Kreth, Sebastian Weis, Luisa Ungelenk, Florian Kroetz, Ulrich, Hanna K. Mannell. „Inactivation of the Tyrosine Phosphatase SHP-2 Drives Vascular Dysfunction in Sepsis“

## 7 Anhang

---

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

AJ	Adherens-Junction
AKT	Proteinkinase B
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	Acute respiratory Distress Syndrom
BCA	Bicinchoninsäure
BMVEC	Brain microvascular endothelial cells
BP	Blockingpuffer
BSA	Bovines Serumalbumin
C5	Claudin-5
CcB	Cytochalasin B
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
CHX	Cycloheximide
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraethansäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FGF-2	<i>Fibroblast growth factor 2</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxO1	<i>forkhead box transcriptional factor O1</i>
GA	Gentamycin/ Amphotericin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosin-di-phosphat
GTP	Guanosin-tri-phosphat
hEGF	<i>Human recombinant Epidermal growth factor</i>
HMEC	<i>Human microvascular endothelial cells</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
IF	Immunofluoreszenz
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
LE	Leukozyten-Extravasation
Lsg.	Lösung
M	mol/l
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MDCK	<i>Madin Darby canine kidney (cells)</i>
mg/kgKG	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
MLCK	<i>Myosin light chain Kinase</i>
MLCP	<i>Myosin light chain Phosphatase</i>
Mw	Molekulargewicht
MW	Mittelwert
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
M $\beta$ CD	Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin

NF-κB	Nuklear Faktor κB
Occ	Occludin
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PI3K	Phosphoinositid-3 Kinase
PKCβ	Protein Kinase Cβ
PMN	polymorphkernige Leukozyten
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluorid
PS	Penicillin-Streptomycin
qRT-PCR	<i>Quantitative reverse transcriptase PCR</i>
R3-IGF-1	<i>Human recombinant Insulin-like growth factor</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RasGAP	<i>RasGTPase activating Factor</i>
RDE	Relative Densitometrie Einheiten
RhoA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
RIE	Relative Impedanz Einheiten
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROCK	Rho-assoziierte-Protein-Kinase
RPE	Relative Permeabilitäts Einheiten
Rpm	<i>Rounds per minute</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	<i>Src homology 2</i>
SHP-2	<i>Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase 2</i>
TBST	<i>TRIS buffered saline</i> mit Tween 20
TIR	Toll-IL-1 Rezeptor (Domäne)
TJ	Tight-Junction
T <sub>M</sub>	<i>melting temperature</i> (Schmelztemperatur PCR)
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor α
VEC	<i>VE(Vascular endothelial)-Cadherin</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VVO	Vesikulo-vakuläre Organellen
WB	Western Blot
ZO	Zonula Occludens (Protein)
ZONAB	<i>ZO-1-associated nucleic acid-binding protein</i>
β-Cat	β-Catenin

## 7.2 Literaturverzeichnis

1. Claesson-Welsh, L., *Vascular permeability--the essentials*. Ups J Med Sci, 2015. **120**(3): p. 135-43.
2. Weis, S.M. and D.A. Cheresh, *Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability*. Nature, 2005. **437**(7058): p. 497-504.
3. Opal, S.M. and T. van der Poll, *Endothelial barrier dysfunction in septic shock*. J Intern Med, 2015. **277**(3): p. 277-93.

4. Schnoor, M., et al., *Actin dynamics in the regulation of endothelial barrier functions and neutrophil recruitment during endotoxemia and sepsis*. Cell Mol Life Sci, 2017. **74**(11): p. 1985-1997.
5. Matthay, M.A., L.B. Ware, and G.A. Zimmerman, *The acute respiratory distress syndrome*. J Clin Invest, 2012. **122**(8): p. 2731-40.
6. Gotts, J.E. and M.A. Matthay, *Sepsis: pathophysiology and clinical management*. BMJ, 2016. **353**: p. i1585.
7. Xu, H., et al., *Selective blockade of endothelial NF-kappaB pathway differentially affects systemic inflammation and multiple organ dysfunction and injury in septic mice*. J Pathol, 2010. **220**(4): p. 490-8.
8. Lee, W.L. and A.S. Slutsky, *Sepsis and endothelial permeability*. N Engl J Med, 2010. **363**(7): p. 689-91.
9. Sims, J.E. and D.E. Smith, *The IL-1 family: regulators of immunity*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 89-102.
10. Almutairi, M.M., et al., *Factors controlling permeability of the blood-brain barrier*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(1): p. 57-77.
11. Jhaveri, N., T.C. Chen, and F.M. Hofman, *Tumor vasculature and glioma stem cells: Contributions to glioma progression*. Cancer Lett, 2016. **380**(2): p. 545-51.
12. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(6): p. 417-27.
13. Vogelbaum, M.A. and M.K. Aghi, *Convection-enhanced delivery for the treatment of glioblastoma*. Neuro Oncol, 2015. **17 Suppl 2**: p. ii3-ii8.
14. Adamson, C., et al., *Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going*. Expert Opin Investig Drugs, 2009. **18**(8): p. 1061-83.
15. Haseloff, R.F., et al., *Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: Structural and functional aspects*. Semin Cell Dev Biol, 2014.
16. Danson, S.J. and M.R. Middleton, *Temozolomide: a novel oral alkylating agent*. Expert Rev Anticancer Ther, 2001. **1**(1): p. 13-9.
17. Pober, J.S. and W.C. Sessa, *Inflammation and the blood microvascular system*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **7**(1): p. a016345.
18. Gunzel, D. and A.S. Yu, *Claudins and the modulation of tight junction permeability*. Physiol Rev, 2013. **93**(2): p. 525-69.
19. Wallez, Y. and P. Huber, *Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(3): p. 794-809.
20. Zihni, C., et al., *Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016. **17**(9): p. 564-80.
21. Furuse, M., et al., *Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions*. J Cell Biol, 1993. **123**(6 Pt 2): p. 1777-88.
22. Li, C.X. and M.J. Poznansky, *Characterization of the ZO-1 protein in endothelial and other cell lines*. J Cell Sci, 1990. **97 ( Pt 2)**: p. 231-7.
23. Morita, K., et al., *Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells*. J Cell Biol, 1999. **147**(1): p. 185-94.
24. Martin-Padura, I., et al., *Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration*. J Cell Biol, 1998. **142**(1): p. 117-27.
25. Liu, L.B., et al., *Bradykinin increased the permeability of BTB via NOS/NO/ZONAB-mediated down-regulation of claudin-5 and occludin*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **464**(1): p. 118-25.
26. Schossleitner, K., et al., *Evidence That Cingulin Regulates Endothelial Barrier Function In Vitro and In Vivo*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016. **36**(4): p. 647-54.
27. Lampugnani, M.G., et al., *A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts*. J Cell Biol, 1992. **118**(6): p. 1511-22.

28. Breviario, F., et al., *Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(8): p. 1229-39.
29. Manes, T.D. and J.S. Pober, *Identification of endothelial cell junctional proteins and lymphocyte receptors involved in transendothelial migration of human effector memory CD4+ T cells*. *J Immunol*, 2011. **186**(3): p. 1763-8.
30. Muramatsu, F., et al., *Plakoglobin maintains the integrity of vascular endothelial cell junctions and regulates VEGF-induced phosphorylation of VE-cadherin*. *J Biochem*, 2017.
31. Matter, K. and M.S. Balda, *Signalling to and from tight junctions*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(3): p. 225-36.
32. Dusserre, N., et al., *PECAM-1 interacts with nitric oxide synthase in human endothelial cells: implication for flow-induced nitric oxide synthase activation*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(10): p. 1796-802.
33. Bernard, G., et al., *CD99 (E2) up-regulates alpha4beta1-dependent T cell adhesion to inflamed vascular endothelium under flow conditions*. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(10): p. 3061-5.
34. Vandembroucke, E., et al., *Regulation of endothelial junctional permeability*. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. **1123**: p. 134-45.
35. Nagy, J.A., et al., *Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis*. *Angiogenesis*, 2008. **11**(2): p. 109-19.
36. Park-Windhol, C. and P.A. D'Amore, *Disorders of Vascular Permeability*. *Annu Rev Pathol*, 2016. **11**: p. 251-81.
37. Dejana, E., et al., *The molecular organization of endothelial junctions and their functional role in vascular morphogenesis and permeability*. *Int J Dev Biol*, 2000. **44**(6): p. 743-8.
38. Zhu, W., et al., *Interleukin receptor activates a MYD88-ARNO-ARF6 cascade to disrupt vascular stability*. *Nature*, 2012. **492**(7428): p. 252-5.
39. Reglero-Real, N., et al., *Endothelial Cell Junctional Adhesion Molecules: Role and Regulation of Expression in Inflammation*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016. **36**(10): p. 2048-2057.
40. Venkiteswaran, K., et al., *Regulation of endothelial barrier function and growth by VE-cadherin, plakoglobin, and beta-catenin*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. **283**(3): p. C811-21.
41. Knudsen, K.A., et al., *Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin*. *J Cell Biol*, 1995. **130**(1): p. 67-77.
42. Bazzoni, G., *Endothelial tight junctions: permeable barriers of the vessel wall*. *Thromb Haemost*, 2006. **95**(1): p. 36-42.
43. Suzuki, H., et al., *Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions*. *Science*, 2014. **344**(6181): p. 304-7.
44. Nitta, T., et al., *Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice*. *J Cell Biol*, 2003. **161**(3): p. 653-60.
45. Cerutti, C. and A.J. Ridley, *Endothelial cell-cell adhesion and signaling*. *Exp Cell Res*, 2017. **358**(1): p. 31-38.
46. Li, D. and R.J. Murny, *Oncogenic Raf-1 disrupts epithelial tight junctions via downregulation of occludin*. *J Cell Biol*, 2000. **148**(4): p. 791-800.
47. Gonzalez-Mariscal, L., et al., *Tight junctions and the regulation of gene expression*. *Semin Cell Dev Biol*, 2014. **36**: p. 213-23.
48. Dejana, E., *Endothelial cell-cell junctions: happy together*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(4): p. 261-70.
49. O'Neill, L.A., *The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress*. *Immunol Rev*, 2008. **226**: p. 10-8.
50. Garlanda, C., C.A. Dinarello, and A. Mantovani, *The interleukin-1 family: back to the future*. *Immunity*, 2013. **39**(6): p. 1003-18.
51. de Boer, J.P., et al., *Interplay of complement and cytokines in the pathogenesis of septic shock*. *Immunopharmacology*, 1992. **24**(2): p. 135-48.

52. Kartal, E.D., et al., *Several Cytokines and Protein C Levels with the Apache II Scoring System for Evaluation of Patients with Sepsis*. *Balkan Med J*, 2012. **29**(2): p. 174-8.
53. Hordijk, P.L., *Recent insights into endothelial control of leukocyte extravasation*. *Cell Mol Life Sci*, 2016. **73**(8): p. 1591-608.
54. Liu, S.F. and A.B. Malik, *NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006. **290**(4): p. L622-L645.
55. Wu, L., et al., *Neuregulin1-beta decreases interleukin-1beta-induced RhoA activation, myosin light chain phosphorylation, and endothelial hyperpermeability*. *J Neurochem*, 2016. **136**(2): p. 250-7.
56. Beckers, C.M., V.W. van Hinsbergh, and G.P. van Nieuw Amerongen, *Driving Rho GTPase activity in endothelial cells regulates barrier integrity*. *Thromb Haemost*, 2010. **103**(1): p. 40-55.
57. Liang, J.L., et al., *Effects of interleukin-1beta on vascular reactivity after lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in rabbits and its relationship with PKC and Rho kinase*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2013. **62**(1): p. 84-9.
58. Lai, Y., et al., *Interleukin-8 induces the endothelial cell migration through the activation of phosphoinositide 3-kinase-Rac1/RhoA pathway*. *Int J Biol Sci*, 2011. **7**(6): p. 782-91.
59. Hilger, R.A., M.E. Scheulen, and D. Strumberg, *The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer*. *Onkologie*, 2002. **25**(6): p. 511-8.
60. Mannell, H. and F. Krotz, *SHP-2 regulates growth factor dependent vascular signalling and function*. *Mini Rev Med Chem*, 2012.
61. Yamamoto, T., et al., *IL-1beta regulates expression of Cx32, occludin, and claudin-2 of rat hepatocytes via distinct signal transduction pathways*. *Exp Cell Res*, 2004. **299**(2): p. 427-41.
62. Thompson, J.E. and C.B. Thompson, *Putting the rap on Akt*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(20): p. 4217-26.
63. Weylie, B., et al., *Phosphatidylinositide 3-kinase is important in late-stage fibroblast growth factor-1-mediated angiogenesis in vivo*. *J Vasc Res*, 2006. **43**(1): p. 61-9.
64. Neel, B.G., H. Gu, and L. Pao, *The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling*. *Trends Biochem Sci*, 2003. **28**(6): p. 284-93.
65. Pierpont, M.E., et al., *Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics*. *Circulation*, 2007. **115**(23): p. 3015-38.
66. He, R.J., et al., *Protein tyrosine phosphatases as potential therapeutic targets*. *Acta Pharmacol Sin*, 2014. **35**(10): p. 1227-46.
67. Alig, S.K., et al., *The tyrosine phosphatase SHP-1 regulates hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) protein levels in endothelial cells under hypoxia*. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0121113.
68. Cunnick, J.M., et al., *Regulation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway by SHP2*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(11): p. 9498-504.
69. MacGillivray, M., et al., *The protein tyrosine phosphatase SHP-2 regulates interleukin-1-induced ERK activation in fibroblasts*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(29): p. 27190-8.
70. Mannell, H., et al., *Inhibition of the tyrosine phosphatase SHP-2 suppresses angiogenesis in vitro and in vivo*. *J Vasc Res*, 2008. **45**(2): p. 153-63.
71. Ivins Zito, C., et al., *SHP-2 regulates the phosphatidylinositide 3-kinase/Akt pathway and suppresses caspase 3-mediated apoptosis*. *J Cell Physiol*, 2004. **199**(2): p. 227-36.
72. Wu, C.J., et al., *The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for mediating phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation by growth factors*. *Oncogene*, 2001. **20**(42): p. 6018-25.
73. You, M., et al., *Modulation of the nuclear factor kappa B pathway by Shp-2 tyrosine phosphatase in mediating the induction of interleukin (IL)-6 by IL-1 or tumor necrosis factor*. *J Exp Med*, 2001. **193**(1): p. 101-10.



74. Karyampudi, L., et al., *PD-1 Blunts the Function of Ovarian Tumor-Infiltrating Dendritic Cells by Inactivating NF-kappaB*. *Cancer Res*, 2016. **76**(2): p. 239-50.
75. Chang, F., et al., *Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention*. *Leukemia*, 2003. **17**(7): p. 1263-93.
76. Chong, Z.Z. and K. Maiese, *The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: diversified control of cell growth, inflammation, and injury*. *Histol Histopathol*, 2007. **22**(11): p. 1251-67.
77. Schoenwaelder, S.M., et al., *The protein tyrosine phosphatase Shp-2 regulates RhoA activity*. *Curr Biol*, 2000. **10**(23): p. 1523-6.
78. Wessel, F., et al., *Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin*. *Nat Immunol*, 2014. **15**(3): p. 223-30.
79. Biswas, P., et al., *PECAM-1 affects GSK-3beta-mediated beta-catenin phosphorylation and degradation*. *Am J Pathol*, 2006. **169**(1): p. 314-24.
80. Rutz, M., et al., *Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner*. *Eur J Immunol*, 2004. **34**(9): p. 2541-50.
81. Lee, D.H. and A.L. Goldberg, *Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists*. *Trends Cell Biol*, 1998. **8**(10): p. 397-403.
82. Huang, P., et al., *Structure-based design and discovery of novel inhibitors of protein tyrosine phosphatases*. *Bioorg Med Chem*, 2003. **11**(8): p. 1835-49.
83. Ades, E.W., et al., *HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line*. *J Invest Dermatol*, 1992. **99**(6): p. 683-90.
84. Hofmann, A., et al., *Combined targeting of lentiviral vectors and positioning of transduced cells by magnetic nanoparticles*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(1): p. 44-9.
85. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Anal Biochem*, 1985. **150**(1): p. 76-85.
86. Tirupathi, C., et al., *Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: assessment of endothelial barrier function*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(17): p. 7919-23.
87. Chislock, E.M. and A.M. Pendergast, *Abl family kinases regulate endothelial barrier function in vitro and in mice*. *PLoS One*, 2013. **8**(12): p. e85231.
88. Heimark, R.L., M. Degner, and S.M. Schwartz, *Identification of a Ca2(+)-dependent cell-cell adhesion molecule in endothelial cells*. *J Cell Biol*, 1990. **110**(5): p. 1745-56.
89. Komarova, Y.A., et al., *Protein Interactions at Endothelial Junctions and Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability*. *Circ Res*, 2017. **120**(1): p. 179-206.
90. Coulombe, G., et al., *Epithelial tyrosine phosphatase SHP-2 protects against intestinal inflammation in mice*. *Mol Cell Biol*, 2013. **33**(11): p. 2275-84.
91. Claude, P. and D.A. Goodenough, *Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia*. *J Cell Biol*, 1973. **58**(2): p. 390-400.
92. Saitou, M., et al., *Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands*. *Mol Biol Cell*, 2000. **11**(12): p. 4131-42.
93. Crosby, C.V., et al., *VE-cadherin is not required for the formation of nascent blood vessels but acts to prevent their disassembly*. *Blood*, 2005. **105**(7): p. 2771-6.
94. Ha, C.H., A.M. Bennett, and Z.G. Jin, *A novel role of vascular endothelial cadherin in modulating c-Src activation and downstream signaling of vascular endothelial growth factor*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(11): p. 7261-70.
95. Barabutis, N., A. Verin, and J.D. Catravas, *Regulation of pulmonary endothelial barrier function by kinases*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016. **311**(5): p. L832-L845.
96. Clark, P.R., et al., *Tumor Necrosis Factor Disrupts Claudin-5 Endothelial Tight Junction Barriers in Two Distinct NF-kappaB-Dependent Phases*. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0120075.
97. Herrera Abreu, M.T., et al., *Tyrosine phosphatase SHP-2 regulates IL-1 signaling in fibroblasts through focal adhesions*. *J Cell Physiol*, 2006. **207**(1): p. 132-43.

98. Niessen, C.M. and C.J. Gottardi, *Molecular components of the adherens junction*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1778**(3): p. 562-71.
99. Tsukita, S., M. Furuse, and M. Itoh, *Multifunctional strands in tight junctions*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(4): p. 285-93.
100. Fanali, G., et al., *Human serum albumin: from bench to bedside*. *Mol Aspects Med*, 2012. **33**(3): p. 209-90.
101. Sugio, S., et al., *Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution*. *Protein Eng*, 1999. **12**(6): p. 439-46.
102. Woodfin, A., et al., *The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(8): p. 761-9.
103. Adamson, P., et al., *Lymphocyte migration through brain endothelial cell monolayers involves signaling through endothelial ICAM-1 via a rho-dependent pathway*. *J Immunol*, 1999. **162**(5): p. 2964-73.
104. van Wetering, S., et al., *VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003. **285**(2): p. C343-52.
105. Schnoor, M., et al., *Cortactin deficiency is associated with reduced neutrophil recruitment but increased vascular permeability in vivo*. *J Exp Med*, 2011. **208**(8): p. 1721-35.
106. Schulte, D., et al., *Stabilizing the VE-cadherin-catenin complex blocks leukocyte extravasation and vascular permeability*. *EMBO J*, 2011. **30**(20): p. 4157-70.
107. Lanz, T.V., et al., *Protein kinase C $\beta$  as a therapeutic target stabilizing blood-brain barrier disruption in experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(36): p. 14735-40.
108. Tasaka, S., et al., *Attenuation of endotoxin-induced acute lung injury by the Rho-associated kinase inhibitor, Y-27632*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005. **32**(6): p. 504-10.
109. Garrido-Urbani, S., P.F. Bradfield, and B.A. Imhof, *Tight junction dynamics: the role of junctional adhesion molecules (JAMs)*. *Cell Tissue Res*, 2014. **355**(3): p. 701-15.
110. Timmerman, I., et al., *The tyrosine phosphatase SHP2 regulates recovery of endothelial adherens junctions through control of beta-catenin phosphorylation*. *Mol Biol Cell*, 2012. **23**(21): p. 4212-25.
111. Dejana, E., E. Tournier-Lasserre, and B.M. Weinstein, *The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications*. *Dev Cell*, 2009. **16**(2): p. 209-21.
112. Clevers, H., *Wnt/beta-catenin signaling in development and disease*. *Cell*, 2006. **127**(3): p. 469-80.
113. Huelsken, J. and W. Birchmeier, *New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates*. *Curr Opin Genet Dev*, 2001. **11**(5): p. 547-53.
114. Balda, M.S. and K. Matter, *The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression*. *EMBO J*, 2000. **19**(9): p. 2024-33.
115. Mann, B., et al., *Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(4): p. 1603-8.
116. Beard, R.S., Jr., et al., *Non-muscle Mlck is required for beta-catenin- and FoxO1-dependent downregulation of Cldn5 in IL-1 $\beta$ -mediated barrier dysfunction in brain endothelial cells*. *J Cell Sci*, 2014. **127**(Pt 8): p. 1840-53.
117. Taddei, A., et al., *Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5*. *Nat Cell Biol*, 2008. **10**(8): p. 923-34.
118. Jalali, S., et al., *Shear stress activates p60src-Ras-MAPK signaling pathways in vascular endothelial cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18**(2): p. 227-34.
119. Ukropec, J.A., M.K. Hollinger, and M.J. Woolkalis, *Regulation of VE-cadherin linkage to the cytoskeleton in endothelial cells exposed to fluid shear stress*. *Exp Cell Res*, 2002. **273**(2): p. 240-7.

120. Silversides, J.A., et al., *Conservative fluid management or deresuscitation for patients with sepsis or acute respiratory distress syndrome following the resuscitation phase of critical illness: a systematic review and meta-analysis*. Intensive Care Med, 2017. **43**(2): p. 155-170.
121. Stamatovic, S.M., et al., *Endocytosis of tight junction proteins and the regulation of degradation and recycling*. Ann N Y Acad Sci, 2017.
122. Mannell, H.K., et al., *ARNO regulates VEGF-dependent tissue responses by stabilizing endothelial VEGFR-2 surface expression*. Cardiovasc Res, 2012. **93**(1): p. 111-9.
123. London, N.R., et al., *Targeting Robo4-dependent Slit signaling to survive the cytokine storm in sepsis and influenza*. Sci Transl Med, 2010. **2**(23): p. 23ra19.
124. Aslan, A., et al., *Organ-Specific Differences in Endothelial Permeability-Regulating Molecular Responses in Mouse and Human Sepsis*. Shock, 2017. **48**(1): p. 69-77.
125. Fink, M.P. and H.S. Warren, *Strategies to improve drug development for sepsis*. Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(10): p. 741-58.
126. McCord, M., et al., *Targeting WNT Signaling for Multifaceted Glioblastoma Therapy*. Front Cell Neurosci, 2017. **11**: p. 318.
127. Liebner, S., et al., *Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood-brain barrier*. J Cell Biol, 2008. **183**(3): p. 409-17.

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Chemikalien .....	21
Tabelle 2 Antikörper .....	22
Tabelle 3 Stimulanzen & Hemmer .....	23
Tabelle 4 Geräte.....	26
Tabelle 5 Medien und Lösungen .....	27
Tabelle 6 Transduktion SHP-2 Viren .....	28
Tabelle 7 Western Blot Material .....	29
Tabelle 8 Western Blot Trenngel 45,5 ml .....	31
Tabelle 9 Western Blot Sammelgel 20 ml .....	31
Tabelle 10 qRT-PCR Material .....	32
Tabelle 11 qRT-PCR Proben.....	33
Tabelle 12 qRT-PCR Protokoll .....	33
Tabelle 13 qRT-PCR Primer.....	33
Tabelle 14 Immunofluoreszenz Material.....	34
Tabelle 15 TEER Material .....	35
Tabelle 16 In vivo Versuche Material .....	36
Tabelle 17 Anästhetika.....	37

## 7.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.1 Aufbau von Zell-Zellkontakten an Endothelzellen.....	5
Abbildung 1.1.2 Vergleich von parazellulärer mit transzellulärer Permeabilität .....	6
Abbildung 1.1.3 Regulation der parazellulären Permeabilität .....	9
Abbildung 1.1.4 Der IL-1 $\beta$ -Signalweg im Zusammenhang mit Permeabilität.....	12
Abbildung 1.2.1 Struktur und Regulation von SHP-2.....	15
Abbildung 1.2.2 Potentielle Signalwege von SHP-2 und IL-1 $\beta$ auf die Regulation der Permeabilität .....	18
Abbildung 3.1.1 Ein Funktionsverlust von SHP-2 erhöht die endotheliale Permeabilität .....	43
Abbildung 3.1.2 Ein Funktionsverlust von SHP-2 führt zu interzellulären Lücken .....	44
Abbildung 3.1.3 Die pharmakologische Hemmung von SHP-2 führt zu einem erhöhten IL-1 $\beta$ -induzierten FITC-Dextran-Austritt in vivo .....	46
Abbildung 3.1.4 Die Inhibition der Aktivität von SHP-2 erhöht die Extravasation von Leukozyten .....	48
Abbildung 3.2.1 Der Nachweis von Tight-Junction-Proteinen an der Zellgrenze.....	50
Abbildung 3.2.2 IL-1 $\beta$ verändert die Proteinmenge von TJ-Proteinen nicht .....	51
Abbildung 3.2.3 SHP-2 Inhibition reduziert die Proteinmenge von Tight-Junction-Proteinen.....	53
Abbildung 3.2.4 SHP-2 Inhibition hat keinen Einfluss auf die Degradation von Tight-Junction-Proteinen .....	55
Abbildung 3.2.5 Eine Inhibition von SHP-2 führt zu einer geringeren Menge an mRNA von Claudin-5 .....	57
Abbildung 4.1.1 Parazelluläre Permeabilität für mittelgroße molekulare Stoffe.....	65
Abbildung 4.3.1 Mögliche Signalwege zur Runterregulation von TJ-Proteinen unter der Inaktivierung von SHP-2.....	71

## 7.5 Lebenslauf

## 8 Danksagung

---

Ich danke besonders Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Pohl und Frau PD. Dr. rer. nat. Hanna Mannell für die exzellente Betreuung während meiner wissenschaftlichen Zeit am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin. Gerade Frau Dr. Mannell stand mir als Arbeitsgruppenleiterin bei Fragen stets zur Seite und half schnell und zielstrebig bei der Lösung von Problemen und bei der weiteren Versuchsplanung. Ihr Engagement und ihre immerwährende Geduld halfen maßgeblich an der Fertigstellung dieser Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitgliedern meines Instituts danken, die durch kritische Diskussionen und durch den wissenschaftlichen Austausch sowohl zum praktischen als auch zum theoretischen Teil dieser Arbeit beigetragen haben und eine wunderbare Arbeitsatmosphäre geschaffen haben. Sowohl unseren medizinisch technischen Assistenten, Ramona Mettler, Monica Bohmer als auch unseren wissenschaftlichen Hilfskräften möchte ich meinen Dank aussprechen, die ständig im Labor aushalfen und mich bei der Durchführung von Western Blots und PCRs unterstützten. Besonderen Dank gilt auch Frau Dr. rer. biol. hum. Yvonn Heun und Dr. med. Philipp Blüm aus unserer Arbeitsgruppe für die Hilfe bei den Experimenten in vivo. Darüber hinaus möchte ich Frau Dr. Monica Prünster danken, die mir half die TEER Methode zu etablieren.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des Förderprogramms für Forschung und Lehre (FöFoLe, Medizinische Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München) bedanken, die diese Arbeit sowohl finanziell als auch ideell, im Rahmen von Seminaren und Vorlesungen unterstützten.

Auch Elisabeth Barbulescu und Sebastian Bordt möchte ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

An letzter Stelle möchte ich meiner Familie danken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## 9 Eidesstattliche Versicherung

---

Hupel, Georg

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

*„Regulatorische Effekte der Tyrosinphosphatase SHP-2 auf die endotheliale Permeabilität“*

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 23.1.2019

---

Ort, Datum

Georg Hupel

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand