

**Bedeutung von Sphingosin-1-Phosphat und
der AMP-abhängigen Kinase
für die Integrität des glomerulären Endothels
bei Inflammation und Sepsis
– Eine *In-vitro*-Untersuchung
in murinen glomerulären Endothelzellen**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades**

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Karl Robin Finke
geboren am 15.12.1993 in Freiburg im Breisgau**

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. Dr. Sina M Coldewey, Jena**
- 2. Prof. Dr. Regine Heller, Jena**
- 3. Prof. Dr. Markus Velten, Bonn**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.12.2021

Ergebnisse dieser Arbeit sind Teil der Publikation:

"Sphingosine-1-phosphate promotes barrier-stabilizing effects in human microvascular endothelial cells via AMPK-dependent mechanisms."

Dennhardt, S.¹, Finke, K. R.¹, Huwiler, A., Coldewey, S. M.

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease 2019, 1865 (4):774-781.doi: 10.1016/j.bbadis.2018.12.022.

¹Dennhardt, S. und Finke, K. R. haben gleichwertig zu dieser Arbeit beigetragen

Impact Faktor des Journals (2018): 4,328

Anteil an der Publikation:

- Etablierung, Durchführung und Auswertung der ECIS-Versuche in den GEnC
- Etablierung, Durchführung und Auswertung der Stimulationsversuche mit Immunoblotting in den GEnC
- Durchführung und Auswertung der FACS-Analysen
- Anteil an Planung und Etablierung des AMPK-Knockdowns
- Erstellung und Revision des Manuskripts

Diese Publikation wird an Schlüsselstellen im Text und an Abbildungen mit (Dennhardt und Finke *et al.* 2019) zitiert.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	I
2	Einheitenverzeichnis	III
3	Zusammenfassung	1
4	Einleitung	3
4.1	Sepsis.....	3
4.1.1	Die endotheliale Barriere in der Sepsis.....	4
4.1.2	Akutes Nierenversagen in der Sepsis.....	5
4.1.3	Das glomeruläre Endothel in der Sepsis.....	6
4.2	Sphingosin-1-Phosphat (S1P)	8
4.2.1	S1P-Analogon FTY720.....	12
4.3	AMP-abhängige Kinase (AMPK).....	13
4.4	S1P-AMPK Interaktion.....	15
4.5	<i>In-vivo</i> - und <i>In-vitro</i> -Beurteilung der endothelialen Barriere.....	17
5	Ziele der Arbeit	20
6	Material	21
6.1	Chemikalien und Reagenzien	21
6.2	Zellkultur	22
6.3	Stimulanzen	22
6.4	Antikörper	23
6.5	Puffer und Stammlösungen	24
6.6	Weitere Materialien und Geräte.....	25
7	Methoden	27
7.1	Zellkultur	27
7.1.1	Murine glomeruläre Endothelzellen	27
7.1.2	Kulturbedingungen.....	27
7.1.3	Auftauen der Zellen	28
7.1.4	Passage der Zellen.....	29
7.1.5	Kryokonservierung der Zellen.....	29
7.2	Inflammatorischer Stimulus.....	30
7.3	Elektrische Impedanz-Messung der endothelialen Barriere.....	31
7.3.1	Zellinokulation.....	32
7.3.2	Proinflammatorische Stimulation	33

7.3.1	Auswertung der ECIS-Daten	33
7.4	Analyse der S1P ₁ -Rezeptorexpression	34
7.5	Stimulation von GEnC mit S1P	35
7.5.1	Kultivierungsbedingungen	35
7.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	36
7.5.3	Untersuchung der AMPK-Aktivität mittels Immunoblotting	36
7.6	Statistik	39
8	Ergebnisse	40
8.1	Charakterisierung der endothelialen Barriere von GEnC	40
8.2	Einfluss des inflammatorischen Stimulus auf die endotheliale Barriere	42
8.3	Einfluss eines Mediumwechsels auf die inflammatorisch ausgelöste Barrierestörung	45
8.4	Einfluss der gleichzeitigen Gabe des inflammatorischen Stimulus und des S1P-Analogons FTY720 auf die endotheliale Barriere	47
8.5	S1P ₁ -Rezeptor-Expression auf GEnC nach FTY720 Stimulation	49
8.6	Einfluss von S1P auf die AMPK Aktivität in GEnC	51
9	Diskussion	53
9.1	Beurteilung des <i>In-vitro</i> -Modells	53
9.1.1	Charakterisierung der endothelialen Barriere von GEnC	53
9.1.2	Einfluss eines inflammatorischen Stimulus auf die Barrierefunktion der GEnC	54
9.1.3	Einfluss eines Mediumwechsels auf das <i>In-vitro</i> - Inflamationsmodell	55
9.1.4	Beurteilung des ECIS-Systems	56
9.2	Auswirkungen von FTY720 auf das <i>In-vitro</i> -Inflamationsmodell	57
9.3	Einfluss von FTY720 auf die S1P ₁ -Expression auf GEnC	60
9.4	S1P/AMPK-Interaktion in GEnC	61
10	Schlussfolgerungen	64
11	Literatur- und Quellenverzeichnis	66
12	Anhang	76
12.1	Abbildungsverzeichnis	76
12.2	Tabellenverzeichnis	77
12.3	Lebenslauf	78

12.4	Danksagung.....	80
12.5	Ehrenwörtliche Erklärung.....	81

1 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AICAR	5-Aminoimidazol-4-Carboxamid Ribonucleotid
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-abhängige Kinase
Apo M	Apolipoproteinfraktion M
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
CaMKK2	Kalzium/Kalmodulin-abhängige Proteinkinase Kinase 2
CDase	Ceramidase
Cer-S	Ceramid-Synthase
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECIS	<i>electric cell-substrate impedance sensing</i> (elektrische Zell-Substrat Impedanz Messung)
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FACS	<i>fluorescence-activated cell scanning</i> (Durchflusszytometrie)
FBS	fetales bovines Serum
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
GENC	<i>glomerular endothelial cells</i> (immortalisierte, murine glomeruläre Endothelzellen)
GTPase	Guanosintriphosphatase, Synonym: G-Protein
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt solution</i>
HDL	High-Density-Lipoprotein
HMEC-1	humane (dermale) mikrovaskuläre Endothelzellen
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LKB1	Leber-Kinase B1

LPP 1-3	Lipid-Phosphat-Phosphohydrolasen 1 bis 3
LPS	Lipopolysaccharid
LPS+Cyt	Inflammatorischer Stimulus
MS	Multiple Sklerose
n	Anzahl unabhängiger Versuche
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PI	Propidiumiodid
PP2A/2C	Proteinphosphatasen 2A und 2C
PPME1	Proteinphosphatase Methylesterase 1
Rac-1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PL	S1P-Lyase
SD	Standardabweichung
siRNA	<i>small interfering RNA</i> (Ribonukleinsäure)
SMase	Sphingomyelinase
SM-S	Sphingomyelin-Synthase
SOFA-Score	<i>Sepsis-Related Organ Failure Assessment Score</i>
SPNS 2	Sphingolipid Transporter 2
SPHK 1/2	Sphingosin Kinasen 1 und 2
SPP 1/2	S1P-Phosphatase 1 und 2
SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
TAK1	Transforming growth factor beta-activated kinase 1
TEER	Trans-endotheliale elektrische Resistenz
Thr 172	Threonin 172
TNF	Tumornekrosefaktor
ts-SV40 TAg	Temperatursensitives (ts) Simian Virus 40 (SV40) large Tumor (T) Antigen (Ag)
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VLDL	Very-Low-Density-Lipoprotein

2 Einheitenverzeichnis

g	Gramm (Masse)
h	Stunde (Zeit)
Hz	Hertz (Frequenz)
kDa	Kilodalton (Masse)
mA	Milliampere (elektrische Stromstärke)
min	Minute (Zeit)
ml	Milliliter (Volumen)
nF	Kapazität (Nanofarad)
R(Ω)	Resistenz(Ohm)
rcf	<i>relative centrifugal force</i> (relative Zentrifugalbeschleunigung)
V	Volt (elektrische Spannung)

3 Zusammenfassung

Wissenschaftlicher Hintergrund:

Eine Störung der Integrität der endothelialen Barriere in der Mikrozirkulation spielt eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis und trägt über ein vaskuläres Leck und folgenden Mikrozirkulationsstörungen zu der Entstehung von Organdysfunktionen bei. Im Körper zeigt das Endothel im physiologischen Zustand relevante phänotypische Variationen zwischen Makro- und Mikrozirkulation sowie zwischen den unterschiedlichen Organen. Das akute Nierenversagen tritt häufig bei Sepsis auf und ist mit einer erhöhten Mortalität assoziiert. Eine Schädigung des glomerulären Endothels ist dabei ein auslösender Faktor für das akute Nierenversagen in der Sepsis.

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein körpereigenes bioaktives Sphingolipid, welches - vermittelt über den G-Protein gekoppelten S1P-Rezeptor 1 (S1P₁) - stabilisierend auf die endotheliale Barriere wirken kann. Das klinisch zugelassene S1P-Analogon FTY720 (Fingolimod, Gilenya®) kann wie S1P stabilisierend auf die endotheliale Barriere wirken, bindet dabei auch an S1P₁ und führt zu einer Reduktion dessen Oberflächenexpression. Präklinische Studien haben gezeigt, dass S1P die AMP-abhängige Kinase (AMPK) im makrovaskulären Endothel phosphoryliert und dass AMPK schützend auf das Endothel unter Inflammation wirken könnte. Dieser S1P-AMPK-Signaltransduktionsweg und dessen funktionelle Rolle für die Stabilisierung des glomerulären Endothels bei Inflammation wurde bisher noch nicht untersucht.

Fragestellung:

Ziel dieser Promotionsarbeit war es in murinen glomerulären Endothelzellen (GEnC) zu untersuchen, ob der S1P-AMPK-Signaltransduktionsweg in einem *In-vitro*-Modell einer inflammatorischen Barrierestörung schützend auf die endotheliale Barriere wirkt. Dazu sollte zunächst das *In-vitro*-Modell etabliert werden, um dann die Wirkung von FTY720 auf dieses Modell zu evaluieren. Zudem sollte die FTY720 Aktivität *in vitro* untersucht und der S1P-AMPK-Signaltransduktionsweg erstmals in GEnC nachgewiesen werden. Parallel zu dieser Promotionsarbeit wurde eine weitere Studie mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1) durchgeführt, um endothelphänotypspezifische Unterschiede darzustellen.

Methodik:

Um eine Inflammation *in vitro* zu simulieren, wurde ein inflammatorischer Stimulus (LPS+Cyt) aus LPS, TNF- α , IL-6, IL-1 β und IFN- γ verwendet. Veränderungen in der Barrierefunktion des Endothels wurden durch elektrische Impedanzmessungen (ECIS) quantifiziert. GEnC wurden im ECIS-System mit dem LPS+Cyt und 1 μ M FTY720 ko-stimuliert. Um die FTY720-Aktivität zu untersuchen, wurde die Rezeptorexpression des S1P₁ nach FTY720-Stimulation mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die AMPK-Aktivität nach S1P-Stimulation (1 μ M) wurde in den GEnC mittels Immunoblotting untersucht.

Ergebnisse und Diskussion:

LPS+Cyt führte in drei unterschiedlichen Konzentrationen zu einer signifikanten Verminderung der Barrierefunktion. Der Beginn dieser Barriestörung war dabei konzentrationsabhängig. Die Barriestörung war durch den Austausch des Kulturmediums der inflammatorisch stimulierten Zellen reversibel. Die gleichzeitige Applikation von FTY720 und LPS+Cyt hatte keinen signifikanten Effekt auf die endotheliale Barriestörung. Eine FTY720-Stimulation führte zu keiner Reduktion der S1P₁-Expression, dies spricht gegen eine S1P₁-Bindung und möglicherweise für eine fehlende Wirkung von FTY720 in den GEnC. Im Immunoblotting konnte für keinen der Stimulationszeiträume ein signifikanter Aktivitätsanstieg der AMPK nach Stimulation mit S1P in den GEnC nachgewiesen werden.

Schlussfolgerungen und Ausblick:

In dieser Arbeit wurde erfolgreich ein *In-vitro*-Inflammationsmodell des murinen glomerulären Endothels etabliert. Dieses könnte für weitere Testungen therapeutischer Strategien genutzt werden. FTY720 wird *in vitro* durch die GEnC möglicherweise nur unzureichend aktiviert oder zeigt eine reduzierte Wirkung auf das glomeruläre Endothel. Weitere Studien sollten mittels Gen- und Proteinexpressionsanalysen prüfen, ob die für die FTY720-Aktivierung benötigte Kinase in den GEnC exprimiert wird. Die parallele Studie mit HMEC-1 zeigte eine frühe AMPK-Aktivierung nach S1P-Stimulation. Eine mögliche endothelzelltypspezifische Ausprägung des S1P-AMPK-Signaltransduktionsweges sollte bei weiteren Untersuchungen beachtet werden.

4 Einleitung

4.1 Sepsis

Sepsis wird seit 2016 als eine lebensgefährliche Organdysfunktion aufgrund einer fehlregulierten Wirtsantwort auf eine Infektion definiert (Singer *et al.* 2016). Trotz des fortschrittlichen Gesundheitssystems in Deutschland verliefen von den rund 300.000 Sepsis-Fällen im Jahr 2013 knapp 70.000 tödlich. Besonders häufig betroffen von einer Sepsis sind Neugeborene sowie die Bevölkerung in der Altersgruppe der über 80-Jährigen (Fleischmann *et al.* 2016).

Die Pathophysiologie der Organdysfunktionen in der Sepsis ist komplex und bis heute noch unzureichend verstanden. Als Ursache wird eine Infektion gesehen, bei der Mikroorganismen in den Körper eindringen, von diesem detektiert werden und eine lokale Entzündungsreaktion auslösen. Im Falle einer Sepsis gerät diese Immunantwort außer Kontrolle und es entsteht eine dysregulierte systemische Inflammationsreaktion. Diese dysregulierte Inflammationreaktion führt u. a. zu Gerinnungsstörungen mit Mikrothromben und einer endothelialen Dysfunktion mit einer Störung der endothelialen Barrierefunktion (Ertmer und Rehberg 2016). Eine dadurch bedingte Störung der Mikrozirkulation ist einer der zentralen Auslöser des septischen Organversagens (Sakr *et al.* 2004).

Eine frühe Erkennung, schnelle und breite Antibiotikatherapie sowie eine zügige Flüssigkeitszufuhr stehen heute im Mittelpunkt der Sepsis-Therapie (Reinhart *et al.* 2010, Burrell *et al.* 2016). Treten schwere Organdysfunktionen auf, wird jedoch oft unausweichlich eine intensivmedizinische Betreuung notwendig. Maßnahmen wie eine Katecholamintherapie zur Kreislaufstabilisierung, Beatmung sowie Dialyse sind von supportiver Natur, aber meist die einzige Möglichkeit das Leben zu erhalten (Rhodes *et al.* 2017). Da die Testung neuer therapeutischer Ansätze direkt im Menschen aus ethischen Gründen nicht möglich ist, werden häufig zunächst Tiermodelle der Sepsis genutzt, um die Wirkung auf das systemische Krankheitsbild zu untersuchen. Molekulare Wirkungsweisen und Zielstrukturen möglicher Therapien werden weiterhin *in vitro* in Zellkulturmodellen genauer untersucht. Da speziesspezifische Unterschiede zum Mensch bestehen können, ist es wichtig Mechanismen auf

molekularer Ebene in humanen Zelllinien sowie Zelllinien aus der Versuchstierspezies zu untersuchen und vergleichen (Lewis *et al.* 2016).

4.1.1 Die endotheliale Barriere in der Sepsis

Ein zentraler Mechanismus in der Pathogenese des septischen Organversagens ist die endotheliale Dysfunktion (Ince *et al.* 2016). Das Endothelium formt als Innenauskleidung der Blutgefäße eine selektive, semipermeable Barriere zwischen der Zirkulation und den umgebenden Geweben (Radeva und Waschke 2017). Für die Aufrechterhaltung dieser Barriere spielen die an das Zytoskelett der Endothelzellen gebundenen Zell-Zell Kontakte eine tragende Rolle. Zu diesen Zell-Zell-Kontakten gehören die sogenannten Adhäsionskontakte (englisch *adherens junctions*) und die Zonula Occludens (englisch *tight junctions*, übersetzt „dichte Verbindung“) welche im interzellulären Raum den parazellulären Weg zwischen den Zellen regulieren (Radeva und Waschke 2017). Weiterhin sind die Endothelzellen und vor allem die interzellulären Räume von einer negativ geladenen Glykokalyxschicht, u. a. bestehend aus Glykoproteinen und Glykolipiden, bedeckt (Radeva und Waschke 2017). Diese Schicht ist ein wesentlicher Bestandteil der endothelialen Barriere und verhindert u. a. die Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten an das Endothel (Radeva und Waschke 2017). Im Körper ist das Endothel keineswegs uniform, sondern zeigt phänotypische Variationen zwischen u. a. Makro- und Mikrozirkulation sowie zwischen den vaskulären Betten der verschiedenen Organe. So kann das Endothel entsprechend der Funktion des zu versorgenden Gewebes fenestriert, kontinuierlich oder diskontinuierlich sein (Aird 2012). Die Funktion des Endothels ist nicht auf die Bildung einer selektiven Barriere beschränkt; ihm kommen aktive Rollen in Gerinnung, Inflammation, Immunität sowie lokaler und systemischer Sekretion von Botenstoffen zu (Michiels 2003).

In der Sepsis sind fast alle Funktionen des Endothels gestört. Die antikoagulatorisch wirkende Zelloberfläche nimmt einen gerinnungsfördernden und Fibrinolyse-hemmenden Zustand an. Dies führt zu der Entstehung von Mikrothromben bis hin zur disseminierten intravasalen Koagulation (DIC) mit resultierender Hypoperfusion der Mikrozirkulation (Opal und van der Poll 2015). Durch den Abbau der schützenden Glykokalyxschicht und der Aktivierung des

Endothels durch inflammatorische Zytokine werden diverse Adhäsionsmoleküle präsentiert, welche die Bindung von Leukozyten fördern. Dies führt zu einer Verstärkung der lokalen Inflammation und die folgenden Mechanismen der Immunzellinvasion schädigen die endotheliale Barriere direkt (Ince *et al.* 2016). Lipopolysaccharid (LPS) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) verstärken die endotheliale Permeabilität über einen Abfall des intrazellulären cyclischen AMP-Spiegels und die reduzierte Aktivität der kleinen GTPase (Guanosintriphosphatase, Synonym: G-Protein) Rac-1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*). Dies führt zu einer Veränderung der Zell-Zell-Kontakte sowie einer Kontraktion des Zytoskeletts (Schlegel *et al.* 2009, Schlegel und Waschke 2009). Die massive Permeabilitätserhöhung der endothelialen Barriere führt zu einem vaskulären Leck und weitreichenden Gewebeödemen. Dies komprimiert die Mikrozirkulation und erschwert die Sauerstoffdiffusion ins Gewebe, welches letztendlich das septische Organversagen begünstigt (Opal und van der Poll 2015).

4.1.2 Akutes Nierenversagen in der Sepsis

Akutes Nierenversagen ist definiert als ein Serumkreatinin-Anstieg von mehr als 26,5 $\mu\text{mol/l}$ in 48 Stunden, ein Anstieg des Serumkreatinins um mehr als das 1,5-fache über den Ausgangswert der letzten sieben Tage oder einem Abfall der stündlichen Urinmenge unter 0,5 ml pro Kilogramm Körpergewicht für 6 Stunden (KDIGO 2012). Bei mehr als der Hälfte der Patienten auf Intensivstationen weltweit tritt ein akutes Nierenversagen auf, welches mit einer erhöhten Mortalität und längerem Krankenhausaufenthalt einhergeht (Hoste *et al.* 2015). Als häufigster Auslöser für das akute Nierenversagen in dieser Patientengruppe wurde, noch vor Hypovolämie und Medikamenten, eine Sepsis identifiziert (Hoste *et al.* 2015). In einer Studie auf deutschen Intensivstationen hatten Patienten mit einer Sepsis, die mit dem Auftreten von akutem Nierenversagen einherging, eine signifikant höhere Krankenhausmortalität (67,3 %), als solche mit einer Sepsis ohne akutes Nierenversagen (42,8 %) (Oppert *et al.* 2008).

Die Entstehung eines akuten Nierenversagens im Rahmen einer Sepsis ist komplex. Oft wird eine Störung der Makrozirkulation und folgend eine globale

Hypoperfusion der Niere für die renalen Schädigungen verantwortlich gemacht (Di Giantomasso *et al.* 2003). Für ein multifaktorielles Geschehen spricht jedoch, dass in septischen Patienten ein akutes Nierenversagen trotz eines normalen oder erhöhten renalen Blutflusses im Rahmen der häufig hyperdynamen Zirkulation entstehen kann (Brenner *et al.* 1990). Während gute Messungen der renalen Zirkulation bei Sepsis im Patienten rar sind, wurde in einigen Tiermodellen der Sepsis ein akutes Nierenversagen trotz eines normalen oder erhöhten renalen Blutflusses nachgewiesen (Di Giantomasso *et al.* 2003, Langenberg *et al.* 2007). Ferner zeigte sich eine erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität in der Niere, welche mit einem Anstieg der renalen Retentionsparameter einherging (Wang *et al.* 2015). Histologische Schnitte der Niere von Mensch (*post mortem*) und Tier wiesen nur fokal morphologische Veränderungen, wie u. a. tubuläre Nekrosen, auf, welches gegen ein rein ischämisches Geschehen beruhend auf Makrozirkulationsstörungen spricht (Takasu *et al.* 2013, Maiden *et al.* 2016). Insgesamt lässt dies auf einen multifaktoriellen Mechanismus des septischen Nierenschadens schließen, in dem die Dysfunktion des renalen Endothels und die folgende Störung der Mikrozirkulation eine tragende Rolle spielen (Ince *et al.* 2016).

4.1.3 Das glomeruläre Endothel in der Sepsis

Die Mikrozirkulation der Niere weist die Besonderheit auf, dass sie aus zwei Kapillarsystemen besteht. Dem glomerulären Kapillarsystem mit seiner Filtrationsfunktion im Glomerulus folgt das peritubuläre Kapillarsystem, welches am tubulären Transport teilnimmt (Satchell und Braet 2009).

Das Endothel des glomerulären Kapillarsystems bildet mit den Podozyten und einer gemeinsam produzierten Basalmembran die sogenannte glomeruläre Filtrationsbarriere (Blut-Harn-Schranke, Abbildung 1). Die glomerulären Endothelzellen zeigen dabei einen spezifischen morphologischen Phänotyp mit Fenestrations und einer sie bedeckenden, negativ geladenen Glykokalyxschicht. Diese erlaubt eine selektive Filterung von kleinen Molekülen sowie Wasser (Primärharn) in den Tubulus und verhindert die Passage von

großen negativ geladenen Plasmaproteinen wie Albumin oder Erythrozyten (Satchell und Braet 2009).

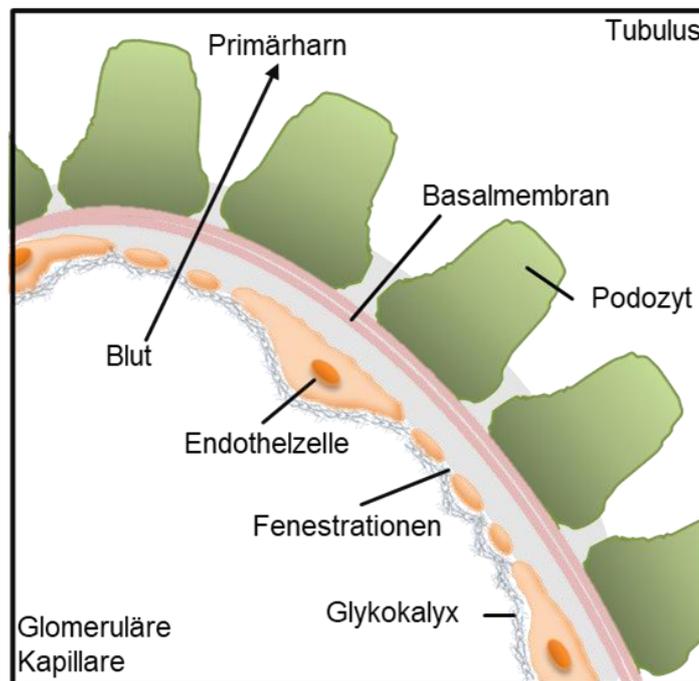


Abbildung 1: Schematische Darstellung der glomerulären Filtrationsbarriere. Gezeigt ist eine glomeruläre Kapillare ausgekleidet mit fenestrierten Endothelzellen, die sie bedeckende Glykokalyxschicht, die Basalmembran sowie Podozyten. Über diese Barriere wird aus dem Blut der Primärharn in den Tubulus filtriert.

Neben dem Endothel der systemischen Zirkulation ist auch das glomeruläre Endothel von einer Schädigung im Rahmen einer Sepsis betroffen. Mehrere Studien konnten in septischen Patienten eine Mikroalbuminurie nachweisen, was für eine pathologisch erhöhte Permeabilität des glomerulären Endothels sprechen könnte (De Gaudio *et al.* 2000, Bhadade *et al.* 2014). Diese erhöhte Albuminausscheidung korrelierte positiv mit dem häufig zur klinischen Einschätzung von septischen Organdysfunktionen genutzten SOFA-Score (*Sepsis-related organ failure assessment score*) (De Gaudio *et al.* 2000). Auch in einem Sepsis-Modell in Ratten ließ sich eine Albuminurie mit Veränderungen der glomerulären Filtrationsbarriere beobachten. Im Rahmen dieser Studie konnte zudem eine Veränderung sowie ein Verlust der glomerulären Glykokalyxschicht in der Sepsis beobachtet werden, womit diese Albuminurie erklärt wurde (Adembri *et al.* 2011).

TNF- α wurde als einer der Mediatoren des septischen Nierenschadens identifiziert (Cunningham *et al.* 2002, Xu *et al.* 2014). Ein durch LPS in Mäusen ausgelöstes akutes Nierenversagen führte zu pathologischen Veränderungen im glomerulären Endothel. In TNF-Rezeptor 1 defizienten Mäusen wurden diese Veränderungen reduziert, welches zu einer besseren Nierenfunktion führte (Xu *et al.* 2014). TNF- α verursachte in kultivierten glomerulären Endothelzellen eine interzellulärer Spaltbildung. Diese entstanden durch Veränderungen im Zytoskelett und einem Abbau der Zell-Zell-Kontakte (Xu *et al.* 2015). Dies verdeutlicht eine Beteiligung des glomerulären Endothels in der Pathogenese des septischen Nierenschadens. Eine Intervention zum Schutz des glomerulären Endothels in der Sepsis könnte folglich die renale Funktion verbessern und die mit dem akuten Nierenversagen assoziierte erhöhte Morbidität und Mortalität reduzieren.

4.2 Sphingosin-1-Phosphat

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein körpereigenes bioaktives Sphingolipid und spielt eine Rolle bei der Proliferation, dem Überleben und der Migration von Zellen (Xiong und Hla 2014). Weiterhin wurde eine stark stabilisierende Wirkung von S1P auf die endotheliale Barriere beschrieben (Xiong und Hla 2014). S1P entsteht aus Sphingosin, welches durch die Sphingosin Kinasen 1 und 2 (SPHK 1/2) zu S1P phosphoryliert wird. Dies geschieht zum einen intrazellulär, jedoch wird die SPHK 1 auch ins Plasma sekretiert und kann dort S1P produzieren (Venkataraman *et al.* 2006). Sphingosin wird durch den Abbau von Ceramid gebildet. Ceramid wiederum kann u. a. aus Sphingomyelin, ein Bestandteil der Plasmamembranen, gebildet werden. Für den Abbau von S1P sind mehrere Enzyme verantwortlich: Die S1P-Lyase (S1PL) degradiert S1P unwiederbringlich, die zwei Isoformen der S1P-Phosphatase (SPP 1/2) und die drei Lipid-Phosphat-Phosphohydrolasen (LPP 1-3) dephosphorylieren S1P zurück zu Sphingosin. Da bis auf LPP 1 und LPP 3 alle Enzyme intrazellulär lokalisiert sind, können nur diese zwei Enzyme extrazelluläres S1P abbauen (Ksiazek *et al.* 2015).

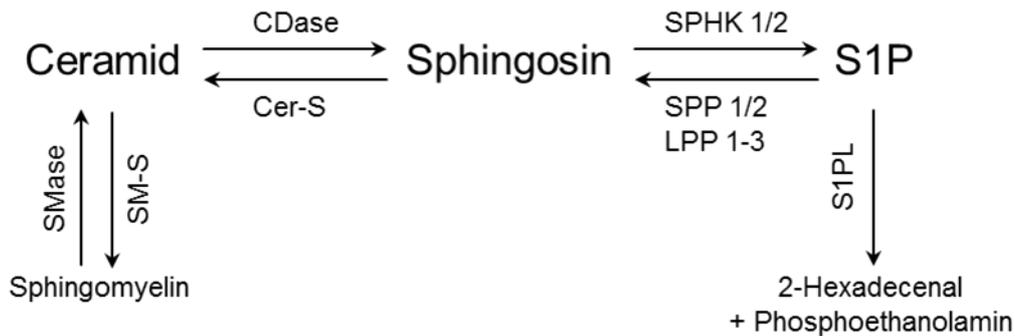


Abbildung 2: Übersicht über den Sphingosin-Metabolismus. S1P: Sphingosin-1-Phosphat, SMase: Sphingomyelinase, SM-S: Sphingomyelin-Synthase, CDase: Ceramidase, Cer-S: Ceramid-Synthase, SPHK 1/2: Sphingosinkinase 1 und 2, SPP 1/2: S1P-Phosphatase 1 und 2, LPP 1-3: Lipid-Phosphat-Phosphohydrolase 1 bis 3, S1PL: S1P-Lyase (Modifiziert nach Ksiazek *et al.* 2015).

S1P ist hauptsächlich im Blut und der Lymphe vorhanden (Hla *et al.* 2008). Dagegen finden sich im Interstitium vergleichsweise niedrigere Konzentrationen (Hla *et al.* 2008). Dies bedingt einen S1P-Gradienten, welcher durch die unterschiedliche Expression der oben beschriebenen S1P-synthetisierenden und -abbauenden Enzyme in Gewebe und Zirkulation aufrechterhalten wird (Hla *et al.* 2008).

Im Blut sind Erythrozyten für den Großteil des S1P-Spiegels verantwortlich. Sie stellen ein dynamisches Hauptreservoir dar, indem sie extrazelluläres Sphingosin aufnehmen und zu S1P phosphorylieren, dieses speichern und in das Plasma abgeben können (Hanel *et al.* 2007, Bode *et al.* 2010). In Erythrozyten fehlen die Enzyme SPP und S1PL des S1P-Abbaus, welches es ihnen ermöglicht viel S1P zu akkumulieren (Ito *et al.* 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Plasma-S1P-Werte stark mit der Anzahl gemessener Erythrozyten korrelierte (Selim *et al.* 2011). Erythrozyten wird somit eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung des Plasma-S1P-Spiegels zugesprochen (Hanel *et al.* 2007). Auch Thrombozyten können S1P produzieren, speichern und nach Stimulation abgeben (Tani *et al.* 2005). Obwohl die S1P-Werte im Serum höher sind als im Plasma zeigten *In-vivo*-Versuche, in denen die Thrombozyten-Anzahl molekulargenetisch drastisch reduzierte wurde, keine signifikante Veränderung der Plasma-S1P-Spiegel (Venkataraman *et al.* 2008). Leukozyten besitzen ebenfalls die Möglichkeit S1P zu produzieren, ihr Beitrag zum Plasma-S1P-Pool ist jedoch vermutlich von nur untergeordneter Rolle (Ksiazek *et al.* 2015). Vaskuläre Endothelzellen stellen

eine weitere wichtige Quelle des Plasma-S1P-Spiegels dar, welche u. a. nach Scherbelastung vermehrt S1P abgeben können (Venkataraman *et al.* 2008). Dabei kann intrazellulär produziertes S1P in Endothelzellen über den Sphingolipid Transporter 2 (SPNS2) in den extrazellulären Raum transportiert werden (Hisano *et al.* 2012).

Im Plasma wird S1P hauptsächlich von der Apolipoproteinfraktion M (Apo M) des High-Density-Lipoprotein (HDL) und im geringeren Maße von Albumin gebunden (Winkler *et al.* 2019). Auch Low-Density-Lipoprotein (LDL) sowie Very-Low-Density-Lipoprotein (VLDL) können als S1P-Träger fungieren, jedoch in einem weit niedrigeren Ausmaß als Albumin und HDL. Freies S1P macht hierbei nur einen kleinen Anteil des gesamten S1P-Pools im Plasma aus (Wilkerson *et al.* 2012, Murata *et al.* 2000). Im Plasma hat freies S1P nur eine sehr kurze Halbwertszeit und wird schnell abgebaut (Kimura *et al.* 2001).

S1P wirkt intrazellulär als sekundärer Botenstoff oder extrazellulär über die S1P-Rezeptoren S1P₁₋₅. Diese sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, welche sich jedoch einzeln in der Aktivierung der G-Protein Untereinheiten und weiteren Signalwegen unterscheiden (Sanchez und Hla 2004). Weiterhin weisen verschiedene Gewebe variierende Expressionsmuster der 5 S1P-Rezeptoren auf (Sanchez und Hla 2004). Für den S1P₁ konnte gezeigt werden, dass eine S1P-Bindung zu einer schnellen Rezeptorinternalisierung führte (Liu *et al.* 1999). Der Rezeptor wurde jedoch nach ~30 min erneut an der Zelloberfläche exprimiert (Liu *et al.* 1999).

Im vaskulären Endothel wird vor allem der S1P₁ und im geringeren Ausmaß der S1P₂ und S1P₃ exprimiert (Xiong und Hla 2014). Es wurde gezeigt das S1P stark stabilisierend auf die endotheliale Barriere sowohl *in vitro* (Garcia *et al.* 2001) als auch *in vivo* wirkt (Camerer *et al.* 2009). Dabei verstärkt S1P die endotheliale Barriere über mehrere Wege. Eine S1P-Bindung an den S1P₁ führt zu einem Calcium(Ca²⁺)-Influx in die Zelle, welcher die kleine GTPase Rac-1 aktiviert. Rac-1 fördert daraufhin den Aufbau der Adhäsionskontakte und dies führt zu einem Schließen der Zell-Zell-Kontakte zwischen den Zellen (Mehta *et al.* 2005). Weiterhin phosphoryliert S1P die Myosin-Leichtkettenkinase und verstärkt so das kortikale Aktin-Zytoskelett (Garcia *et al.* 2001). Dieser Mechanismus ist ebenfalls von Rac-1 abhängig (Sumida und Stamer 2010). Zudem werden die fokalen Adhäsionen, welche die Endothelzellen an die unter

ihnen liegende Basalmembran binden, verstärkt (Sun *et al.* 2009). Alle diese Mechanismen führten *in vitro* zu einem rapiden (unter 30 min), kurzen Anstieg der endothelialen Barrierefunktion, welcher meist über wenige Stunden (h) kontinuierlich abfiel (Garcia *et al.* 2001, Mehta *et al.* 2005, Sun *et al.* 2009). In Mäusen, in denen genetisch über ein Rekombinasesystem der Plasma S1P-Spiegel dauerhaft reduziert war, trat eine erhöhte vaskuläre Permeabilität auf (Camerer *et al.* 2009). Zusätzlich führt ein komplettes Ausschalten der SPHK 1 und 2 sowie des S1P₁ zu einer gestörten Angiogenese und embryonalen Letalität (Mizugishi *et al.* 2005).

Peng *et al.* zeigten erstmals in einem murinen Modell des LPS-induzierten akuten Lungenschadens, dass S1P die vaskuläre Leckage in Lunge und Niere signifikant reduzieren kann (Peng *et al.* 2004). Tauseef *et al.* konnten weiterhin die protektive Rolle von S1P im inflammatorisch induzierten vaskulären Leck der Lunge festigen (Tauseef *et al.* 2008). In einem murinen Anaphylaxiemodell mit reduzierten S1P-Werten, in welchem auch die endotheliale Barriere inflammatorisch geschädigt war, führte eine therapeutische Hebung des S1P-Plasmaspiegels auch zu einem reduzierten vaskulären Leck (Camerer *et al.* 2009). Wang *et al.* konnten in einem Mausmodell zeigen, dass eine Aktivierung des S1P₁ die gestörte renale Zirkulation, renale Retentionsparameter sowie mikrovaskuläre Permeabilität im Rahmen des septischen Nierenschadens verbesserte (Wang *et al.* 2015). Weiterhin reduziert S1P *in vitro* die Adhäsionsmolekül (VCAM-1)-Expression und Monozytenadhäsion auf Endothelzellen nach TNF- α -Exposition (Kimura *et al.* 2010). Mehrere Studien zeigen, dass in Patienten mit Sepsis die S1P-Werte im Serum und Plasma signifikant reduziert sind (Coldewey *et al.* 2016, Winkler *et al.* 2015, Winkler *et al.* 2019). Dabei korrelierten niedrigere S1P-Werte mit einem schwereren Krankheitsverlauf und erhöhter Mortalität (Coldewey *et al.* 2016, Winkler *et al.* 2015, Frej *et al.* 2016, Winkler *et al.* 2019). Diese Beobachtung ließ sich in mehreren Sepsis-Modellen in Mäusen und Affen reproduzieren (Coldewey *et al.* 2016, Frej *et al.* 2016). Dies verdeutlicht die zentrale Rolle von S1P in der Aufrechterhaltung und Verstärkung der endothelialen Barriere des Gefäßsystems im gesunden und inflammatorischen Zustand.

4.2.1 S1P-Analagon FTY720

Der Immunmodulator FTY720, auch bekannt unter dem Wirkstoffnamen Fingolimod (Handelsname Gilenya®), ist das erste klinisch zugelassene Medikament, welches als S1P-Analagon wirkt. Japanische Wissenschaftler beschrieben erstmals die immunsuppressiven Wirkungen von Myriocin, ein Stoffwechselprodukt des Pilzes *Isaria sinclairii* (Fujita *et al.* 1994). Aus Myriocin wurde später das heute verwendete FTY720 entwickelt (Suzuki *et al.* 1996). FTY720 entspricht strukturell dem natürlich vorkommenden Sphingosin. Nach Aufnahme in den Körper wird die aktive, phosphorylierte FTY720-Form (FTY720-P) gebildet. Hauptverantwortlich für diese Phosphorylierung ist die SPHK 2 und zu einem geringeren Teil die SPHK 1 (Paugh *et al.* 2003). *In vitro* kann FTY720 durch Inkubation mit Endothelzellen zu FTY720-P phosphoryliert werden (Sanchez *et al.* 2003). FTY720-P bindet an alle S1P-Rezeptoren außer dem S1P₂ (Oo *et al.* 2007). Seit 2011 ist FTY720 in Europa als Zweitlinientherapie bei hochaktiver schubförmiger remittierender Multipler Sklerose (MS) zugelassen. In der Multiplen Sklerose infiltrieren auto-reaktive T-Lymphozyten das zentrale Nervensystem und attackieren die körpereigenen Nervenscheiden, welches zur Entstehung der MS-typischen Symptomatik führt (Chun und Hartung 2010). Lymphozyten folgen dem S1P-Gradienten zwischen Lymphgewebe und Blut, um in die systemische Zirkulation zu gelangen. FTY720-P bindet den für diese Migration benötigten S1P₁ mit hoher Affinität, was zu der Internalisierung dieses Rezeptors führt. Im Gegensatz zu der S1P-Bindung an diesen Rezeptor, wird der S1P₁ nach FTY720-P-Bindung degradiert und nicht an der Oberfläche re-exprimiert. Dies sperrt bei Multipler Sklerose die auto-aggressiven T-Lymphozyten im Lymphgewebe ein und verhindert ihre Migration in das zentrale Nervensystem (Chun und Hartung 2010, Oo *et al.* 2007).

Mehrere *In-vitro*-Studien mit Endothelzellen konnten zeigen, dass FTY720 und FTY720-P ähnlich wie S1P die endotheliale Barriere im nativen Milieu stärken (Dudek *et al.* 2007, Camp *et al.* 2016, Wang *et al.* 2011, Sarai *et al.* 2009). Die Stabilisierung der endothelialen Barriere begann dabei etwas verzögert und hielt länger an als nach S1P-Stimulation (Dudek *et al.* 2007, Wang *et al.* 2011). FTY720 wirkt dabei im Endothel über ähnliche Mechanismen wie S1P über

S1P₁ und Rac-1 auf die Zell-Zell-Kontakte (Sarai *et al.* 2009). Mehrere Arbeiten zeigten jedoch, dass es einen Mechanismus geben muss, der sich von der S1P-Wirkung unterscheidet: FTY720 konnte die Barrierefunktion unabhängig vom S1P₁ mit ausbleibendem Ca²⁺-Influx in die Zelle (Dudek *et al.* 2007), ohne Beteiligung der kleinen GTPase Rac-1 (Camp *et al.* 2016) und ohne Einfluss auf die Adhäsionskontakte- und die Zonula Occludens (Wang *et al.* 2011), verbessern. *In vivo* führte FTY720 zu einem reduzierten Plasmavolumenverlust im Rattenmodell der Sepsis (Lundblad *et al.* 2013). Weiterhin konnte in Mäusen durch FTY720-Gabe eine durch VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) induzierte verstärkte vaskuläre Permeabilität verhindert werden (Sanchez *et al.* 2003). FTY720 führte zudem zu einem Anstieg der Serum-S1P-Werte und verbesserte die Herzfunktion in Sepsis-Mausmodellen (Coldewey *et al.* 2016). Dies zeigt, dass FTY720 das Potenzial hat, die endotheliale Barriere in inflammatorischen Zuständen zu schützen und ein vaskuläres Leck zu reduzieren. Die Auswirkungen von FTY720 auf die glomeruläre Endothelbarriere im inflammatorischen Zustand *in vitro* wurden bisher jedoch noch nicht untersucht.

4.3 AMP-abhängige Kinase (AMPK)

Die AMPK ist eine Serin/Threonin-Kinase, welche in allen Säugetierzellen exprimiert wird und als zentraler Regulator der zellulären Energiehomöostase agiert (Hardie und Carling 1997).

Als Antwort auf Zustände, in denen vermehrt ATP in der Zelle verbraucht und dazu korrelierend der AMP-Spiegel erhöht ist, reduziert die AMPK anabolische ATP-verbrauchende und verstärkt katabolische ATP-generierende Stoffwechselfvorgänge (Hardie 2011). Die AMPK nimmt dabei Einfluss auf den Lipidstoffwechsel, Glukose-Transporter, Proteinsynthese sowie die mitochondriale Biogenese (Jeon 2016).

Das heterotrimere Protein besteht aus der katalytischen Untereinheit α und den nicht katalytischen β - und γ -Untereinheiten (Stapleton *et al.* 1997). Jede der Untereinheiten besitzt spezifische Isoformen, die je nach zellulärer und gewebespezifischer Lokalisation variieren können.

Die α -Untereinheit besitzt die Isoformen $\alpha 1$ und $\alpha 2$, welche durch Gene (PRKAA1 und 2) auf unterschiedlichen Chromosomenlokalisationen kodiert werden (Shirwany und Zou 2014). Wird AMPK phosphoryliert, ist die Kinase aktiv. Als Aktivierungsstelle, welche phosphoryliert werden muss, wurde Threonin 172 (Thr 172) auf beiden Isoformen der α -Untereinheit identifiziert (Hardie 2011). Leber-Kinase B1 (LKB1), Kalzium/Kalmodulin-abhängige Proteinkinase Kinase 2 (CaMKK2) sowie Transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK1) wurden als Kinasen identifiziert, welche Thr 172 phosphorylieren. Die Proteinphosphatasen 2A und 2C (PP2A/2C) und die Proteinphosphatase Methylsterase 1 (PPME1) hingegen können die Aktivierungsstelle dephosphorylieren und so die AMPK deaktivieren (Jeon 2016).

Die β -Untereinheit mit ihren Isoformen 1 und 2 (Gene: *PRKAB 1,2*) kann Glykogen binden, welches zu einer reduzierten AMPK-Phosphorylierung führt (McBride *et al.* 2009). Die γ -Untereinheit mit ihren Isoformen 1 bis 3, welche jeweils durch die Gene *PRKAG1-3* kodiert werden, besitzt eine regulatorische Funktion der AMPK-Aktivierung (Shirwany und Zou 2014). Die γ -Untereinheit kann Adenosinmonophosphat (AMP), Adenosindiphosphat (ADP) sowie Adenosintriphosphat (ATP) binden. Binden AMP oder ADP an die γ -Untereinheit, verändert die AMPK ihre Konformation, was eine verstärkte Phosphorylierung und verminderte Dephosphorylierung der Thr 172 Stelle durch die oben beschriebenen Phosphatasen bewirkt und so die AMPK-Aktivität verstärkt. ATP bindet kompetitiv an die γ -Untereinheit und blockiert so die AMP/ADP-Wirkung (Jeon 2016, Gowans *et al.* 2013).

In Endothelzellen kommen der AMPK noch weitere Funktionen hinzu, die teils protektiv gegenüber Inflammation wirken. AMPK wirkt als eine Art Redox-Sensor, der oxidativen Stress durch reaktive Sauerstoffspezies mildern kann. Oxidativer Stress kann zur Endotheldysfunktion beitragen (Colombo und Moncada 2009). Zudem kann durch AMPK die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) direkt phosphoryliert und somit aktiviert werden (Chen *et al.* 1999, Levine *et al.* 2007). Die aktivierte eNOS produziert Stickstoffmonoxid (NO), welches protektive Wirkungen auf das Endothel hat. Diese Wirkungen werden u. a. durch eine reduzierte Thrombozyten-Aggregation und Leukozytenbindung vermittelt (Naseem 2005). AMPK wird auch für die

Kapillarbildung der Endothelzellen *in vitro* benötigt (Levine *et al.* 2007). Weiterhin führte eine AMPK-Aktivierung in kultivierten Endothelzellen zu einer reduzierten Monozyten-Adhäsion und Zelladhäsionsmolekül-Expression (VCAM-1) nach TNF- α -Stimulation (Ewart *et al.* 2008, Kimura *et al.* 2010).

In einem Sepsis-Mausmodell führte die Vorbehandlung mit dem AMPK-Aktivator 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid Ribonucleotid (AICAR) zu einer Reduktion des septischen Leberschadens, niedrigeren inflammatorischen Zytokinen im Serum, einer reduzierten Leukozyten-Endothel-Interaktion und einer verbesserten mikrovaskulären Permeabilität (Escobar *et al.* 2015). Die AICAR-Vorbehandlung führte zudem zu einer Besserung des septischen Nierenschadens mit einer Reduktion von pathologisch vermehrten Fenestrationsstellen im glomerulären Endothel (Escobar *et al.* 2015). In LPS-stimulierten, kultivierten Lungenendothelzellen führte eine AMPK α 1-Aktivierung zu einer Verbesserung der reduzierten endothelialen Barrierefunktion (Jian *et al.* 2013). In dieser Studie von Jian *et al.* führte die AMPK-Aktivierung auch zu einem verbesserten Überleben und einer reduzierten pulmonalen Schädigung im Rattenmodell eines Endotoxin-induzierten Lungenschadens (Jian *et al.* 2013).

4.4 S1P-AMPK Interaktion

Neben der bereits beschriebenen AMPK-Aktivierung durch Veränderungen in der Energiehomöostase, können auch unterschiedliche Substanzen, wie beispielsweise Metformin – ein Medikament, welches für die Behandlung des Diabetes mellitus eingesetzt wird – die AMPK aktivieren (Jian *et al.* 2013). S1P wurde als ein weiterer Mediator der AMPK-Aktivierung identifiziert. Bisher fand diese Interaktion in drei wissenschaftlichen Arbeiten Erwähnung:

Levine *et al.* beschrieben als erste Gruppe eine Interaktion zwischen S1P und AMPK (Levine *et al.* 2007): In Rinderaorten-Endothelzellen konnte dabei gezeigt werden, dass S1P zu einer verstärkten Phosphorylierung der AMPK mit einem Maximum nach ungefähr 5 min führte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der si (*small interfering*) RNA-vermittelte Knockdown der AMPK zu einer verminderten Aktivierung der eNOS und Rac-1 durch S1P führte. Zudem wurde gezeigt, dass die AMPK für die durch S1P-induzierte Zellmigration benötigt

wird. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass AMPK als Vermittler in einem S1P-aktivierten Signalweg agiert und für die Aktivierung der Mediatoren der S1P-Wirkung wichtig ist (Levine *et al.* 2007).

In einer weiteren Arbeit konnte in Endothelzellen der humanen Nabelschnurvenen die AMPK-Phosphorylierung durch S1P bestätigt werden (Kimura *et al.* 2010). Hier wurde ebenfalls nachgewiesen, dass AMPK für die S1P-induzierte Endothelzellmigration benötigt wird. Zudem vermittelte AMPK die bereits beschriebenen S1P-Wirkungen auf die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Monozytenadhäsion (Kimura *et al.* 2010).

In der dritten Arbeit konnte in immortalisierten Hamster-Fibroblast-Zellen eine AMPK-Aktivierung durch S1P mit funktionell relevanter Bedeutung gezeigt werden (Malik *et al.* 2015). Eine S1P-Stimulation führt zu einem Ca^{2+} -Einstrom in Endothelzellen (Mehta *et al.* 2005). Es wird vermutet, dass durch diesen Einstrom die CaMKK β 2 aktiviert wird, welche dann die AMPK phosphoryliert (Levine *et al.* 2007, Kimura *et al.* 2010).

Die hier genannten Studien deuten darauf hin, dass im Endothel ein S1P/AMPK-Signalweg existiert. AMPK könnte in dieser Interaktion als zentraler Vermittler der S1P-Wirkungen agieren. Abbildung 3 stellt schematisch die S1P/AMPK-Interaktion sowie mögliche molekulare Zielstrukturen dar. Diese Interaktion zwischen S1P und AMPK wurde jedoch bisher nur in Endothelzellen der Makrozirkulation (Levine *et al.* 2007, Kimura *et al.* 2010) und Fibroblasten nachgewiesen (Malik *et al.* 2015). In Endothelzellen der renalen Mikrozirkulation oder anderen mikrovaskulären Versorgungsgebieten wurde eine Aktivierung der AMPK durch S1P noch nicht untersucht. Weiterhin wurde die funktionelle Bedeutung dieses möglichen Signaltransduktionswegs für die endothelstabilisierende Wirkung von S1P bisher noch nicht evaluiert. Da sowohl S1P als auch AMPK schützende Wirkungen auf das Endothel in Inflammation haben, könnte dieser Signalweg ein therapeutisches Ziel zur Endothelstabilisierung in dysregulierten inflammatorischen Zuständen wie der Sepsis darstellen.

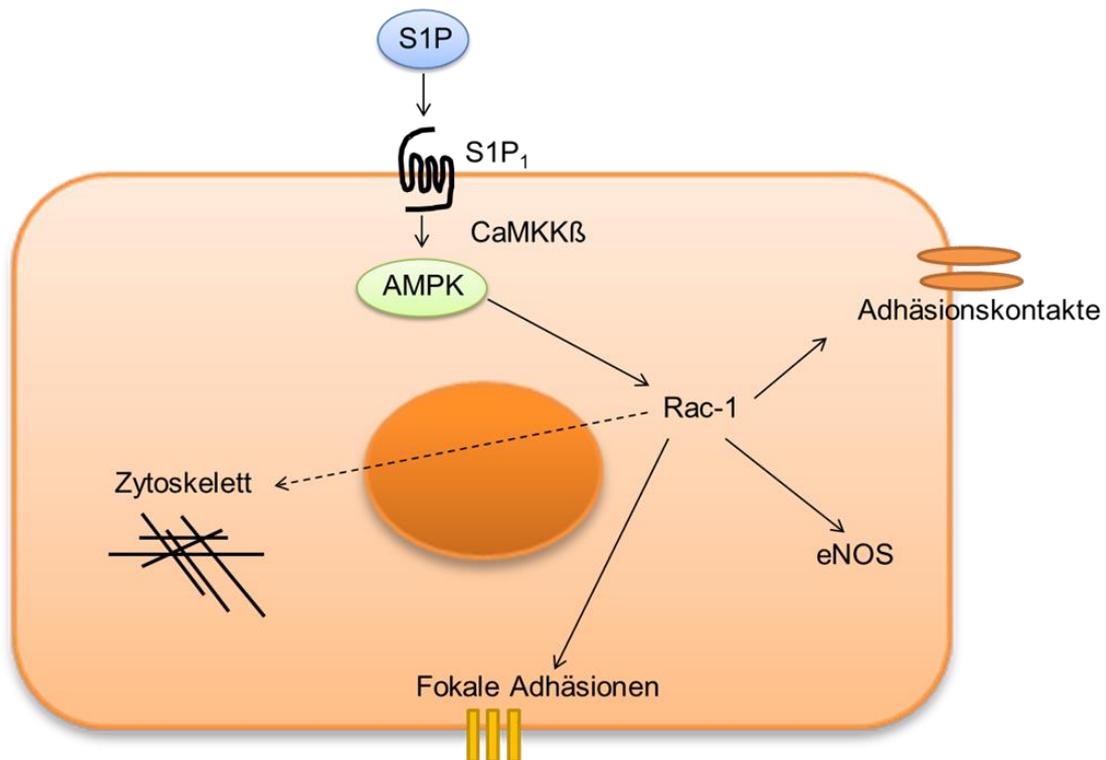


Abbildung 3: Darstellung eines möglichen S1P/AMPK-Signalwegs mit endothelstabilisierenden Mechanismen. S1P₁: S1P-Rezeptor 1, CaMKKβ: Kalzium/Kalmodulin-abhängige Proteinkinase Kinase 2, Rac-1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, eNOS: endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase.

4.5 *In-vivo*- und *In-vitro*-Beurteilung der endothelialen Barriere

Um pathophysiologische Prozesse sowie therapeutische Strategien zum Schutz der endothelialen Barriere zu testen, ist es nötig diese in experimentellen Situationen *in vivo* und *in vitro* sowie direkt im Patienten zu evaluieren. Bisher gibt es keine klinisch etablierte Methode, welche es ermöglicht, direkt die endotheliale Barriere im Patienten zu beurteilen. Klinisch können weitreichende Gewebsödeme sowie ein intravasaler Flüssigkeitsmangel auf eine Störung der endothelialen Barrierfunktion hinweisen (Ertmer und Rehberg 2016).

Experimentelle Studien untersuchen die Möglichkeit, die Mikrozirkulation über eine direkte Visualisierung mittels kleiner Mikroskope, beispielsweise in der lingualen Mukosa, zu evaluieren (De Backer *et al.* 2002). Die auf diese Weise in Patienten mit Sepsis detektierbaren Mikrozirkulationsstörungen könnten repräsentativ eine Dysfunktion des Endothels aufzeigen (De Backer *et al.* 2002). Weiterhin wurden als Surrogatparameter für eine Endothelschädigung Marker im Blut untersucht. So steigen u. a. der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) oder Syndecan-1, ein Marker für einen pathologischen

Glykokalyx-Abbau, in Zuständen, welche mit einer endothelialen Barriestörung einhergehen, signifikant an (Ince *et al.* 2016). Beim Sepsis-induzierten Lungenschaden wurden zudem im Blut zirkulierende Endothelzellen als Marker für einen Endothelschaden korrelierend zu der Krankheitsschwere beschrieben (Moussa *et al.* 2015). Ein standardisiertes Messverfahren könnte Patienten identifizieren, die eine Intervention zum Schutz der endothelialen Barriere benötigen und würde eine Beurteilung der Effektivität dieser Interventionen ermöglichen. Während es im Menschen keine fest etablierte Methode zum Quantifizieren der Barrierefunktion gibt, können in Versuchstieren mehrere Verfahren genutzt werden. Über die Ratio des trockenen (blutleeren) zum feuchten Gewicht von entnommenen Organen können Gewebsödeme detektiert werden, die auf einem Zusammenbruch der endothelialen Barriere beruhen (Jian *et al.* 2013). Weiterhin kann der Austritt von Albumin-gekoppelten Farbstoffen (beispielsweise Evan`s Blau) aus den Blutgefäßen in das Gewebe gemessen werden (Escobar *et al.* 2015). Die Elektronenmikroskopie erlaubt zudem eine direkte Visualisierung des Endothels und einer möglichen Spaltbildung in der Endothelbarriere (McDonald *et al.* 1999). Organe und sogar einzelne Blutgefäße können *ex vivo* oder *in situ* perfundiert und ein Zusammenbruch der endothelialen Barriere mit folgendem Anstieg der vaskulären Durchlässigkeit gezeigt werden (Jian *et al.* 2013, McDonald *et al.* 1999).

Um molekulare Zielstrukturen und Mechanismen möglicher endothel-schützender Moleküle zu untersuchen, ist es nötig, die endotheliale Barrierefunktion auch *in vitro* unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen. Zellkulturmethoden sind weniger aufwändig als Experimente mit Versuchstieren und ermöglichen darüber hinaus ein Hochdurchsatz-Screening möglicher Therapiestoffe (Bischoff *et al.* 2016). Mehrere Methoden können hierfür verwandt werden: Endothelzellen können auf durchlässigen, porösen Zellkultureinsätzen angezüchtet werden, welche die Zellkulturvertiefungen in eine obere und eine untere Kammer unterteilen. Fluoreszenz-markierte Moleküle wie Albumin oder Dextran werden dabei in die obere Kammer gegeben. Durch das photometrische Quantifizieren des Fluoreszenzsignals in der unteren Kammer kann die Durchlässigkeit der Endothelzellschicht bestimmt werden (Bischoff *et al.* 2016).

Eine weitere Methode ist das Messen der trans-endothelialen elektrischen Resistenz (TEER). Auch hier werden die Endothelzellen auf einem durchlässigen Zellkultureinsatz kultiviert und der elektrische Widerstand der endothelialen Barriere über Elektroden in der oberen und der unteren Zellkulturvertiefung bestimmt (Stolwijk *et al.* 2015).

Die neueste Methode quantifiziert die endotheliale Barrierefunktion über die Messung der elektrischen Impedanz der Endothelzellschicht. Dieses in dieser Arbeit genutzte, sogenannte *electric cell-substrate impedance sensing* (elektrische Zell-Substrat Impedanz Messung, ECIS) wurde erstmals 1991 durch Giaever und Keese beschrieben und basiert auf dem Kultivieren von Zellen auf kleinen gegenüberliegenden Goldelektroden (Giaever und Keese 1991). Diese Goldelektroden können den Widerstand der Zellschicht gegenüber elektrischen Wechselströmen messen und quantifizieren (näher beschrieben in Abschnitt 7.3). Weiterhin können strukturelle Veränderungen der Endothelzellschicht durch das Anfärben u. a. der Zell-Zell-Kontakte sowie des Aktin-Zytoskelettes mit Fluorescein-markierten Antikörpern direkt mikroskopisch visualisiert werden (Mehta *et al.* 2005, Garcia *et al.* 2001).

Störungen der endothelialen Barriere sind klinisch von höchster Relevanz. Die beschriebenen Methoden ermöglichen *in vitro* pathophysiologische Aspekte der Barrierestörung zu beleuchten und perspektivisch neue therapeutische Ansätze zur Verbesserung der Barrierefunktion des Endothels zu evaluieren.

5 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung der S1P/AMPK-Interaktion für den Schutz der Barriere des glomerulären Endothels unter inflammatorischen Bedingungen *in vitro* zu untersuchen. Dazu sollte in kultivierten murinen glomerulären Endothelzellen:

1. ein *In-vitro*-Modell mittels des ECIS-Systems etabliert werden, bei dem es zu einer Störung der endothelialen Barriere unter pro-inflammatorischen Bedingungen kommt,
2. der Einfluss des S1P-Analogons FTY720 auf die Störung der endothelialen Barriere in diesem Modell unter Verwendung des ECIS-Systems untersucht werden,
3. der Einfluss von FTY720 auf die S1P₁-Expression mittels FACS-Analyse evaluiert werden und
4. die S1P/AMPK-Interaktion mittels Proteinexpressionsanalysen nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen dieser Arbeit könnten Grundlagen für mögliche Therapieansätze zur Stabilisierung des glomerulären Endothels unter Inflammation liefern. Eine Stabilisierung der glomerulären Endothelbarriere könnte die Entstehung des akuten Nierenversagens in der Sepsis beeinflussen.

6 Material

6.1 Chemikalien und Reagenzien

Nachfolgend sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien aufgelistet (Tabelle 1).

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien.

Reagenz	Hersteller
Ampuwa [®] (Wasser für Injektionszwecke)	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycin, ≥ 99 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hanks' Balanced Salt solution (HBSS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
IGEPAL [®] CA-630 (NP-40)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol, ≥ 99,9 %, Blotting-Grade	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol, 99,8 % Analytical Grade	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Pierce [™] Detergent Compatible Bradford Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Quick Start [™] BSA Standard	Bio-Rad, München, Deutschland
SDS, ultra pure, ≥ 99,5 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS PUFFERAN [®] , ≥ 99,9 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS-Hydrochlorid, PUFFERAN [®] , ≥ 99,9 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TWEEN [®] 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Western C [™] Proteinstandard (Marker)	Bio-Rad, München, Deutschland

6.2 Zellkultur

Für die Zellkultur verwendeten Reagenzien sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Zellkulturreagenzien.

Reagenz	Hersteller
Biotase	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kollagen IV (murin)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
DMEM low glucose, pyruvat	Gibco, Schwerte, Deutschland
Fetales bovines Serum (FBS)	Gibco/Milipore, Schwerte/ Darmstadt, Deutschland
Fibronektin (human)	Biochrome GmbH, Berlin, Deutschland
Ham`s F12 Nutrient Mix	Gibco, Schwerte, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin	Milipore, Darmstadt, Deutschland
(10x) Trypsin (1:250)/EDTA-Lösung	Milipore/Biochrome, Schwerte/ Darmstadt, Deutschland

6.3 Stimulanzen

In der vorliegenden Arbeit wurden die in Tabelle 3 aufgelisteten Stimulanzen verwendet.

Tabelle 3: Stimulanzen.

Reagenz	Hersteller
AICAR	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
FTY720	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
IFN- γ	PeproTech, Inc., Hamburg, Deutschland
IL-1 β	PeproTech, Inc., Hamburg, Deutschland
IL-6	PeproTech, Inc., Hamburg, Deutschland
LPS (<i>E. coli</i> O111:B4)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
S1P	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TNF- α	PeproTech, Inc., Hamburg, Deutschland

6.4 Antikörper

Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper für FACS- und Immunoblot-Analysen sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 4: Primärantikörper für FACS und Immunoblot.

Antigen	Typ (IgG)	Verdünnung	Kat.-Nr.	Hersteller
AMPK α 1/2	Kaninchen, polyklonal	1:1000	2532	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
Phospho-AMPK α (Thr172)	Kaninchen, polyklonal	1:1000	2531	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
S1P ₁ -Rezeptor (EDG1)	Kaninchen, polyklonal	1:250	PA1-1040	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

Tabelle 5: Sekundärantikörper für FACS und Immunoblot.

Antigen	Typ (IgG)	Verdünnung	Kat.-Nr.	Hersteller
Anti-Kaninchen IgG (H+L)	Ziege, polyklonal, Alexa Fluor [®] 647- gekoppelt	1:1000	ab150079	Abcam, Cambridge, England
Anti-Kaninchen IgG (H+L)	Ziege, polyklonal, Peroxidase- gekoppelt	1:15000	2531	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA

6.5 Puffer und Stammlösungen

Tabelle 6 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Puffer und Stammlösungen zu entnehmen. Insofern nicht anders beschrieben, wurden alle Puffer mit *Aqua dest.* (Millipore, Darmstadt, Deutschland) hergestellt.

Tabelle 6: Puffer und Stammlösungen

Puffer/Stammlösung	Rezept
5 % BSA in 1x TBS-T	5 g BSA 100ml 1x TBS-T
FACS-Puffer	5 % FBS in PBS
Lysepuffer	1x Protease Inhibitor Cocktail Tablette gelöst in 7,9 ml <i>Aqua dest.</i> 1 ml NaCl 1,5 M 1 ml Tris/HCl 500 mM pH 8,8 100 µl IGEPAL® CA-630 2,1 mg NaF 1,8 mg Na ₃ VO ₄
SDS-Lade-(Laemmli)puffer	50 mM Tris-HCl 2 % SDS 10 % Glycerol 1 % β-Mercaptoethanol 12,5 mM EDTA 0,02 % Bromphenolblau
10x SDS-Laufpuffer	60 g Tris 288 g Glycin 20g SDS 2000 ml <i>Aqua dest.</i> pH 8,3
Strippingpuffer	100 ml 10 % SDS 31,25 ml Tris/HCl 0,5 M pH 6,8 337,5 ml Miliporewasser
10x TBS	48 g Tris-HCl 11,2 g Tris 176 g NaCl 2000 ml <i>Aqua dest.</i> pH 7,6
1x TBS-T	100 ml 10x TBS 900 ml <i>Aqua dest.</i> 1 g TWEEN® 20
Lyse-Waschpuffer	40 ml <i>Aqua dest.</i> 5 ml NaCl 1,5 M 5 ml Tris/HCl 500mM pH 8,8

6.6 Weitere Materialien und Geräte

Laborübliche Verbrauchsmaterialien, wie Pipetten, Pipettenspitzen, Reagenzgefäße und Handschuhe, wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Greiner Bio-One (Esslingen, Deutschland), Brand® (Wertheim, Deutschland) und B. Braun Melsungen (Melsungen, Deutschland) verwendet. Nachfolgend sind weitere verwendete Materialien (Tabelle 7), Geräte (Tabelle 8) und Programme zur Datenauswertung (Tabelle 9) gelistet.

Tabelle 7: Materialien.

Material	Hersteller
8W10E ECIS Cultureware™ Arrays	Ibidi GmbH, Gräfelfing, Deutschland
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad, München, Deutschland
Greiner Bio-One™ PP-Röhrchen (1,3 ml)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit	Bio-Rad, München, Deutschland
Trans-Blot® Turbo Mini- Size LF PVDF Membrane	Bio-Rad, München, Deutschland
Trans-Blot® Turbo RTA Transfer Kit	Bio-Rad, München, Deutschland

Tabelle 8: Geräte.

Gerät	Hersteller
Axiocam ERc 5s	Zeiss, Jena, Deutschland
BD Acurri™ C6 Plus	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
ChemiDoc™MP Imaging System	Bio-Rad, München, Deutschland
ECIS® Zθ System	Applied Biophysics Inc., Troy (NY), USA
HERAcell 240 (Brutschrank)	Heraeus, Hanau, Deutschland
HERAcell VIOS 250i CO2 Incubator (Brutschrank)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Mini-PROTEAN®Tetra System	Bio-Rad, München, Deutschland
Neubauer Improved Zählkammer	VWR International, Darmstadt, Deutschland
PowerPac™Basic	Bio-Rad, München, Deutschland
Primovert Mikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Trans-Blot®Turbo™Transfer System	Bio-Rad, München, Deutschland
Tecan-i-Reader	Tecan, Männerdorf, Schweiz
Zentrifuge 5430 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 9: Software/Programme.

Software/Programm	Hersteller
BD Acurri™ C6 Plus Software	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
ECIS® Software	Applied Biophysics Inc., Troy(NY), USA
GraphPad Prism 7.03	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Image Lab™ Software 6.0.1	Bio-Rad, München, Schwerte
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, USA

7 Methoden

7.1 Zellkultur

7.1.1 Murine glomeruläre Endothelzellen

In der vorliegenden Arbeit wurden konditional immortalisierte murine glomeruläre Endothelzellen (glomerular endothelial cells, GEnC, Abbildung 4), isoliert aus TsA58-Immorto-Mäusen, verwendet (Akis und Madaio 2004). Bei TsA58-Immorto-Mäusen ist das temperatursensitive Simian virus 40 large Tumor Antigen (ts-SV40 TAg) stabil in das Genom integriert (Jat *et al.* 1991). Das ts-SV40 TAg kann nach Isolation der Zellen unter temperaturabhängigen Konditionen aktiviert werden und blockiert Tumorsuppressorproteine, wie z. B. p53, welche den Zellzyklus kontrollieren. Dies führt zu einem unbeschränkten Wachstumspotential und erlaubt es, die Zellen über einen längeren Zeitraum zu kultivieren (Ahuja *et al.* 2005). Die Zellen wurden durch P. Madaio (Georgia, USA) isoliert, der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Uniklinikums Jena übergeben und mit Erlaubnis von Michael P. Madaio für die Experimente der vorliegenden Arbeit genutzt.

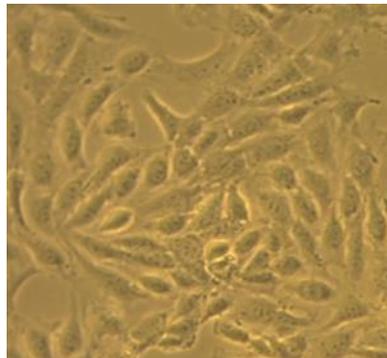


Abbildung 4: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme von GEnC (20 x Vergrößerung).

7.1.2 Kulturbedingungen

Die Zellen wurden in Dulbecco`s modified Eagles (DMEM) low glucose, pyruvat Medium mit 23 % Ham`s F-12 Nutrient Mix (Thermo Fisher Scientific), 1 % Penicillin 10.000 Einheiten/ml mit Streptomycin 10.000 µg/ml (Biochrom GmbH) sowie 10 % fetalem bovinem Serum (FBS, Biochrom GmbH, hitzeinaktiviert

1 min bei 56 °C) bei 37 °C und 5 % CO₂ in feuchter Umgebung kultiviert. Tabelle 10 gibt eine Übersicht über die genutzten Kulturgefäße, Zellzahlen und Volumina von Medium, Trypsin/EDTA (Biochrom GmbH) sowie Waschlösung (Hanks' Balanced Salt solution, HBSS, Biochrom GmbH). Alle genutzten Kulturgefäße bestanden aus Polysterol. Die Oberflächen wurden vom Hersteller so vorbehandelt, dass diese in Kontakt mit Kulturmedium eine hydrophile und negativ geladene Fläche bilden und eine Adhärenz der Zellen an die Oberfläche ermöglichen. Es wurde weiter geprüft ob diese Oberflächenbehandlung für das Wachstum der GEnC ausreichend ist oder eine zusätzliche Beschichtung nötig ist. Dazu wurden die Wachstumsbedingungen der Zellen mit und ohne zusätzliche Beschichtung bestehend aus Fibronectin und Kollagen IV verglichen. Da sich keine Unterschiede zwischen den Bedingungen beobachten ließen, wurde auf eine Beschichtung der Kulturgefäße verzichtet.

Tabelle 10: Zellkulturgefäße und genutzte Volumina. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Neubauer Improved Zählkammer (VWR International) am inversen Lichtmikroskop (Primovert, Zeiss).

Gefäß	Fläche	Zellzahl	Volumen Medium	Volumen HBSS	Trypsin/ EDTA
T175	175 cm ²	≥ 10 ⁶	25 ml	7 ml	5 ml
T75	75 cm ²	≥ 750.000	18 ml	5 ml	3 ml
T25	25 cm ²	≥ 50.000	6 ml	1 ml	1 ml
35 mm Dish	9,4 cm ²	50.000	2 ml	—	—
24-Well- Platte	1,8 cm ²	15.000/Well	1 ml	1 ml PBS	200 µl Biotase

7.1.3 Auftauen der Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde ein bei -160 °C gelagertes Aliquot in einem auf 37 °C erwärmten Wasserbad kurz angewärmt, bis sich das gefrorene Pellet von den Wänden des Kryovials löste. Anschließend wurde zügig der Inhalt des Aliquots in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen, in welchem 5 ml des Kulturmediums vorgelegt waren, dekantiert und 4 min bei 400 rcf und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Medium-Überstand im Zentrifugenröhrchen wurde abgesaugt

und das zurückgebliebene Zellpellet in 5 ml GEnC-Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in eine T75-Kulturflasche mit 13 ml vorgelegtem Medium überführt. Nach 24 h und erfolgreichem Absetzen und Anwachsen der Zellen wurde das komplette Medium gewechselt.

7.1.4 Passage der Zellen

Nach Erreichen einer Konfluenz von 70-80 % wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen kurz mit HBSS durch leichtes Schwenken gewaschen. Das HBSS wurde anschließend abgesaugt, durch Trypsin/EDTA-Lösung ersetzt und für 4 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch leichtes Klopfen auf den Flaschenboden abgelöst und deren Vereinzlung im Lichtmikroskop überprüft. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde Medium in die Kulturflasche gegeben, die Zellen darin resuspendiert und die gesamte Suspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen aus der so entstandenen Zellsuspension wurden nun in eine neue Kulturflasche ausgesät oder für die Versuche ausgezählt. Für die Versuche wurden Zellen der Passagen 5 bis 10 genutzt.

7.1.5 Kryokonservierung der Zellen

Zur Aufrechterhaltung der Zellkultur in geeigneten Passagen wurden regelmäßig Zellen kryokonserviert. Dazu wurden vorzugsweise Zellen einer niedrigen Passage genutzt. Für die Kryokonservierung wurden die Zellen wie oben beschrieben kurz mit HBSS gewaschen und nachfolgend mit Trypsin/EDTA abgelöst sowie durch Zugabe von Medium weiter vereinzelt. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt. Nach dem Abzentrifugieren (s. o.) wurden das entstandene Zellpellet in Einfriermedium bestehend aus 70 % DMEM mit Ham's F12 Nutrient Mix, 20 % FBS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Carl Roth) resuspendiert. DMSO verhindert die Schädigung der Zellen durch Eiskristallbildung während des Einfrierprozesses. Die im Einfriermedium resuspendierten Zellen wurden dann zügig in der gewünschten Zellzahl in Kryoröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen in einem mit

Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter (Thermo Fisher Scientific) mit einer Geschwindigkeit von -1 °C/min langsam bei -80 °C schonend eingefroren und nachfolgend bei -160 °C in flüssigem Stickstoff gelagert.

7.2 Inflammatorischer Stimulus

Um eine durch Inflammation verursachte Barrierestörung zu simulieren, wurde eine Mischung aus den proinflammatorischen Zytokinen Tumornekrosefaktor- α (TNF- α , PeproTech, Inc.), Interleukin-1 β (IL-1 β , PeproTech, Inc.), Interferon- γ (IFN- γ , PeproTech, Inc.), Interleukin-6 (IL-6, PeproTech, Inc.) sowie dem Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS, Sigma-Aldrich) verwendet (Tabelle 11, (Dennhardt und Finke *et al.* 2020)).

Tabelle 11: Zusammensetzung des inflammatorischen Stimulus (LPS+Cyt). (Übereinstimmend mit dem Corrigendum nach Dennhardt und Finke *et al.* 2020.)

Bestandteil	Herkunft/Spezies	Lösungsmittel	Konzentration
LPS	<i>Escherichia coli</i> O111:B4	PBS, DMEM	10 ng/ml
TNF- α	Human	Ampuwa [®]	5 μ g/ml
IL-1 β	Human	PBS + 0,1 % BSA	1 μ g/ml
IFN- γ	Human	PBS + 0,1 % BSA	1 μ g/ml
IL-6	Human	PBS + 0,1 % BSA	1 μ g/ml
DMEM + 1 % BSA	Bovin	—	—

Die hergestellte Stocklösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Der inflammatorische Stimulus wurde für die Versuche in den Verdünnungen 1:100, 1:400 und 1:1000 genutzt.

7.3 Elektrische Impedanz-Messung der endothelialen Barriere

Um Veränderungen der endothelialen Barriere zu messen, wurde das ECIS[®] Z θ System (Applied Biophysics Inc.) verwendet. In diesem System werden die Zellen auf kleinen, gegenüberliegenden Goldelektroden kultiviert, welche den elektrischen Wechselstromwiderstand eines Zellmonolayers messen und quantifizieren können (Giaever und Keese 1991). Basis für diese Messungen ist der Fluss der im Medium enthaltenen Ionen, welche die Zellen umgeben. Dieser Ionenfluss ist Träger für durch die Elektroden produzierte, elektrische Wechselströme. Durch Variation der Frequenz dieser elektrischen Wechselströme lassen sich unterschiedliche Qualitäten der Zellschicht bestimmen (Bischoff *et al.* 2016).

Bei elektrischen Wechselströmen hoher Frequenz (64.000 Hz) agieren die auf der Elektrode wachsenden Zellen mit ihren Membranen wie nichtleitende (dielektrische) Teilchen. Zusammen mit den im Medium enthaltenen Ionen wirken die Zellen wie ein elektrischer Kondensator. Mit fortschreitendem Ausbreiten und Wachstum der Zellen auf der Elektrode steigt der Wechselstromwiderstand dieses Kondensators. Der daraus entstehende Parameter Kapazität (Einheit Nanofarad, nF) wird durch die Zellmembrankomponente der Zellschicht beeinflusst und sinkt (Abbildung 5). Dies gibt Auskunft über das Festsetzen und Ausbreiten der Zellen nach Aussaat sowie deren Proliferation, Migration und Zelltod. Je niedriger die Kapazität ist, umso dichter wächst der Monolayer. Wird ein Plateau erreicht, zeigt dieses die maximal erreichbare Wachstumsdichte. Steigt nachfolgend die Kapazität, bedeutet dies, dass die Zellen beginnen abzusterben und sich abzulösen (Stolwijk *et al.* 2015).

Elektrische Wechselströme niedriger Frequenz (4000 Hz) fließen im Vergleich zu elektrischen Wechselströmen hoher Frequenz eher durch den Weg mit geringerem Widerstand zwischen den Zellen (interzellulär) und werden maßgeblich durch Ausprägung der Zell-Zell-Kontakte wie den Adhäsionskontakten und der Zonula Occludens beeinflusst, die als elektrischer Resistor wirken. Über diese Wechselströme niedriger Frequenz lassen sich mit dem Parameter Resistenz (Einheit Ohm, Ω), Veränderungen der endothelialen Barrierefunktion charakterisieren. Steigt die Resistenz, bedeutet dies, dass sich

eine Barriere ausbildet oder verstärkt. Sinkt die Resistenz, liegt eine Schädigung der Barriere vor (Stolwijk *et al.* 2015).

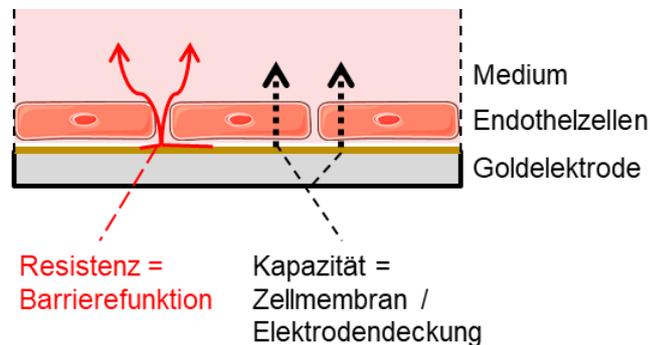


Abbildung 5: Schematische Darstellung der ECIS-Elektrode mit Endothelzellen. Elektrische Wechselströme hoher Frequenz (---) werden durch Zellmembranen beeinflusst und geben den Parameter Kapazität. Wechselströme niedriger Frequenz (---) nehmen den interzellulären Weg zwischen den Zellen und werden durch die Barrierefunktion der Endothelschicht beeinflusst.

Für die Versuche wurden 8W10E ECIS Cultureware™ Arrays (ibidi GmbH) verwendet. Ein Array besteht aus 8 Vertiefungen mit einer Bodenfläche von jeweils 0,8 cm², auf denen zehn runde, 250 µm große Goldelektroden sowie eine Gegenelektrode angebracht sind. Diese decken nach Herstellerangaben ~500-1000 Zellen eines dicht gewachsenen Zellmonolayers ab.

7.3.1 Zellinokulation

Vor Aussaat der Zellen in die Vertiefungen des Arrays wurden diese beschichtet. Dazu wurden die Vertiefungen mit 200 µl einer Mischung aus humanem Fibronectin (1 mg/ml, Biochrom GmbH) und murinem Kollagen IV (640 µg/ml, BD Biosciences) in PBS inkubiert. Nach 30 min wurde die Beschichtungslösung abgesaugt, die Vertiefungen kurz mit 200 µl Kulturmedium gespült und anschließend 400 µl Kulturmedium hineingegeben. Nach Befestigung der Arrays in der im Inkubator platzierten Arrayhalterung wurden über die Stabilisierungsfunktion des ECIS®-Systems die Elektroden gereinigt. Die Messung wurde unter der Einstellung „Multiple frequencies“ begonnen.

Nach Messung einer stabilen Grundlinie für 1 bis 2 h mit Kulturmedium, wurde die Messung pausiert und Zellen in die Vertiefungen des Arrays ausgesät. Für die Versuche wurden Zellzahlen von 10.000 Zellen pro Vertiefung in 400 µl

Medium verwendet. Nach Inokulation der Zellen wurde der Array für 20 min unter einer Sterilbank inkubiert, um ein erstes Absetzen der Zellen zu ermöglichen. Danach wurde der Array zurück in die Arrayhalterung platziert und die Messung fortgesetzt.

Nach jeweils 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Dafür wurde die Messung pausiert, die Arrays entnommen und in jeder Vertiefung vorsichtig 200 µl Medium abgenommen und durch 200 µl frisches, vorgewärmtes Kulturmedium ersetzt.

7.3.2 Proinflammatorische Stimulation

Nach Erreichen einer stabilen Barriere wurde die Messung pausiert, 200 µl Medium aus allen Vertiefungen des Arrays abgenommen und durch Medium mit Stimulanzen ersetzt. Der inflammatorische Stimulus wurde in den oben beschriebenen Verdünnungen eingesetzt (Abschnitt 7.2). LPS+Cyt, FTY720 (gelöst in DMSO) wurden dem Medium zugeführt und DMSO in den Experimenten als Vehikelkontrolle genutzt. In jedem Versuch wurde eine Vertiefung des Arrays nur mit Medium gefüllt. Diese Mediumkontrolle wurde zur Bestimmung der Hintergrundresistenz des Mediums verwendet. Weiterhin wurde in jedem Versuch eine Vertiefung als Zellkontrolle mitgeführt, in welchem den Zellen nur Kulturmedium ohne Stimulanzen zugeführt wurde. Für die Stimulationen wurden mindestens zwei Vertiefungen pro Inkubationsansatz genutzt.

7.3.1 Auswertung der ECIS-Daten

Die Rohdaten der ECIS-Messungen wurden mittels Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation) und GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Software, Inc.) bearbeitet, statistisch ausgewertet und dargestellt. Es wurden die Mittelwerte aus den Werten der Vertiefungen mit gleichem Inkubationsansatz gebildet. Von diesen Mittelwerten wurde der Wert der Mediumkontrolle abgezogen um die Hintergrundresistenz des Mediums aus der Auswertung auszuschließen. Für die statistische Auswertung der ECIS-Versuche wurde eine zweiseitige ANOVA mit Messwiederholung und P-Wert-Korrektur nach Holm-Sidak genutzt. Die

Werte der stimulierten Wells wurden für jeden Zeitpunkt auf signifikante Unterschiede zum korrelierenden Zeitpunkt der Zellkontrolle oder Vehikelkontrolle überprüft. Daten aus den ECIS-Versuchen sind als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Die Anzahl von unabhängigen Versuchen wird als n dargestellt.

7.4 Analyse der S1P₁-Rezeptorexpression

Die Analyse der S1P₁-Rezeptorexpression erfolgte mittels Durchflusszytometrie (*fluorescent activated cell scanning*, FACS). Bei dieser Methode werden einzelne Zellen an einem konzentrierten Laserstrahl vorbeigeführt und das von ihnen emittierte Streu- sowie Fluoreszenzlicht gemessen und quantifiziert. Das durch die Zellen verursachte Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) gibt Auskunft über die Größe, während über das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) Rückschluss über die Komplexität der Zelle gezogen werden kann. Weiterhin können Oberflächenproteine durch eine Färbung mit Fluoresceinmarkierten Antikörpern nachgewiesen werden.

GenC wurden 25 h vor der FACS-Analyse auf einer 24-Well-Platte in einer Konzentration von 15.000 Zellen/Vertiefung in 1 ml Gesamtvolumen ausgesät. Nach einer min wurde in einem Teil der Vertiefungen der 24-Well-Platte 1 μ M FTY720 (in DMSO) zugeführt.

24 h nach der Stimulation mit FTY720 wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und durch Inkubation mit 200 μ l Biotase über 6 min bei 37 °C abgelöst, die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Medium gestoppt und die entstandenen Zellsuspensionen in Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden anschließend 5 min bei 12.000 rcf zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in FACS-Puffer (PBS + 5 % FBS) resuspendiert. Die Suspensionen wurden in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte mit V-Boden überführt, zentrifugiert und mit FACS-Puffer gewaschen. Darauf folgend wurde in die Vertiefungen der 96-Well-Platte 50 μ l FACS-Puffer (ungefärbte Kontrolle) oder 50 μ l S1P₁-Primärantikörperlösung in FACS-Puffer (Tabelle 4) gegeben und die Zellen für eine min bei 4 °C inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit FACS-Puffer wurden die Zellpellets in 50 μ l *goat anti-rabbit* IgG H&L Sekundärantikörperlösung mit Fluoreszenzmarkierung (Tabelle 5 in FACS-

Puffer) resuspendiert und 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit FACS-Puffer wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer mit 1 mM EDTA resuspendiert. Aus jeder Vertiefung wurden zweimal 100 µl in zwei Reaktionsgefäße überführt. In die eine Hälfte der Tubes wurde 5 µl Propidiumiodid (PI) hinzugefügt, welches die Membranen toter Zellen durchdringen kann und mit der DNA interkaliert. Durch diese PI-Färbung kann man die nicht-lebenden Zellen von der Messung ausschließen. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte mit dem BD Acurri™ C6 Plus und die Analyse mit der BD Acurri™ C6 Plus Software (BD Biosciences). Es wurden pro Inkubationsansatz jeweils 10.000 Zellen gemessen. Über den Vorwärtsstreulichtbereich (FSC-A (*area*)) und Seitwärtsstreulichtbereich (SSC-A) wurde die Zellpopulation ausgewählt. Im nächsten Schritt wurden zusammenhängende Zellenpaare (*Doublets*) über den Bereich und die Höhe des Vorwärtsstreulichts (FSC-A und FSC-H (*height*)) von der Messung ausgeschlossen. PI-markierte Zellen wurden im PerCP-Kanal (Peridinin-Chlorophyll-Protein) ausgewählt und von der Messung ausgeschlossen. Das Alexa Fluor 647-Signal des Sekundärantikörpers wurde über den APC-Kanal (Allophycocyanin) detektiert.

7.5 Stimulation von GEnC mit S1P

Um die Auswirkungen von S1P auf den Phosphorylierungsstatus der AMPK und den Zeitpunkt dieser Interaktion zu untersuchen, wurden die GEnC für unterschiedliche Zeitperioden mit S1P stimuliert.

7.5.1 Kultivierungsbedingungen

Die GEnC wurden 48 h vor Stimulation auf 35 mm Kulturschalen ausgesät. Genutzt wurden Zellzahlen von 50.000 Zellen pro Schale in 2 ml Medium. Nach 24 h wurde 1 ml des Mediums durch frisches Kulturmedium ersetzt. Am folgenden Tag wurde 4 h vor Stimulationsbeginn das Kulturmedium abgesaugt und durch 2 ml serumfreies Kulturmedium ersetzt.

Nach Ablauf der 4 h wurden die Kulturschalen aus dem Brutschrank auf eine 37 °C-Wärmeplatte überführt und für 30 min mit 2 mM AICAR (gelöst in

Ampuwa[®]) sowie für 0,5, 1, 2, 5, 10, 15 und 30 min mit 1 μ M S1P (In Stocklösung gelöst in 99,8 % Methanol Analytical grade) oder dem gleichen Volumen Methanol 99,8 % Analytical Grade (Vehikelkontrolle) inkubiert. Eine Kulturschale wurde immer unstimuliert belassen. AICAR phosphoryliert AMPK und wurde bei jedem Stimulationsversuch als Positivkontrolle der AMPK-Aktivierung mitgeführt.

Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Kulturschalen auf Eis zwei Mal mit 2 ml Lyse-Waschpuffer gewaschen und zur Proteinlyse mit jeweils 80 μ l Lysepuffer 15 min unter gelegentlichem Schwenken inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgetragen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Reaktionsgefäße wurden 7 min bei 900 rcf und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden bis zur Proteinbestimmung und dem Immunoblotting bei -20 °C gelagert.

7.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zellysate erfolgte nach Bradford. Im Bradford-Assay wird ein Comassie-Brilliant-Blau-Farbstoff verwendet, der nach Bindung an Proteine einen Farbumschlag durchläuft. Im Vergleich zu einem BSA-Proteinstandard kann der Proteingehalt der Proben sensitiv bestimmt werden (Bradford 1976).

Der Quick Start[™] BSA Standard (Bio-Rad) und das Pierce[™] Detergent Compatible Bradford Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) wurden entsprechend der Herstellerangaben genutzt und die Proben 1:10 mit Lysepuffer verdünnt. Die kolorimetrische Auswertung erfolgte mit einem Tecan-i-Reader (Tecan) über die Messung der Absorbanz (Wellenlänge 595 nm). Der Proteingehalt wurde mit Hilfe der Standardkurve über Excel berechnet.

7.5.3 Untersuchung der AMPK-Aktivität mittels Immunoblotting

Beim Immunoblotting werden Proteine erst der Größe nach in einem Polacrylamid-Gel über Elektrophorese aufgetrennt. Die Proteine werden daraufhin durch Anlage eines elektrischen Feldes aus dem Gel auf eine

Membran übertragen (Western Blot). Diese Membran kann mit Primärantikörpern, spezifisch für gewisse Epitope an Proteinen, inkubiert werden. Ein Sekundärantikörper bindet anschließend an den ersten Antikörper und bildet ein Immunkonjugat. An den Sekundärantikörper ist das Enzym Merrettichperoxidase (engl. Horse radish peroxidase, HRP) gekoppelt, welches nach Zugabe eines Substrates über eine chemiluminisente Reaktion ein detektierbares Signal erzeugt.

Aufbereitung der Proben

Die Zelllysate wurden mit SDS-Ladepuffer in einem Verhältnis von 4:1 auf Eis gemischt, 5 min bei 95 °C erhitzt und danach kurz zentrifugiert. Die hergestellten Proben wurden bei -20 °C gelagert oder direkt verwendet.

Auftrennung der Proteinlysate mittels Gelelektrophorese

Genutzt wurden Gele (TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit Gele, 10 %, Bio-Rad) mit einem 10-Well-Kammeinsatz. Diese wurden nach Herstelleranleitung gegossen und bei 4 °C feucht gelagert. Die Stain-Free-Technologie der Gele erlaubt ein direktes Visualisieren der Proteine im Gel sowie später in der Membran ohne zusätzliche Färbung. Ermöglicht wird dies durch Trihalogenverbindungen in den Gelen, welche Tryptophanreste von Proteinen binden. In einer UV-induzierten Reaktion entsteht dann ein fluoreszentes Signal, welches durch einen Belichter detektiert werden kann (Colella *et al.* 2012).

Die Gele wurden in die Laufkammern (Mini-PROTEAN®Tetra-System, Bio-Rad) eingespannt und die Kammern bis zu den vorgegebenen Linien mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt. Nach dem Spülen der Geltaschen mit 1x SDS-Laufpuffer wurden diese mit je 20 µg Protein und einem Marker (Western C™, Bio-Rad) beladen.

Das Gel wurde erst 10 min bei konstanten 50 V (pro Gel) und folgend bei konstanten 20 mA (pro Gel) laufen gelassen, bis die Lauffront unten aus dem Gel heraustrat. Das erfolgreiche Auftrennen der Proben wurde im Bildwandler (ChemiDoc™MP Imaging System, Bio-Rad) über die Stain-Free-Einstellung überprüft.

Für den Transfer des Proteins vom Gel auf die Membran (Blot) wurde das Trans-Blot® Turbo RTA Transfer Kit (Bio-Rad) und Transfermembranen mit niedriger Fluoreszenz (Trans-Blot® Turbo Mini Size LF PVDF Membran, Bio-Rad) genutzt. Die Vorbereitung von Transferpuffer, Membran und Transferpapier erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Mit Hilfe des Trans-Blot® Turbo™ Transfer Systems (Bio-Rad) wurden die Proteine vom Gel auf die Membran übertragen. Zur Kontrolle eines erfolgreichen Transfers der Proteine aus dem Gel wurde erneut eine Stain-Free-Aufnahme des Gels angefertigt.

Im Anschluss an den Transfer wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation mit 5 % BSA in 1x TBS-T über eine min blockiert. Überschüssiges BSA wurde durch Waschen mit 1x TBS-T (3x kurz, 5x 5 min) entfernt. Nach diesem Waschschrift wurden die Membranen in die vorbereiteten Primärantikörperlösungen überführt und über Nacht auf einem Rollschüttler bei 4 °C inkubiert. Alle Primärantikörper (Tabelle 4) wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen in 10 ml gefilterten 5 % BSA in 1x TBS-T gelöst und bei 4 °C gelagert.

Am folgenden Tag wurde überschüssige Primärantikörperlösung wie zuvor beschrieben mit 1x TBS-T gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde ein HRP-gekoppelter Goat Anti-Rabbit (Tabelle 5), verdünnt 1:15.000 in 20 ml gefilterten 5 % BSA in 1x TBS-T, genutzt. Die Membran wurde in dieser Antikörperlösung eine min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (s. o.) mit 1x TBS-T wurde 750 µl eines nach Herstellerangaben gemischten Clarity™ Western ECL (Enhanced Chemilumineszenz) Substrates gleichmäßig auf die Membran gegeben. Nach 3 min Inkubation der Membran im Dunkeln wurde überschüssiges Substrat abgestrichen und das Signal mit der Einstellung „Chemi Hi Resolution“ und Autoexposition visualisiert.

Membran Stripping

Um die entwickelte Membran erneut mit einem anderen Primärantikörper zu inkubieren, müssen erst die vorherigen Primär- und Sekundärantikörper von der Membran entfernt werden. Diese Technik wird als „Membrane stripping“ bezeichnet. Genutzt wurde ein Puffer mit 2-Mercaptoethanol, welches die

Disulfidbrücken der Antikörper spaltet. 20 ml des Strippingpuffers wurden 160 µl 2-Mercaptoethanol hinzugefügt, die Membran in den auf 50 °C vorgewärmten Puffer gegeben und 15 min bei 50 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Pufferlösung wurde verworfen und die Membran mit *Aqua dest.* mehrmals abgespült. Nach diesem Schritt wurde die Membran wie oben beschrieben mit 1x TBS-T gewaschen.

Um den phosphorylierten Anteil der gesamten AMPK α -Untereinheit zu untersuchen, wurde die Membran zuerst mit dem Phospho-AMPK α (Thr172) Primärantikörper (Tabelle 4) inkubiert. Um eine erneute Nutzung der Membran zu ermöglichen, wurden die Antikörper durch Stripping entfernt und die Membran mit dem AMPK α 1/2 Antikörper (Tabelle 4) inkubiert und entwickelt. Die Immunoblots wurden mittels Image Lab™ 6.0.1 (Bio Rad) ausgewertet. Die Signale der phospho-AMPK wurden durch die der AMPK dividiert, um den Anteil der phosphorylierten AMPK an der Gesamt-AMPK darzustellen. Alle Werte wurden durch den Wert der unstimulierten Kontrolle dividiert und in GraphPad Prism 7.03 zur grafischen Darstellung importiert.

7.6 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 7.03. Die ECIS-Versuche wurden wie in 7.3.1 beschrieben ausgewertet. Für die S1P-Stimulationsversuche wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet und die Stimulationszeitpunkte gegen die unstimulierte Kontrolle verglichen. Daten sind als MW \pm SD dargestellt. Die Anzahl von unabhängigen Versuchen wird als n dargestellt.

8 Ergebnisse

8.1 Charakterisierung der endothelialen Barriere von GEnC

Zunächst wurde die Ausbildung der endothelialen Barriere von GEnC mit Hilfe des ECIS-Systems zur Identifikation des idealen Zeitpunkts der Zellstimulation in nachfolgenden Versuchen charakterisiert. Vorversuche ergaben eine optimale Zellzahl von 10.000 Zellen/Vertiefung im ECIS-Array.

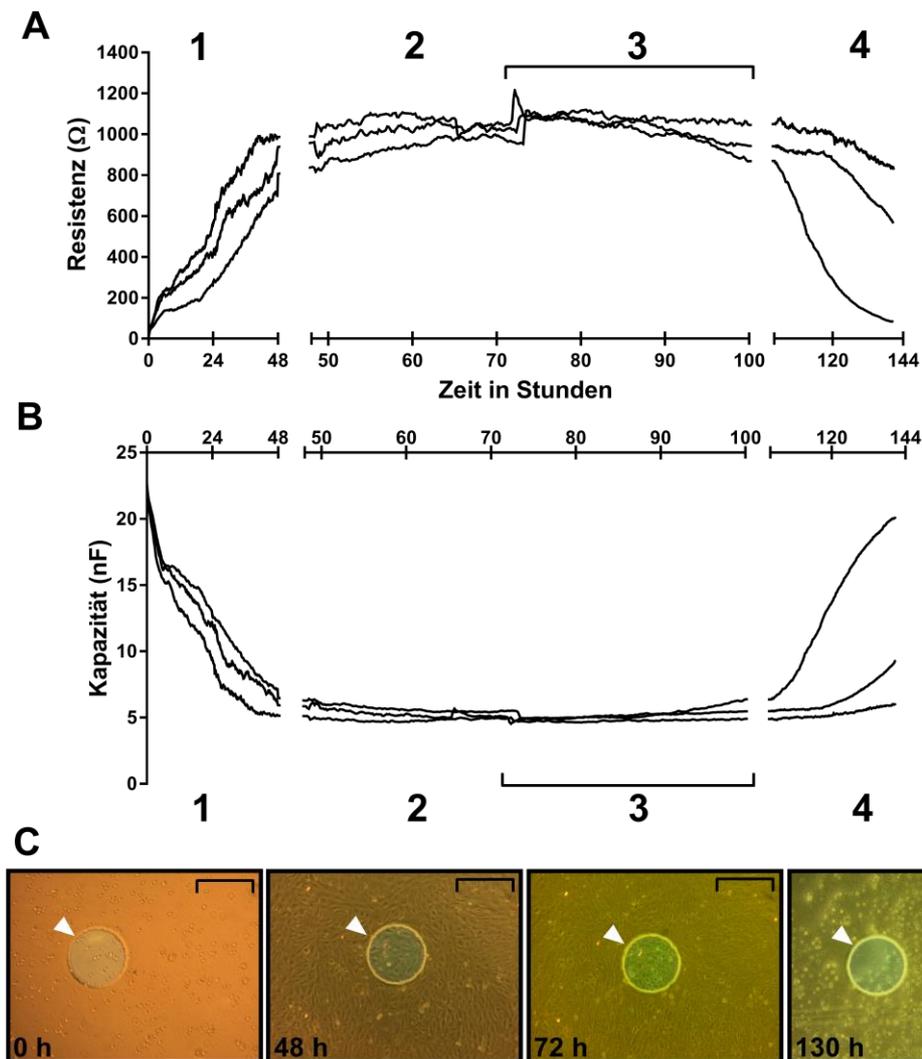


Abbildung 6: Wachstum der GEnC im ECIS. Elektrische Resistenz (A) und Kapazität (B) der GEnC aus drei unabhängigen Messungen zeigen folgende Wachstumsphasen: 1) Adhärenz und Proliferation, 2) Ausbildung der maximalen Barriere/Resistenz ($\sim 1000 \Omega$) und Kapazität ($\sim 5 \text{ nF}$), 3) Stimulationszeitraum, 4) Beginn des Ablösens/Absterbens der Zellen. C) Lichtmikroskopische Aufnahmen nach 0, 48, 72 und 130 h zeigen das Wachstum der GEnC auf einer Goldelektrode (weißer Pfeil) des ECIS-Systems (Maßstabsbalken = $250 \mu\text{m}$).

Das Wachstum der Zellen wurde mit Hilfe der Parameter Resistenz (Ω) und Kapazität (nF) analysiert. Anhand dieser Parameter lässt sich das Wachstum der GEnC in 4 Phasen unterteilen (Abbildung 6A, B). Die erste Phase zeigte innerhalb der ersten 48 h nach Aussaat der Zellen einen kontinuierlichen Anstieg der Resistenz (Abbildung 6A) bei gleichzeitigem Abfall der Kapazität (Abbildung 6B). Dies stellt die Adhärenz und Proliferation der Zellen dar, welches auch lichtmikroskopisch beobachtet werden konnte (Abbildung 6C). Nach 48 h hatte sich bereits ein konfluenter Zellmonolayer ausgebildet, der die Elektrode des ECIS-Arrays fast vollständig bedeckte. Phase 2 zeigt die darauf folgenden 24 h, in denen der Zellmonolayer die maximale Konfluenz erreichte und eine vollständige Barriere ausbildete. Dies zeigte sich durch ein beginnendes Plateau der Resistenzkurve bei $\sim 1000 \Omega$ (Abbildung 6A) sowie für die Konfluenz in einem Plateau der Kapazität bei $\sim 5 \text{ nF}$ (Abbildung 6B). Dementsprechend zeigte die lichtmikroskopische Aufnahme zum Ende der Phase 2 bei 72 h die Konfluenz des Zellmonolayers. Da sich am Ende der Phase 2 eine stabile Barriere ausgebildet hatte, wurde der Zeitraum ab 72 h nach Zellinokulation als Stimulationszeitraum für die weiteren Versuche festgelegt (Phase 3). Bis zur Stimulation wurde alle 24 h ein Mediumwechsel durchgeführt, wodurch Artefakte in den Messwerten entstanden. Um dieses zu vermeiden, wurde nach 72 h kein erneuter Mediumwechsel vorgenommen. Der kurzzeitige Anstieg der Resistenz in den Kurven bei 72 h ließ sich auf den letzten Mediumwechsel zurückführen (Abbildung 6A). Nach dem letzten Mediumwechsel blieb die Barrierefunktion stabil, begann jedoch in einem Teil der Messungen ab $\sim 100 \text{ h}$ leicht abzufallen. Daher wurde der Beobachtungszeitraum nach Stimulation für folgende Versuche auf 24 h beschränkt. Die darauf folgende Phase 4 zeigte einen Abfall der Resistenz (Abbildung 6A) sowie einen Anstieg der Kapazität (Abbildung 6B) unterschiedlicher Geschwindigkeit, was den langsam beginnenden Zelltod und das Ablösen der Zellen darstellte (Abbildung 6C).

Die Kurven der drei unabhängigen Messungen mit unterschiedlichen Zellpassagen (Abbildung 6A, B) zeigten eine gute Reproduzierbarkeit. Zellen der höheren Passage (8) zeigten ein schlechteres Überleben und einen früheren Resistenzverlust, weshalb in den weiteren Versuchen Zellen niedrigerer Passagen genutzt wurden.

8.2 Einfluss des inflammatorischen Stimulus auf die endotheliale Barriere

Eine durch Inflammation induzierte Barriestörung des Endothels ist ein zentraler Pathomechanismus bei einem durch eine Sepsis ausgelösten Organversagen (Ince *et al.* 2016). Zur Simulation einer solchen Barriestörung *in vitro* wurde ein inflammatorischer Stimulus (LPS+Cyt), bestehend aus den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ sowie LPS, etabliert (Konzentrationen siehe Abschnitt 7.2). Um die Auswirkung des inflammatorischen Stimulus in unterschiedlichen Konzentrationen auf das glomeruläre Endothel zu untersuchen, wurden die in Vorversuchen (siehe Abbildung 6) im ECIS-System getesteten GEnC mit dem Stimulus behandelt. Konfluent gewachsene GEnC (Beginn Phase 3, Abbildung 6A, B) wurden mit LPS+Cyt in den Verdünnungen 1:100, 1:400, 1:1000 stimuliert und die Resistenz (Ω) sowie die Kapazität (nF) kontinuierlich gemessen.

In Abbildung 7 wird die Resistenz (Ω) der GEnC über einen Zeitraum von 24 h nach Stimulation mit LPS+Cyt-Verdünnungen dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3–4 unabhängigen Messungen mit Duplikaten für jede LPS+Cyt-Verdünnung. Bei allen genutzten LPS+Cyt-Konzentrationen zeigte sich ein signifikanter Abfall der Resistenz im Vergleich zur Zellkontrolle. Dem Abfall bei LPS+Cyt 1:400 und 1:1000 ging ein leichter, nicht signifikanter Anstieg der Resistenz über Zellkontrollniveau voraus. Die Resistenzen blieben bei allen LPS+Cyt-Verdünnungen nach dem Abfall bis zum Ende des Beobachtungszeitraums unter der Kurve der Zellkontrolle. Die LPS+Cyt-Verdünnungen unterschieden sich im Beginn des signifikanten Resistenzabfalls. Zuerst trat dieser bei der LPS+Cyt-Verdünnung 1:100 und ~9,6 h nach Stimulation ein. Darauf folgend trat bei der LPS+Cyt-Verdünnung 1:400 die signifikante Barriestörung nach ~11,5 h ein. Bei der LPS+Cyt-Verdünnung 1:1000 trat die Barriestörung als letztes nach ~14,6 h nach Stimulation ein (* $p < 0,05$, zweiseitige ANOVA mit Messwiederholung und P-Wert-Korrektur nach Holm-Sidak).

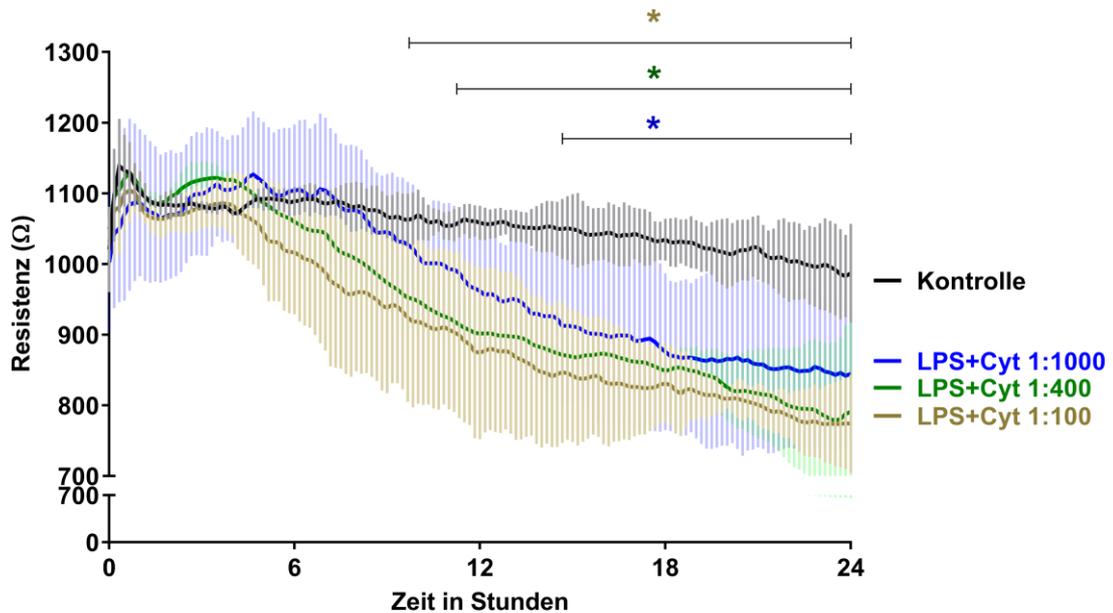


Abbildung 7: Einfluss eines inflammatorischen Stimulus auf die endotheliale Barriere. Gezeigt wird die elektrische Resistenz in Ohm (Ω) der GEnC-Endothelzellschicht 24 h nach Stimulation mit inflammatorischen Stimulus (LPS+Cyt: TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ , LPS) in den angegebenen Verdünnungen. Die LPS+Cyt-Verdünnungen induzieren einen signifikanten, konzentrationsabhängigen und zeitlich versetzten Resistenzabfall. Daten sind angegeben als MW \pm SD für $n=3-4$ Messungen in Duplikaten, * $p < 0,05$ vs. Zellkontrolle (zweiseitige ANOVA mit Messwiederholung und P-Wert-Korrektur nach Holm-Sidak) (Dennhardt und Finke *et al.* 2019).

Parallel zur Resistenz wurde die Kapazität (nF) der Endothelzellschicht gemessen. Die Kapazität gibt Auskunft über die Konfluenz/Integrität der Zellschicht und würde bei einem Ablösen der Zellen oder morphologischen Veränderungen, beispielsweise durch Zellkontraktion, ansteigen. Abbildung 8 zeigt die Kapazitätskurve für den Beobachtungszeitraum nach der vorher beschriebenen Stimulation mit den LPS+Cyt-Verdünnungen. Gezeigt sind die MW \pm SD aus 3-4 Messungen in Duplikaten. Die ersten ~5 h nach Stimulation blieben alle LPS+Cyt-Kurven auf Niveau der Zellkontrollkurve und so der maximalen Konfluenz bei ~5 nF. Nach ~5 h stieg die Kapazität in den mit LPS+Cyt-stimulierten Zellschichten leicht kontinuierlich an. Es zeigte sich bei allen LPS+Cyt-Verdünnungen ein signifikanter Anstieg der Kapazität gegenüber der Zellkontrolle. Wie bei der Resistenz war der zeitliche Verlauf des Kapazitätsanstieges abhängig von der LPS+Cyt-Verdünnung. Zuerst trat ein signifikanter Kapazitätsanstieg beim LPS+Cyt 1:100 und ~10,4 h ein, gefolgt vom LPS+Cyt 1:400 bei ~11,2 h und dem LPS+Cyt 1:1000 bei ~12,6 h (* $p <$

0,05 vs. Zellkontrolle, zweiseitige ANOVA mit Messwiederholung und P-Wert-Korrektur nach Holm-Sidak).

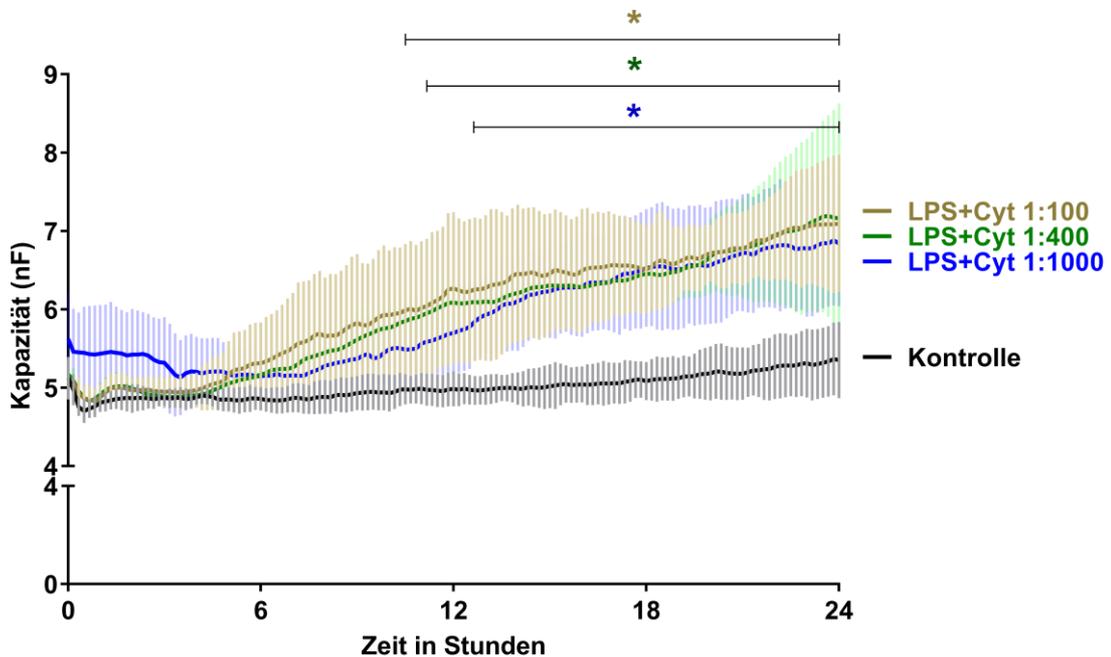


Abbildung 8: Einfluss eines inflammatorischen Stimulus auf die Konfluenz der Zellschicht. Die Kapazität (nF) der Endothelzellschicht 24 h nach Stimulation mit inflammatorischen Stimulus (LPS+Cyt: TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ , LPS) in den angegebenen Verdünnungen. Eine Erhöhung der Kapazität zeigt eine verminderte Konfluenz/Elektrodenbedeckung. Es zeigt sich ein konzentrationsabhängiger, zeitlich versetzter signifikanter Kapazitätsanstieg. Daten sind angegeben als MW \pm SD für $n=3-4$ Messungen in Duplikation, * $p < 0,05$ vs. Zellkontrolle (zweiseitige ANOVA mit Messwiederholung und P-Wert-Korrektur nach Holm-Sidak) (Dennhardt und Finke *et al.* 2019).

Zusammenfassend zeigte sich nach Stimulation mit den unterschiedlichen LPS+Cyt-Konzentrationen eine signifikante Störung der Barriere, angezeigt durch einen Abfall in der Resistenz. Der zeitliche Verlauf dieser war abhängig von der genutzten LPS+Cyt-Konzentration. Der Resistenzverlust ging mit einem leichten, aber signifikanten, konzentrationsabhängigen Kapazitätsanstieg einher.

8.3 Einfluss eines Mediumwechsels auf die inflammatorisch ausgelöste Barrierestörung

Im nächsten Schritt wurde das etablierte *In-vitro*-Barrierestörungsmodell auf seine Reversibilität überprüft. Dies würde Auskunft darüber geben, ob therapeutische Strategien zum Schutz der endothelialen Barriere *in vitro* möglich wären. Dazu wurde 24 h nach einer LPS+Cyt-Gabe ein Mediumwechsel durchgeführt. Es wurde entschieden, die niedrigste LPS+Cyt-Verdünnung 1:1000 für die weiteren Versuche zu nutzen, welche am wahrscheinlichsten eine reversible Barrierestörung induzierte.

Dazu wurden aus einem Teil der LPS+Cyt-stimulierten Wells 200 µl Medium entnommen und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Darauf folgend wurde die Resistenz für weitere 12 h beobachtet. Abbildung 9 zeigt die Resistenzkurve über 36 h nach Stimulation mit dem LPS+Cyt 1:1000. Wie in den vorherigen Versuchen zeigte sich zunächst in den LPS+Cyt-stimulierten Vertiefungen ein etwas verzögerter signifikanter Abfall der Resistenz im Vergleich zur Zellkontrolle. Nach 24 h erfolgte der Mediumwechsel, woraufhin die Resistenzkurve in den behandelten Vertiefungen sich in einem kurzen Zeitraum über die Resistenzkurve der Zellkontrolle hob und dort für den Rest des Beobachtungszeitraumes verblieb. Nach dem Mediumwechsel ließ sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Zellkontrolle mehr feststellen, während die LPS+Cyt-stimulierten Vertiefungen ohne Mediumwechsel weiter eine signifikante Barrierestörung zeigten. Dies zeigt, dass die LPS+Cyt-induzierte Barrierestörung reversibel ist und die Resistenz der Zellschichten durch einen Mediumwechsel auf das Niveau der Zellkontrolle heben lässt (Dennhardt und Finke *et al.* 2019).

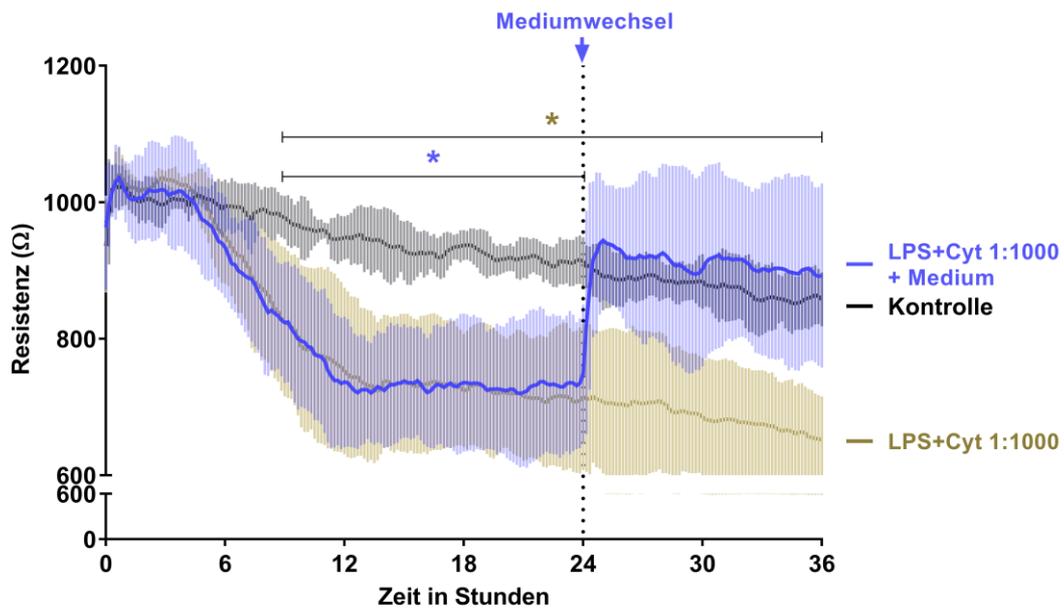


Abbildung 9: Einfluss eines Mediumwechsels auf den Resistenzverlust nach inflammatorischen Stimulus. Dargestellt ist die elektrische Resistenz des Endothellayers 36 h nach Stimulation mit inflammatorischen Stimulus (LPS+Cyt TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ , LPS) in der Verdünnung 1:1000. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel (200 μ l) in einem Teil der stimulierten Vertiefungen. Daten sind angegeben als MW \pm SD für $n=3$ Messungen, * $p < 0,05$ vs Zellkontrolle (zweiseitige ANOVA mit Messwiederholung und P-Wert-Korrektur nach Holm-Sidak) (Dennhardt und Finke *et al.* 2019).

8.4 Einfluss der gleichzeitigen Gabe des inflammatorischen Stimulus und des S1P-Analogons FTY720 auf die endotheliale Barriere

Um zu untersuchen, ob das klinisch zugelassene S1P-Analogon FTY720 vor der durch den inflammatorischen Stimulus ausgelösten Störung der endothelialen Barrierefunktion schützt oder diese verbessert, wurden GEnC mit FTY720 und dem LPS+Cyt ko-stimuliert. Zur Stimulation wurde nur der LPS+Cyt 1:1000 sowie der LPS+Cyt 1:1000 mit 1 μ M FTY720 oder gleichem Volumen DMSO (Vehikelkontrolle) verwendet. 1 μ M FTY720 wurde zuvor als die wirksamste Dosis für die Verbesserung der endothelialen Barriere beschrieben (Wang *et al.* 2011).

Abbildung 10 zeigt die Resistenz der Endothelzellschichten für den Beobachtungszeitraum von 24 h nach Stimulation als Mittelwerte mit Standardabweichung aus 4 Messungen in Duplikaten. Wie in den vorherigen Versuchen verursachte LPS+Cyt 1:1000 einen verzögerten, signifikanten Abfall der Resistenz nach ~12,8 h. Auch bei den anderen Zuständen trat nach Stimulation ein signifikanter Resistenzabfall im Vergleich zur Zellkontrolle ein. Die Resistenz der FTY720 behandelten Zellen wies jedoch keine signifikanten Unterschiede zur Vehikelkontrolle (DMSO) auf und DMSO veränderte nicht die LPS+Cyt-Wirkung und den Beginn des signifikanten Resistenzabfalls. Dies zeigt, dass FTY720 im *In-vitro*-Modell keinen signifikanten Einfluss auf die Störung der endothelialen Barrierefunktion nimmt.

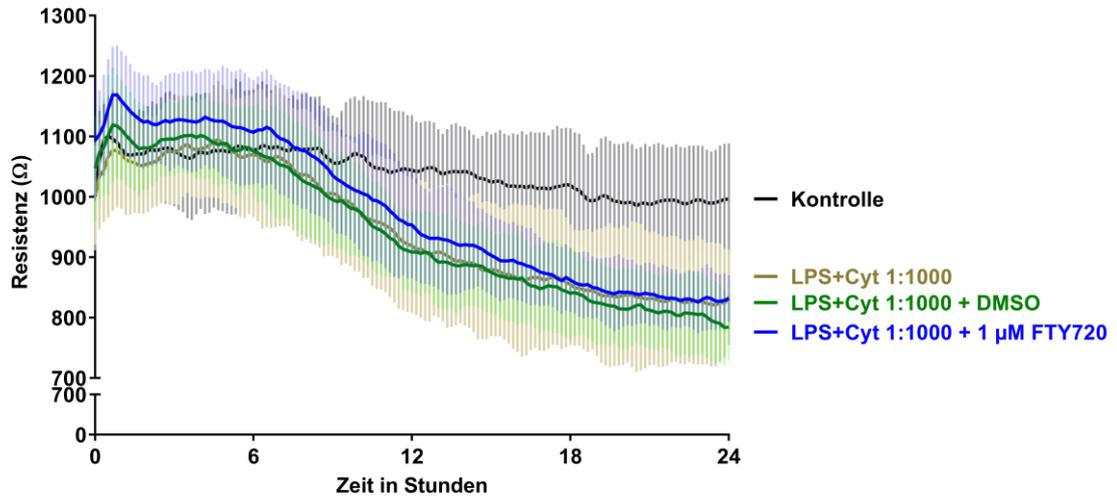


Abbildung 10: Einfluss von FTY720 auf den Resistenzabfall nach Behandlung mit dem inflammatorischen Stimulus. Elektrische Resistenz der Endothelzellschicht über 24 h nach Stimulation mit inflammatorischen Stimulus (LPS+Cyt: TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ , LPS) verdünnt 1:1000 \pm FTY720 oder Vehikel (DMSO). Daten sind angegeben als MW \pm SD für $n=4$ Messungen in Duplikaten (Dennhardt und Finke *et al.* 2019).

8.5 S1P₁-Rezeptor-Expression auf GEnC nach FTY720 Stimulation

In Vorversuchen zeigte S1P selbst keine Wirkung auf die Resistenz der GEnC-Zellschicht (Dennhardt und Finke *et al.* 2019). Auch FTY720 hatte keine signifikanten Effekte auf den Resistenzabfall nach LPS+Cyt-Stimulation (Abschnitt 8.4). Wird FTY720 aktiv, bindet es an den S1P₁-Rezeptor und führt zu dessen Internalisierung und Degradierung, ohne, dass der Rezeptor an der Zelloberfläche re-exprimiert wird. Würde FTY720 also ausreichend *in vitro* aktiviert werden, sollte eine Rezeptorinternalisierung zu beobachten sein. Um dies zu prüfen, wurden GEnC, wie in 7.4 beschrieben, mit 1 µM FTY720 über 24 h inkubiert und die S1P₁-Rezeptorexpression durchflusszytometrisch untersucht.

Abbildung 11A zeigt die in 7.4 näher beschriebene Gating-Strategie mit Auswahl der Zellpopulation (links), Ausschluss von *Doublets* (mitte) und Ausschluss toter Zellen mittels Propidiumiodid (PI) Färbung (rechts). In Abbildung 11B ist repräsentativ das Ergebnis einer der durchflusszytometrischen Analysen nach Gating und Ausschluss toter Zellen dargestellt.

Der Prozentsatz der S1P₁-positiven GEnC ist in Abbildung 11C als MW ± SD aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt. Die Zellen der Kontrolle wurden nicht mit dem S1P₁-spezifischen Primärantikörper inkubiert und stellten so das Hintergrundsignal dar. Es zeigten sich in der Kontrolle $0,2 \pm 0,18$ % S1P₁-positive Zellen. Von den unstimulierten Zellen zeigten sich $51,81 \pm 2,382$ % positiv für den S1P₁-Rezeptor. Dies zeigt, dass der für die endothelstabilisierende Wirkung wichtige Rezeptor auf den GEnC exprimiert wird. Nach 24 h Inkubation mit FTY720 zeigten sich $47,6 \pm 13,79$ % der Zellen positiv, was gegen eine Internalisierung des Rezeptors nach FTY720-Gabe spricht.

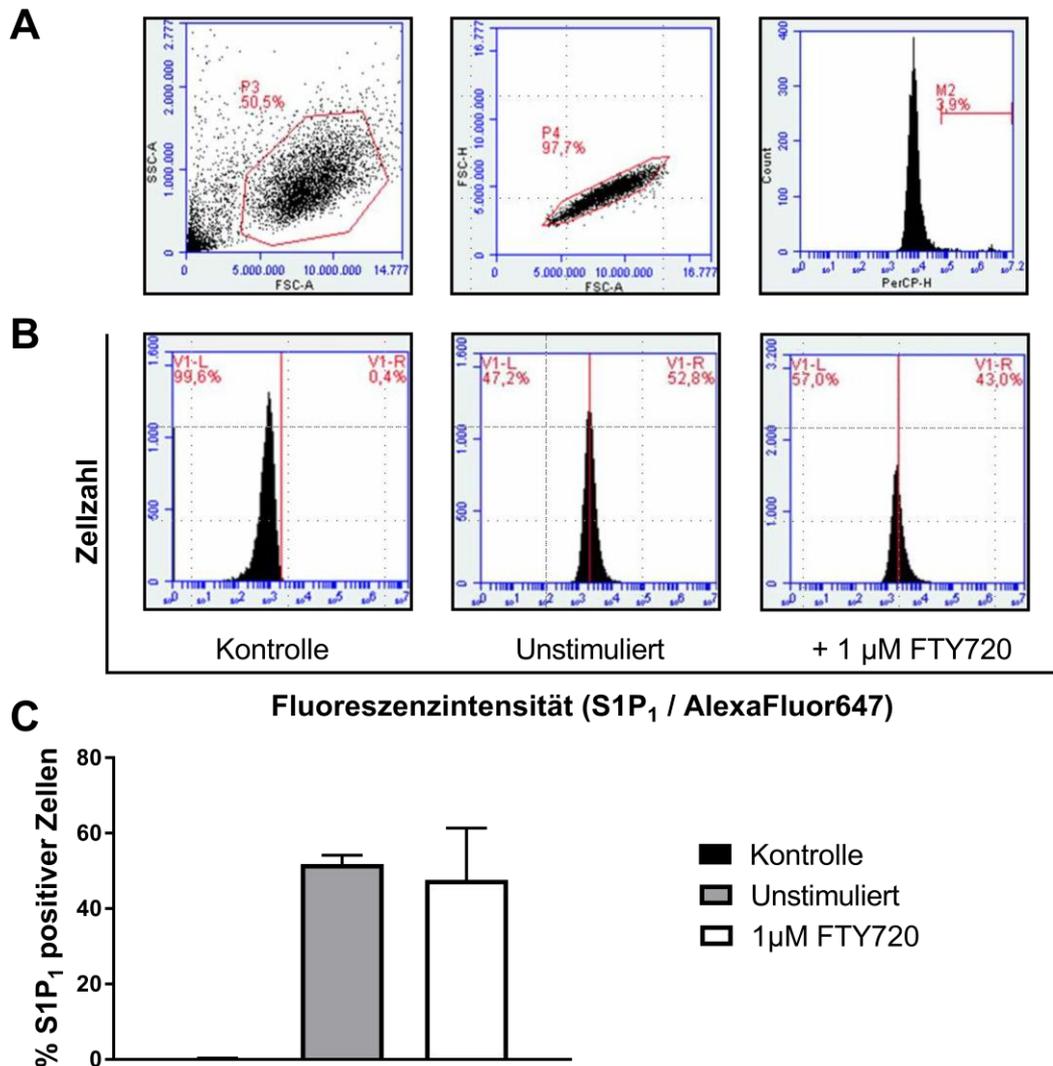


Abbildung 11: FACS-Analyse der S1P₁-Expression auf GEnC. A) Gating-Strategie. Links: Auswahl der Zellpopulation im Vorwärtsstreulicht (FSC-A) und Seitwärtsstreulicht (SSC-A). Mitte: Ausschluss von Zellpaaren (Doublets) durch Vorwärtsstreulicht Höhe und Bereich (FSC-H, A). Rechts: Auswahl der mit Propidiumiodid (PI)-gefärbten Zellen im PerCP-Kanal. B) Repräsentative FACS-Analyse nach Gating und Ausschluss toter Zellen mittels PI-Färbung. Aufgetragen ist die Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität des Kanals AlexaFluor647. Links der roten Linie befinden sich S1P₁-negative Zellen, rechts der Linie S1P₁-exprimierende Zellen. Links: Ungefärbte Kontrolle. Mitte: Zellen, welche mit einem spezifischen Antikörper für den S1P₁-Rezeptor gefärbt wurden. Rechts: Zellen nach 24 h Stimulation mit 1 μM FTY720, gefärbt für den S1P₁-Rezeptor. C) Prozent der S1P₁-positiven Zellen aus drei unabhängigen FACS-Analysen. In der Kontrolle 0,2 ± 0,18 %, in den unstimulierten Zellen 51,81 ± 2,382 % und in den mit FTY720-stimulierten Zellen 47,6 ± 13,79 % positive Zellen. Aufgetragen wurden MW ± SD. (Modifiziert aus Dennhardt und Finke *et al.* 2019)

8.6 Einfluss von S1P auf die AMPK Aktivität in GEnC

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung von S1P auf die Aktivität der AMPK in GEnC zu untersuchen. In früheren Arbeiten anderer Gruppen wurde in unterschiedlichen Zelltypen bereits S1P als einer der Agonisten beschrieben, der AMPK phosphoryliert und somit aktivieren kann (Levine *et al.* 2007, Malik *et al.* 2015, Kimura *et al.* 2010). Um zu prüfen, ob eine S1P-Stimulation auch in den GEnC zu einer AMPK-Aktivierung führt und den Zeitpunkt dieser Interaktion zu ermitteln, wurden die Zellen, wie in Abschnitt 7.5.1 beschrieben, zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit 1 μ M S1P oder dem gleichen Volumen Vehikelkontrolle (MeOH) stimuliert und der Phosphorylierungsstatus der AMPK mittels Immunoblotting untersucht. AICAR wurde als Positivkontrolle für die AMPK-Phosphorylierung in jedem Experiment mitgeführt.

Abbildung 12A zeigt den AMPK Phosphorylierungsstatus nach S1P- und Vehikel-Stimulation als MW \pm SD aus $n=3-4$ Versuchen. AICAR führte in jedem der Versuche zu einer signifikanten AMPK-Phosphorylierung von unterschiedlichem Ausmaß (* $p = 0,0283$ vs. unstimulierte Kontrolle, Mann-Whitney-U-Test). Für die Zeitpunkte 30 min der S1P- und Methanol-Stimulation war ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle erkennbar (* $p = < 0,05$ vs. unstimulierte Kontrolle). Da jedoch diese signifikante AMPK-Aktivierung sowohl bei S1P als auch bei Vehikel-Stimulation vorhanden war, ließ sich diese nicht auf S1P zurückführen. Folglich konnte zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Phosphorylierung der AMPK nach S1P-Stimulation in GEnC nachwiesen werden.

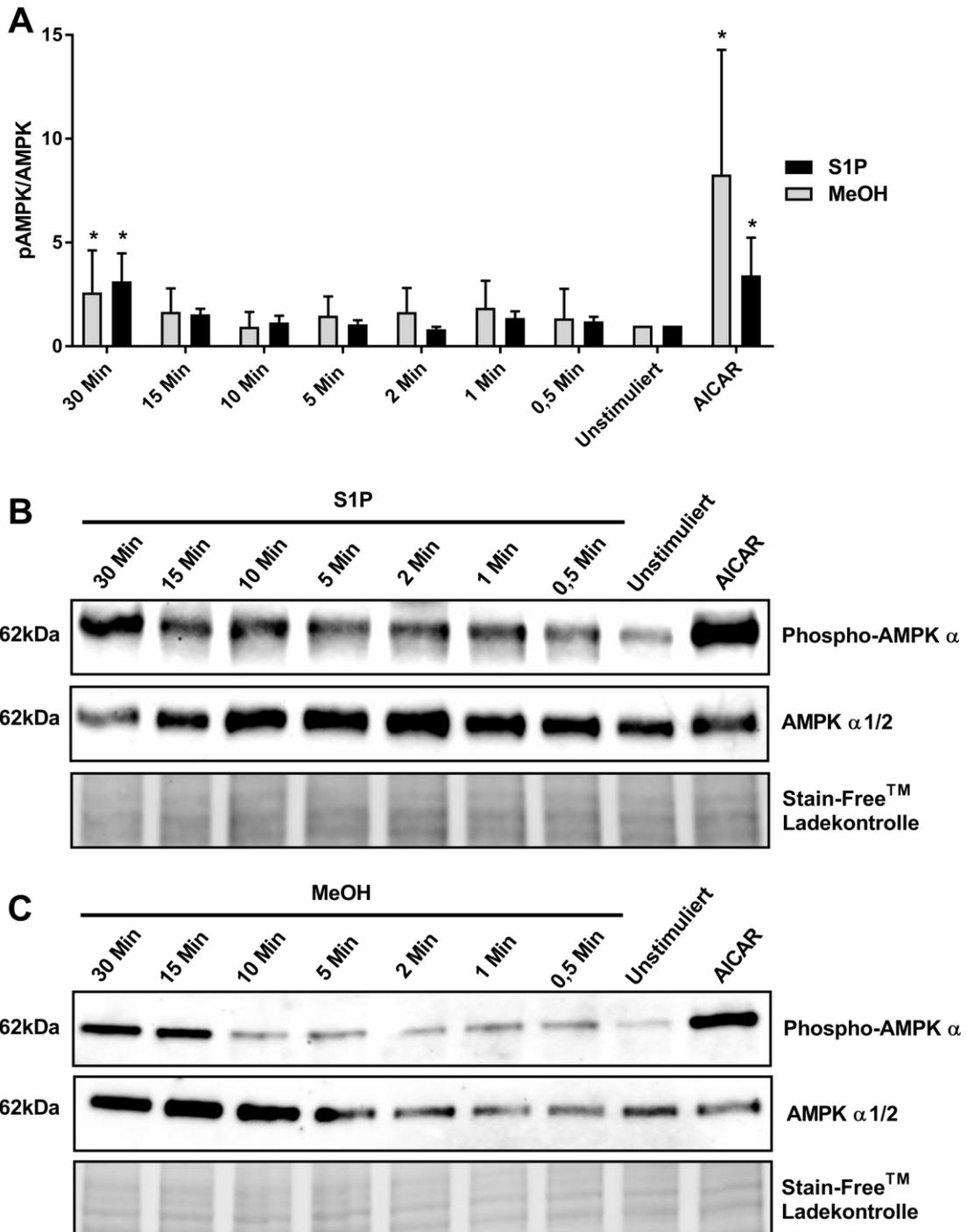


Abbildung 12: Einfluss von S1P auf die AMPK-Phosphorylierung in GENC. A) AMPK-Aktivierung dargestellt als pAMPK/AMPK-Ratio geteilt durch die unstimulierte Kontrolle nach Stimulation mit S1P und Vehikelkontrolle (MeOH) für die angegebenen Zeiträume. Gezeigt werden MW \pm SD aus $n=3-4$ unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ vs. unstimulierte Kontrolle, Man-Whitney-U-Test. B,C) Gezeigt werden repräsentative Immunoblots der phospho-AMPK α (Thr172) und gesamt AMPK α 1/2 für die angegebenen Stimulationszeiträume. (Modifiziert aus Dennhardt und Finke *et al.* 2019)

9 Diskussion

9.1 Beurteilung des *In-vitro*-Modells

9.1.1 Charakterisierung der endothelialen Barriere von GEnC

Bevor eine inflammatorische Barrierestörung simuliert werden konnte, musste die Kultivierung der GEnC im ECIS-System etabliert werden. Für die ausgewählte Zellzahl von 10.000 Zellen pro Well zeigte sich ein stabiles, reproduzierbares Wachstum mit vier abgrenzbaren Phasen (siehe 8.1). Die GEnC erreichten bei $\sim 1000 \Omega$ ein Plateau der Resistenz, welches die Ausbildung der maximalen Barrierefunktion anzeigt. Unterschiedliche Endothelzelltypen unterscheiden sich in der maximalen Resistenz in der Plateauphase. Dieses charakterisiert Unterschiede in der basalen Permeabilität dieser Zellschichten (Stolwijk *et al.* 2015). Die Ausprägung u. a. der Zell-Zell-Kontakte beeinflusst diese Permeabilität (Aird 2012). Zum Vergleich wurde die Resistenz des Plateaus (Maximale Konfluenz) von HUVEC-Zellen (menschliche Endothelzellen der Nabelschnurvene) mit $\sim 1400-1600 \Omega$ beschrieben (Wilkerson *et al.* 2012). Die GEnC zeigten eine niedrigere Resistenz, was möglicherweise für eine größere basale Permeabilität entsprechend des glomerulären Phänotyps spricht.

Wichtig für reproduzierbare und gut vergleichbare ECIS-Messungen ist, dass sich die Endothelzellschichten zum Zeitpunkt der Stimulation in den unabhängigen Versuchen möglichst in derselben Wachstumsphase befinden. Eine abweichende basale Resistenz zum Zeitpunkt der Stimulation verändert Auswirkungen von Substanzen auf die Barrierefunktion (Stolwijk *et al.* 2015). Drei unabhängige Messungen zeigten eine fast identische Resistenz der GEnC-Zellschicht zu Beginn des ausgewählten Stimulationszeitraumes (Abbildung 6A Phase 3). Dies zeigt eine gute Reproduzierbarkeit des basalen Zustandes der endothelialen Barriere in der ausgewählten Stimulationsphase.

9.1.2 Einfluss eines inflammatorischen Stimulus auf die Barrierefunktion der GEnC

Eine Barriestörung wurde durch Stimulation mit einem inflammatorischen Stimulus (siehe Abschnitt 7.2) simuliert. Die drei getesteten Verdünnungen des LPS+Cyt führten alle zu einem signifikanten Abfall der Resistenz (Abbildung 7). Der Zeitpunkt der Signifikanz dieses Resistenzabfalls war abhängig von der Verdünnung des LPS+Cyt. Bei der niedrigsten LPS-Cyt-Verdünnung (1:1000) wich die Resistenz am spätesten signifikant von der Resistenz der Zellkontrolle ab. Der Abfall der Resistenz zeigt eine Reduktion der Barrierefunktion des Endothels an (Stolwijk *et al.* 2015). Es wurde folglich eine signifikante Barriestörung bei allen genutzten LPS+Cyt-Konzentrationen beobachtet. Der Beginn dieser Barriestörung war dabei konzentrationsabhängig. Höhere LPS+Cyt-Konzentrationen führten zu einem früheren Abfall der Barrierefunktion.

Auch die Kapazität stieg nach LPS+Cyt-Stimulation bei allen genutzten Konzentrationen leicht, jedoch signifikant an. Die Kapazität wird durch die Plasmamembranen der Zellen beeinflusst (Stolwijk *et al.* 2015). Ein Anstieg der Kapazität lässt sich durch morphologische Veränderungen der Endothelzellen erklären. Proinflammatorische Mediatoren führen in Endothelzellen zu einer Kontraktion des Aktin-Zytoskeletts und somit zu der Bildung sogenannter Stress-Fasern (engl. *stress fibers*). Diese Zellkontraktion führt zu interzellulären Spaltbildungen (Xu *et al.* 2015, Schlegel *et al.* 2009). Die dadurch ausgelösten Veränderungen der Zellmorphologie könnten den leichten Kapazitätsanstieg verursachen. Weiterhin wäre es möglich, dass LPS+Cyt eine Apoptose in den GEnC auslöst und sie sich von der Elektrode ablösen. Dies würde ebenfalls zu einem Anstieg der Kapazität führen. In aus Rindern isolierten, glomerulären Endothelzellen induzierten LPS sowie TNF- α konzentrationsabhängig eine Apoptose (Messmer *et al.* 1999).

Andere Autoren simulierten *in vitro* eine Barriestörung durch Stimulation mit TNF- α oder LPS (Xu *et al.* 2015, Schlegel *et al.* 2009). Während sich durch die Nutzung einzelner inflammatorischer Mediatoren *in vitro* eine Barriestörung induzieren lässt, repräsentiert dies nicht das komplexe Geschehen *in vivo*, in welchem viele inflammatorische Mediatoren zusammenwirken (Ertmer und

Rehberg 2016). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Mischung aus mehreren proinflammatorischen Zytokinen und LPS genutzt (siehe Abschnitt 7.2). Dies simuliert eine komplexere Inflammation, welche eher die pathophysiologischen Prozesse der septischen Endothelschädigung *in vitro* darstellt. Durch die größere Anzahl einzelner Komponenten der simulierten Inflammation erhöht sich selbstverständlich auch die Komplexität dieser. Es wird z. B. schwieriger die Dosierung der einzelnen Komponenten zu optimieren. Wird LPS oder TNF- α einzeln genutzt, könnte man eine größere Breite an Dosierungen zur Induktion einer Barrierestörung testen. Weiterhin ist es in der vorliegenden Arbeit schwer zu differenzieren, wie die einzelnen Komponenten des LPS+Cyt die Barrierefunktion oder mögliche Interventionen beeinflussen. Es wurde bereits *in vitro* durch Inkubation mit aus Sepsispatienten isolierten Neutrophilen (Fox *et al.* 2013) und Sepsis-Patientenserum (David *et al.* 2017) eine Barrierestörung in Endothelzellschichten induziert. Durch diese Interventionen eine Barrierestörung *in vitro* auszulösen, könnte eine Alternative zu dem in dieser Arbeit genutzten Model darstellen oder dieses ergänzen. Zusammenfassend ließ sich durch den LPS+Cyt erfolgreich eine Barrierestörung simulieren (Dennhardt und Finke *et al.* 2019).

9.1.3 Einfluss eines Mediumwechsels auf das *In-vitro*-Inflammationsmodell

Die durch LPS+Cyt-induzierte Barrierestörung war durch einen Mediumwechsel reversibel (Abbildung 9). Dabei stieg nach dem Mediumwechsel die Resistenz sehr schnell auf ein Niveau an, welches keinen signifikanten Unterschied zur Zellkontrolle zeigte. Dies spricht gegen irreversible Schädigungen der Endothelzellschicht und ein starkes Ablösen der Zellen durch Apoptose, wie es im vorherigen Abschnitt diskutiert wurde. Der sehr schnelle Resistenzanstieg spricht für Veränderungen im Zytoskelett, möglicherweise durch Auflösung der vorher beschriebenen Stress-Fasern (Dennhardt und Finke *et al.* 2019). Für den schnellen Anstieg der Barrierefunktion nach dem Mediumwechsel gibt es mehrere Erklärungsansätze. Durch den Mediumwechsel könnten die proinflammatorischen Zytokine sowie das LPS ausgewaschen werden. Die auslösenden Faktoren für die Barrierestörung wurden so entfernt und die

Barriere erholte sich schnell. Weiterhin könnte das im zugeführten Medium enthaltene FBS (fetales Rinderserum) die Barrierestörung beeinflusst haben. Dabei könnten Faktoren im FBS die Zytokine und LPS binden und ihre Wirkung neutralisieren. Für ein im Serum enthaltenes LPS-bindendes Protein (LBP) konnte gezeigt werden, dass es die inflammatorischen Wirkungen von LPS neutralisieren kann (Gutsmann *et al.* 2001). Weiterhin könnten durch das FBS zugeführte Faktoren die endotheliale Barriere verstärken. Wie bereits beschrieben, können beispielsweise S1P oder der S1P-Träger HDL die Barriere verstärken (Wilkerson *et al.* 2012). Während der Mechanismus der Erholung der Barrierefunktion durch den Mediumwechsel in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, zeigt die Reversibilität der Barrierestörung, dass therapeutische Strategien in diesem Modell funktionieren könnten (Dennhardt und Finke *et al.* 2019).

9.1.4 Beurteilung des ECIS-Systems

Um Veränderungen in der endothelialen Barrierefunktion der GEnC zu messen, wurde das ECIS[®] Z θ -System verwendet (siehe 7.3). Ein großer Vorteil des ECIS-Systems gegenüber anderen Methoden ist die gute zeitliche Auflösung. Schnelle Veränderungen der Barrierefunktion in einem kleinen zeitlichen Abstand, wie beispielsweise durch S1P, können durch das ECIS-System gut detektiert werden. Weiterhin sind die Messungen des Systems automatisiert, welches zu einer besseren Standardisierung und Reproduzierbarkeit zwischen den Versuchen führt (Stolwijk *et al.* 2015).

Ein Nachteil des ECIS-Systems ist, dass die Messung auf der Resistenz der Zellschicht gegen elektrische Wechselströme beruht. Diese basieren auf der Permeabilität der Zellschicht gegenüber Ionen (siehe 7.3). Die Permeabilität der endothelialen Barriere gegenüber Makromolekülen kann durch das ECIS-System nicht quantifiziert werden. Zwar geht eine stark erhöhte Permeabilität gegenüber Ionen vermutlich auch mit einem Anstieg der Makromolekülpermeabilität einher, diese Aussage kann jedoch nicht sicher mithilfe des ECIS-Systems getroffen werden (Bischoff *et al.* 2016). Es wird folglich in dieser Arbeit nur ein Teilaspekt der endothelialen Barriere beobachtet. Speziell im glomerulären Endothel ist die pathologisch erhöhte

Permeabilität gegenüber u. a. Albumin ein Zeichen der Schädigung der Filtrationsbarriere (De Gaudio *et al.* 2000). Es gibt Methoden, in denen die Permeabilität von Endothelzellschichten gegenüber markierten Makromolekülen, wie beispielsweise Albumin, quantifiziert werden können. Diese könnten die ECIS-Messungen komplementieren und würden möglicherweise abweichende Ergebnisse zu denen dieser Arbeit liefern (Bischoff *et al.* 2016). Jedoch haben auch diese Methoden Nachteile. Die Vor- und Nachteile sowie weitere Methoden zur Messung der Barrierefunktion werden in 4.5 sowie einer Arbeit von Stolwijk *et al.* zusammengefasst (Stolwijk *et al.* 2015). Weiterhin ist zu beachten, dass die Messungen im ECIS-System eine *In-vitro*-Situation darstellen. Faktoren, welche die Barrierefunktion des Endothels *in vivo* beeinflussen, wie beispielsweise Scherkräfte durch Blutfluss, umgebende Zellen sowie hydrostatischer Druck, sind nicht vorhanden.

9.2 Auswirkungen von FTY720 auf das *In-vitro*-Inflammationsmodell

FTY720 beeinflusste nicht den Abfall der Resistenz im Inflammationsmodell. Die inflammatorische Barrierestörung konnte weder komplett verhindert werden, noch wurde ihre maximale Ausprägung gegen Ende des Beobachtungszeitraums beeinflusst (siehe 8.4). Andere Arbeiten haben bereits zeigen können, dass FTY720 die endotheliale Barriere in anderen Endothelzelltypen verbessert (Dudek *et al.* 2007, Wang *et al.* 2011). FTY720 zeigte in dieser Arbeit keinen Effekt. Hierfür gibt es mehrere mögliche Erklärungsansätze:

FTY720 wird *in vivo* hauptsächlich durch die SPHK 2 zum aktiven FTY720-P phosphoryliert. Für die Versuche dieser Arbeit wurde FTY720 in der nicht-phosphorylierten Form verwendet. Zwar wird in der Maus die SPHK 1 und 2 in der Niere exprimiert, jedoch macht die SPHK 1 dabei im Verhältnis den größeren Teil aus. Weiterhin ist in der Maus der Großteil der gesamten SPHK 2-Expression in der Leber zu finden. Zudem befindet sich im murinen Blut eine im Vergleich zum humanen Blut um vielfaches erhöhte SPHK 2-Aktivität (Billich *et al.* 2003). Möglicherweise läuft der Großteil der FTY720-Phosphorylierung in der Maus in Leber sowie Blut und nur im geringen Teil in der Niere ab. In der *In-vitro*-Situation mit isolierten glomerulären Endothelzellen könnte somit

möglicherweise ein nur unzureichender Anteil des FTY720 aktiviert werden. Dies würde auch erklären, warum in den Versuchen keine FTY720-Wirkung zu beobachten war. FTY720 führte dennoch in kultivierten menschlichen Lungenendothelzellen zu einer Verstärkung der endothelialen Barriere, vergleichbar zu FTY720-P, jedoch mit einem etwas langsameren Beginn (Dudek *et al.* 2007). FTY720 konnte folglich *in vitro* von den Lungenendothelzellen ausreichend phosphoryliert werden, um eine Wirkung zu erzielen (Dudek *et al.* 2007). Einige Arbeiten verwendeten jedoch FTY720-P *in vitro*, was es ermöglicht eine unzureichenden SPHK-Aktivität zu umgehen. (Sarai *et al.* 2009, Sanchez *et al.* 2003). FTY720-P könnte in dem Barrierestörungsmodell dieser Arbeit eine stärkere Wirkung zeigen als FTY720. Zudem müsste in den GEnC auf Gen- und Proteinebene untersucht werden, in welchem Ausmaß die SPHK 1 und 2 exprimiert werden.

Zwei weitere Faktoren, welche die FTY720-Wirkung in diesen Versuchen beeinflussen könnten, sind die Dosierung sowie der Applikationszeitpunkt. Für die Versuche wurde eine FTY720-Konzentration von 1 μM gewählt. Die FTY720-Konzentration von 1 μM zeigte in Arbeiten von Dudek *et al.* und Wang *et al.* die stärkste Verbesserung der Endothelbarriere, weshalb sie für die Versuche dieser Arbeit ausgewählt wurde (Dudek *et al.* 2007, Wang *et al.* 2011). Diese Studien erfolgten jedoch in menschlichen Lungenendothelzellen sowie ohne den Zusatz von inflammatorischen Mediatoren (Wang *et al.* 2011, Dudek *et al.* 2007). In den murinen GEnC sowie unter der simulierten Inflammation ist möglicherweise eine höhere FTY720-Konzentration nötig, um die Wirkung zu optimieren. Weiterhin könnte das Zusammenspiel zwischen der genutzten LPS+Cyt-Konzentration und der FTY720-Dosierung verändert werden. Die gewählte LPS+Cyt-Verdünnung von 1:1000 ist möglicherweise zu stark und FTY720 kann nicht die volle Wirkung entfalten (Dennhardt und Finke *et al.* 2019).

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde FTY720 gleichzeitig mit LPS+Cyt gegeben. Die signifikante Barrierestörung durch den LPS+Cyt erfolgte jedoch erst ~12 h nach Stimulation. Durch die gleichzeitige frühe Gabe von FTY720 könnte die protektive Wirkung zum Beginn der Barrierestörung bereits größtenteils vorüber sein. Eine spätere FTY720-Gabe könnte möglicherweise

eine Wirkung erzielen. Dass die inflammatorische Barrierestörung auch zu einem späteren Zeitpunkt reversibel ist, konnte im Abschnitt 8.3 gezeigt werden. Die mikrovaskulären Endothelzellschichten der unterschiedlichen Organe unterscheiden sich in ihrer Permeabilität sowie Ausprägung der Zell-Zell-Kontakte (Aird 2012). Das glomeruläre Endothel zeichnet sich durch Fenestrationsen sowie einer höheren Permeabilität aus (Satchell und Braet 2009). Während FTY720 in Lungenendothelzellen stark stabilisierend wirkt (Dudek *et al.* 2007), könnte die Wirkung im glomerulären Endothel weniger ausgeprägt sein. Weiterhin verbesserte FTY720 die endotheliale Barriere in Hirnendothelzellen nach TNF- α Stimulation. Hirnendothelzellen zeichnen sich durch eine niedrige Permeabilität und einer starken Ausprägung der Zell-Zell-Kontakte aus (Imeri *et al.* 2016). Die Wirkung von FTY720 könnte folglich zwischen den unterschiedlichen Endothelphänotypen der Organe variieren. Dies könnte somit auch organspezifische Wirkungen von FTY720 erklären (Dennhardt und Finke *et al.* 2019).

Neben kardialen Nebenwirkungen kann eine längere FTY720-Exposition die Permeabilität der endothelialen Barriere pathologisch verstärken (Shea *et al.* 2010). In der vorliegende Arbeit war jedoch keine Verstärkung der inflammatorischen Barrierestörung durch FTY720 zu beobachten (Dennhardt und Finke *et al.* 2019).

Dass FTY720 die Barrierestörung nicht verhindern konnte, stimmt mit der Studie von Coldewey *et al.* überein, in der eine FTY720-Gabe im Sepsis-Mausmodell zu keiner signifikanten Verbesserung der Nierenfunktion führte (Coldewey *et al.* 2016). Die Nierenfunktion wurde in dem Sepsis-Mausmodell jedoch nur am Ende des Beobachtungszeitraumes durch eine Messung der renalen Retentionsparameter im Blut bestimmt (Coldewey *et al.* 2016). Die Dynamik der renalen Schädigung während des gesamten Beobachtungszeitraumes wurde nicht untersucht (Coldewey *et al.* 2016). In einem Rattenmodell der chronischen Nierenerkrankung konnte FTY720 jedoch die Schäden am glomerulären Endothel reduzieren und die Nierenfunktion verbessern (Ni *et al.* 2013). Es muss jedoch beachtet werden, dass in diesem Model die Schädigung über einen Zeitraum von 12 Wochen stattfand, was kaum der Entstehung des akuten Nierenversagens in 18-24 h in der Arbeit von Coldewey und Kollegen entspricht (Ni *et al.* 2013, Coldewey *et al.* 2016).

FTY720 hat folglich möglicherweise Auswirkungen auf inflammatorische Schädigungen, die über einen längeren Zeitraum stattfinden, jedoch nicht auf akute Schädigungen.

9.3 Einfluss von FTY720 auf die S1P₁-Expression auf GEnC

In eigenen Vorversuchen zeigte S1P keine Wirkung auf die elektrische Resistenz der GEnC-Endothelzellschicht (Dennhardt und Finke *et al.* 2019) und auch FTY720 zeigte keinen Einfluss auf die inflammatorischen Barrierschädigung (Abschnitt 8.4). S1P und FTY720 binden an den S1P₁ in Endothelzellen. Bindet FTY720 an den S1P₁, wird der Rezeptor internalisiert, degradiert und nicht an der Oberfläche re-exprimiert (Oo *et al.* 2007). In dieser Arbeit wurde daher eine FACS-Analyse der S1P₁-Expression der GEnC durchgeführt. Dies sollte zeigen, ob eine FTY720-Stimulation zu einer Internalisierung des Rezeptors führt. Ein Ausbleiben der Rezeptorinternalisierung würde dafür sprechen, dass FTY720 *in vitro* nur eine geringe oder keine Aktivität zeigt.

Die FACS-Analyse zeigte, dass der S1P₁ auf den GEnC exprimiert wurde. Die Stimulation der Zellen mit FTY720 für 24 h zeigte keine relevante Veränderung in der Prozentzahl der S1P₁-positiven Zellen. Dies spricht gegen eine S1P₁-Internalisierung nach FTY720-Stimulation für die verwendete Konzentration und den Stimulationszeitraum.

Oo *et al.* beschreiben eine Internalisierung und Degradierung des S1P₁ nach FTY720-P-Stimulation (Oo *et al.* 2007). Stimulation mit FTY720, wie es auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, zeigte keine Veränderung der S1P₁-Expression (Oo *et al.* 2007). Allerdings wurde in der Arbeit von Oo *et al.* FTY720 in niedrigeren Konzentrationen von 10-250 nM genutzt. Zudem war der Stimulationszeitraum wesentlich kürzer (maximal 1 h), verglichen mit den Experimenten der vorliegenden Arbeit. Weiterhin wurde die S1P₁-Expression durch Immunoblotting von Gesamt-Zelllysaten aus HUVEC-Zellkulturen ermittelt (Oo *et al.* 2007). Die in dieser Arbeit genutzte FACS-Analyse zeigt dagegen lediglich die Oberflächenexpression des S1P₁ auf den GEnC. Wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, ist FTY720 die inaktive Form des S1P-Analogons. Ob eine Phosphorylierung zu FTY720-P durch die GEnC erfolgt, wurde in dieser Arbeit

nicht untersucht. Eine unzureichende Phosphorylierung von FTY720 würde auch das Ausbleiben einer S1P₁-Internalisierung in den GEnC erklären. Wang *et al.* konnten jedoch eine signifikante Reduktion der S1P₁-Expression im Immunoblotting durch FTY720-Stimulation beobachten (Wang *et al.* 2014). Lungenendothelzellen wurden mit 1 µM FTY720 für 4 h stimuliert (Wang *et al.* 2014). Die S1P₁-Expression war jedoch in einem nur geringeren Ausmaß reduziert, verglichen mit einer Stimulation mit FTY720-P (Wang *et al.* 2014). Keine der vorher beschriebenen Arbeiten analysierten die S1P₁-Expression nach 24 h. Oo *et al.* beobachteten, dass die S1P₁-Expression 12 h nach FTY720-P-Exposition wieder zunahm (Oo *et al.* 2007). Es ist möglich, dass die FTY720-Wirkung auf die S1P₁-Internalisierung nach 24 h bereits vorüber war und neue Rezeptoren an der GEnC-Oberfläche exprimiert wurden. Kürzere Stimulationszeiten würden in diesem Experiment darüber Auskunft geben. Der lange Stimulationszeitraum von 24 h ist die Limitation dieser FACS-Analysen. Die Aussage über eine S1P₁-Internalisierung zu einem früheren Zeitpunkt lässt sich damit nicht sicher feststellen. Die fehlende Rezeptorinternalisierung kann aber dafür sprechen, dass FTY720 unzureichend aktiviert wurde oder keine Wirkung am Rezeptor zeigt. Es konnte jedoch in einer Studie von Dudek *et al.* gezeigt werden, dass FTY720 auch unabhängig vom S1P₁ die endotheliale Barriere verstärken kann (Dudek *et al.* 2007).

9.4 S1P/AMPK-Interaktion in GEnC

In mehreren Arbeiten mit unterschiedlichen Zelltypen konnte bereits nachgewiesen werden, dass S1P *in vitro* AMPK phosphoryliert und somit aktivieren kann (Levine *et al.* 2007, Kimura *et al.* 2010, Malik *et al.* 2015). In murinen glomerulären Endothelzellen wurde dieser Signalweg jedoch noch nicht beschrieben. Es konnte in den GEnC für keinen der Stimulationszeiträume eine signifikante Aktivierung der AMPK festgestellt werden, welche sich auf S1P zurückführen ließ. Levine *et al.* wiesen erstmals die S1P/AMPK-Interaktion nach (Levine *et al.* 2007). Sie stimulierten Endothelzellen mit einer S1P-Konzentration von 100 nM, die weit unter den für die Versuche der vorliegenden Arbeit genutzten 1 µM lag (Levine *et al.* 2007). Der maximale Phosphorylierungsgrad der AMPK nach Stimulation mit

S1P wurde durch Levine *et al.* bei 5 min nachgewiesen (Levine *et al.* 2007). Diese Phosphorylierung nahm jedoch bis 30 min nach Stimulation kontinuierlich ab. Die Zellen in der Arbeit von Levine *et al.* wurden jedoch länger (bis zu 16 h) vor der Stimulation in serumfreiem Medium gehalten (Levine *et al.* 2007), verglichen mit den 4 h in den Versuchen der vorliegenden Arbeit. Da die AMPK-Aktivierung durch Veränderungen in der Energiehomöostase beeinflusst wird, könnte ein längerer Mangel an Nährstoffen aus dem Serum den S1P-Einfluss auf die AMPK verändern (Jeon 2016). Dies könnte auch erklären, warum es in dieser Arbeit nach 30 min Vehikel- und S1P-Stimulation zu einem signifikanten Anstieg der AMPK-Aktivität kam, da die AMPK durch den Nährstoffmangel aktiviert werden könnte (Jeon 2016, Dennhardt und Finke *et al.* 2019).

Kimura *et al.* nutzten, wie in den Stimulationsversuchen der vorliegenden Arbeit, eine S1P-Konzentration von 1 μ M (Kimura *et al.* 2010). Sie detektierten eine AMPK-Phosphorylierung nach 10 min Stimulation (Kimura *et al.* 2010). Statt in serumfreiem Medium, wurden die Zellen in einem Medium stimuliert, das Albumin enthielt (Kimura *et al.* 2010). Albumin fungiert als einer der S1P-Träger im Plasma. Die Stärke der S1P-Wirkung kann durch die Eigenschaft des Trägers beeinflusst werden (Wilkerson *et al.* 2012). HDL-gebundenes S1P wirkt beispielsweise stärker auf die endotheliale Barriere als Albumin-gebundenes S1P (Wilkerson *et al.* 2012). Weiterhin wurde gezeigt, dass an Albumin gebundenes S1P stärker auf die endotheliale Barriere wirkt als freies oder in Methanol solubilisiertes S1P (Stolwijk *et al.* 2015). Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurde S1P in Methanol solubilisiert, dies war jedoch auch bei Levine *et al.* der Fall und sie konnten eine S1P/AMPK-Interaktion nachweisen (Levine *et al.* 2007). Die Nutzung eines serumfreien Mediums zur Stimulation, einer Über- oder Unterdosierung von S1P sowie ein zu kurzer Stimulationszeitraum könnten der Grund dafür sein, dass in der vorliegenden Arbeit keine AMPK-phosphorylierung nach S1P-Stimulation nachgewiesen werden konnte. Jedoch wurden die Endothelzellen in der Arbeit von Levine *et al.* auch nach Inkubation mit serumfreiem Medium mit S1P stimuliert und es konnte eine AMPK-Phosphorylierung nachgewiesen werden (Levine *et al.* 2007). Im Immunoblotting zeigte sich durch die Positivkontrolle AICAR eine signifikante AMPK-Phosphorylierung. Dies

spricht dafür, dass eine AMPK-Phosphorylierung durch S1P, wenn in den GEnC vorhanden, prinzipiell nachweisbar wäre. Weiterhin konnte mit einem identischen Stimulationsprotokoll und gleichen Versuchsvoraussetzungen in humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1) eine signifikante AMPK-Aktivierung nach 1 und 2 min S1P-Stimulation festgestellt werden (Dennhardt und Finke *et al.* 2019). Es ist also möglich, dass es nicht zu einer S1P/AMPK-Interaktion in GEnC kommt oder dieser Signalweg nur sehr gering ausgeprägt ist. Die S1P/AMPK-Interaktion könnte, abhängig von dem Endothelzelltyp sowie der Spezies, aus dem die Zellen isoliert wurden, variieren.

In dieser Arbeit wurden konditionell immortalisierte glomeruläre Endothelzellen aus der Maus verwendet (Akis und Madaio 2004). Diese wiesen laut Akis *et al.* endotheltypische Marker sowie Morphologien auf und wurden bereits in mehreren publizierten Arbeiten verwendet (Akis und Madaio 2004, Taubitz *et al.* 2013, Khan *et al.* 2011). Die primär isolierten Zellen wurden jedoch durch die Aktivierung des ts-SV40 TAg konditionell immortalisiert (Akis und Madaio 2004). Das ts-SV40 TAg blockiert u. a. das Tumorsuppressorprotein p53 und verändert somit zelluläre Signalwege (Ahuja *et al.* 2005, Akis und Madaio 2004). Durch die genetische Transformation der GEnC könnte es sein, dass auch der in der vorliegenden Arbeit untersuchte S1P/AMPK-Signalweg verändert ist. Möglicherweise ließe sich eine S1P/AMPK-Interaktion in primär isolierten, nicht genetisch veränderten glomerulären Endothelzellen nachweisen. Vergleichend sollten zudem diese Versuche in menschlichen glomerulären Endothelzellen wiederholt werden, um speziesspezifische Unterschiede auszuschließen.

10 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung eines S1P/AMPK-Signalwegs zum Schutz der glomerulären endothelialen Barriere *in vitro* in GEnC untersucht. Es wurde erfolgreich ein *In-vitro*-Modell einer inflammatorischen Störung der Barriere des murinen glomerulären Endothels im ECIS-System etabliert. Der dabei genutzte inflammatorische Stimulus induzierte konzentrationsabhängig einen Resistenzabfall, welcher durch einen Mediumwechsel reversibel war. Das etablierte Inflammationsmodell bietet die Möglichkeit, Interventionen zum Schutz des glomerulären Endothels unter Inflammation zu testen. Weiterhin bietet sich die Möglichkeit, dieses Modell auf andere Endothelzelltypen zu übertragen und durch zusätzliche Komponenten des inflammatorischen Stimulus (z.B. aktivierte Neutrophile) zu erweitern. In einer neuen Studie von Stepanovska *et al.* wurde das etablierte Inflammationsmodell erfolgreich auf humane zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen übertragen (Stepanovska *et al.* 2020).

In der genutzten Dosis konnte das S1P-Analogon FTY720 die Barrierestörung in diesem Modell nicht verhindern. Mögliche Erklärungen für die fehlende Wirkung von FTY720 sind eine Unter- oder Überdosierung, ein zu früher Applikationszeitpunkt sowie eine unzureichende Aktivierung des Medikaments *in vitro*. Die FACS-Analyse der GEnC zeigte keine Internalisierung des S1P₁-Rezeptors nach FTY720-Stimulation. Dies spricht weiter für eine mögliche unzureichende FTY720-Aktivierung oder Dosierung *in vitro*. Obwohl in dieser *In-vitro*-Studie keine Effekte nachweisbar waren, sprechen die Ergebnisse anderer Gruppen für das Potential von FTY720, das glomeruläre Endothel unter Inflammation schützen zu können. Es bedarf jedoch weiterer experimenteller Studien, um dies zu bestätigen und genaue Mechanismen aufzuzeigen. Es wurden mehrere FTY720-Derivate entwickelt, die teilweise dem ursprünglichem FTY720 in ihrer Wirkung auf die endotheliale Barriere überlegen sind (Wang *et al.* 2014, Camp *et al.* 2016). Diese Derivate könnten Alternativen zu dem klinisch zugelassenen FTY720 darstellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte im Immunoblotting keine Interaktion zwischen S1P und AMPK in den GEnC nachgewiesen werden. Dies spricht für eine untergeordnete Rolle des S1P/AMPK-Signalweges im murinen glomerulären

Endothel. Es empfiehlt sich jedoch eine Wiederholung der Versuche in primär isolierten glomerulären Endothelzellen, um dieses zu bestätigen. In anderen Endothelzelltypen konnte der S1P/AMPK-Signalweg bereits nachgewiesen werden und die in der vorliegenden Arbeit zitierte Literatur untermauert eine schützende Wirkung von S1P und AMPK auf das Endothel unter Inflammation. Die protektiven Wirkungen dieses Signalweges könnten folglich in weiteren Endothelzelltypen untersucht werden.

Unter identischen Versuchsbedingungen konnte in unserem Labor ein S1P/AMPK-Signalweg in HMEC-1 Zellen nachgewiesen werden (Dennhardt und Finke *et al.* 2019). Über einen partiellen siRNA-induzierten Knockdown der AMPK α -Untereinheiten in den HMEC-1 wurde weiterhin nachgewiesen, dass die AMPK zumindest teilweise die Barriere-verstärkenden Wirkungen von S1P im humanen dermalen mikrovaskulären Endothel vermittelt (Dennhardt und Finke *et al.* 2019). Das Endothel weist im Körper relevante Variationen zwischen unterschiedlichen vaskulären Stromgebieten auf, u. a. Unterschiede zwischen Makro- und Mikrozirkulation (Aird 2012). Der S1P/AMPK-Signaltransduktionsweg könnte somit eine von endothelphänotyp-abhängige Ausprägung aufzeigen. Endothel-phänotypische Unterschiede sollten in weiteren Untersuchungen des S1P/AMPK-Signalweges beachtet werden.

Der Schutz des glomerulären Endothels in der Sepsis stellt ein therapeutisches Ziel dar, mit dem die renale Mikrozirkulation positiv beeinflusst werden kann. Dies könnte ein Schlüssel zur Entwicklung von Behandlungen des septischen akuten Nierenversagens sein und sollte in weiteren experimentellen Studien untersucht werden.

11 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Adembri C, Sgambati E, Vitali L, Selmi V, Margheri M, Tani A, Bonaccini L, Nosi D, Caldini AL, Formigli L, De Gaudio AR. 2011. Sepsis induces albuminuria and alterations in the glomerular filtration barrier: a morphofunctional study in the rat. *Crit Care*, 15 (6):R277.
- Ahuja D, Saenz-Robles MT, Pipas JM. 2005. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene*, 24 (52):7729-7745.
- Aird WC. 2012. Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2 (1):a006429.
- Akis N, Madaio MP. 2004. Isolation, culture, and characterization of endothelial cells from mouse glomeruli. *Kidney Int*, 65 (6):2223-2227.
- Bhadade RR, deSouza R, Harde MJ, Sridhar B. 2014. Microalbuminuria: a biomarker of sepsis and efficacy of treatment in patients admitted to a medical intensive care unit of a tertiary referral center. *J Postgrad Med*, 60 (2):145-150.
- Billich A, Bornancin F, Devay P, Mechtcheriakova D, Urtz N, Baumruker T. 2003. Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases. *J Biol Chem*, 278 (48):47408-47415.
- Bischoff I, Hornburger MC, Mayer BA, Beyerle A, Wegener J, Furst R. 2016. Pitfalls in assessing microvascular endothelial barrier function: impedance-based devices versus the classic macromolecular tracer assay. *Sci Rep*, 6:23671.
- Bode C, Sensken SC, Peest U, Beutel G, Thol F, Levkau B, Li Z, Bittman R, Huang T, Tolle M, van der Giet M, Graler MH. 2010. Erythrocytes serve as a reservoir for cellular and extracellular sphingosine 1-phosphate. *J Cell Biochem*, 109 (6):1232-1243.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254.
- Brenner M, Schaer GL, Mallory DL, Suffredini AF, Parrillo JE. 1990. Detection of renal blood flow abnormalities in septic and critically ill patients using a newly designed indwelling thermodilution renal vein catheter. *Chest*, 98 (1):170-179.
- Burrell AR, McLaws ML, Fullick M, Sullivan RB, Sindhusake D. 2016. SEPSIS KILLS: early intervention saves lives. *Med J Aust*, 204 (2):73 e71-77.
- Camerer E, Regard JB, Cornelissen I, Srinivasan Y, Duong DN, Palmer D, Pham TH, Wong JS, Pappu R, Coughlin SR. 2009. Sphingosine-1-

phosphate in the plasma compartment regulates basal and inflammation-induced vascular leak in mice. *J Clin Invest*, 119 (7):1871-1879.

- Camp SM, Chiang ET, Sun C, Usatyuk PV, Bittman R, Natarajan V, Garcia JG, Dudek SM. 2016. "Pulmonary Endothelial Cell Barrier Enhancement by Novel FTY720 Analogs: Methoxy-FTY720, Fluoro-FTY720, and beta-Glucuronide-FTY720". *Chem Phys Lipids*, 194:85-93.
- Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE. 1999. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett*, 443 (3):285-289.
- Chun J, Hartung HP. 2010. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol*, 33 (2):91-101.
- Coldewey SM, Benetti E, Collino M, Pfeilschifter J, Sponholz C, Bauer M, Huwiler A, Thiemermann C. 2016. Elevation of serum sphingosine-1-phosphate attenuates impaired cardiac function in experimental sepsis. *Sci Rep*, 6:27594.
- Colella AD, Chegenii N, Tea MN, Gibbins IL, Williams KA, Chataway TK. 2012. Comparison of Stain-Free gels with traditional immunoblot loading control methodology. *Anal Biochem*, 430 (2):108-110.
- Colombo SL, Moncada S. 2009. AMPK α 1 regulates the antioxidant status of vascular endothelial cells. *Biochem J*, 421 (2):163-169.
- Cunningham PN, Dyanov HM, Park P, Wang J, Newell KA, Quigg RJ. 2002. Acute renal failure in endotoxemia is caused by TNF acting directly on TNF receptor-1 in kidney. *J Immunol*, 168 (11):5817-5823.
- David S, Thamm K, Schmidt BMW, Falk CS, Kielstein JT. 2017. Effect of extracorporeal cytokine removal on vascular barrier function in a septic shock patient. *J Intensive Care*, 5:12.
- De Backer D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MJ, Vincent JL. 2002. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 166 (1):98-104.
- De Gaudio AR, Adembri C, Grechi S, Novelli GP. 2000. Microalbuminuria as an early index of impairment of glomerular permeability in postoperative septic patients. *Intensive Care Med*, 26 (9):1364-1368.
- Dennhardt S, Finke KR, Huwiler A, Coldewey SM. 2019. Sphingosine-1-phosphate promotes barrier-stabilizing effects in human microvascular endothelial cells via AMPK-dependent mechanisms. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1865 (4):774-781.
- Dennhardt S, Finke KR, Huwiler A, Coldewey SM. 2020. Corrigendum to "Sphingosine-1-phosphate promotes barrier-stabilizing effects in human microvascular endothelial cells via AMPK-dependent mechanisms"

[Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis. 2019 Apr 1;1865(4):774-781].
Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis:165892.

- Di Giandomasso D, May CN, Bellomo R. 2003. Vital organ blood flow during hyperdynamic sepsis. *Chest*, 124 (3):1053-1059.
- Dudek SM, Camp SM, Chiang ET, Singleton PA, Usatyuk PV, Zhao Y, Natarajan V, Garcia JG. 2007. Pulmonary endothelial cell barrier enhancement by FTY720 does not require the S1P1 receptor. *Cell Signal*, 19 (8):1754-1764.
- Ertmer C, Rehberg S. 2016. [Pathophysiology of sepsis]. *Dtsch Med Wochenschr*, 141 (15):1067-1073.
- Escobar DA, Botero-Quintero AM, Kautza BC, Luciano J, Loughran P, Darwiche S, Rosengart MR, Zuckerbraun BS, Gomez H. 2015. Adenosine monophosphate-activated protein kinase activation protects against sepsis-induced organ injury and inflammation. *J Surg Res*, 194 (1):262-272.
- Ewart MA, Kohlhaas CF, Salt IP. 2008. Inhibition of tumor necrosis factor alpha-stimulated monocyte adhesion to human aortic endothelial cells by AMP-activated protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28 (12):2255-2257.
- Fleischmann C, Thomas-Rueddel DO, Hartmann M, Hartog CS, Welte T, Heublein S, Dennler U, Reinhart K. 2016. Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Dtsch Arztebl Int*, 113 (10):159-166.
- Fox ED, Heffernan DS, Cioffi WG, Reichner JS. 2013. Neutrophils from critically ill septic patients mediate profound loss of endothelial barrier integrity. *Crit Care*, 17 (5):R226.
- Frej C, Linder A, Happonen KE, Taylor FB, Lupu F, Dahlback B. 2016. Sphingosine 1-phosphate and its carrier apolipoprotein M in human sepsis and in Escherichia coli sepsis in baboons. *J Cell Mol Med*, 20 (6):1170-1181.
- Fujita T, Inoue K, Yamamoto S, Ikumoto T, Sasaki S, Toyama R, Chiba K, Hoshino Y, Okumoto T. 1994. Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in Isaria sinclairii metabolite. *J Antibiot (Tokyo)*, 47 (2):208-215.
- Garcia JGN, Liu F, Verin AD, Birukova A, Dechert MA, Gerthoffer WT, Bamberg JR, English D. 2001. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *Journal of Clinical Investigation*, 108 (5):689-701.
- Giaever I, Keese CR. 1991. Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (17):7896-7900.

- Gowans GJ, Hawley SA, Ross FA, Hardie DG. 2013. AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell Metab*, 18 (4):556-566.
- Gutsmann T, Muller M, Carroll SF, MacKenzie RC, Wiese A, Seydel U. 2001. Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. *Infect Immun*, 69 (11):6942-6950.
- Hanel P, Andreani P, Graler MH. 2007. Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB J*, 21 (4):1202-1209.
- Hardie DG. 2011. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev*, 25 (18):1895-1908.
- Hardie DG, Carling D. 1997. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem*, 246 (2):259-273.
- Hisano Y, Kobayashi N, Yamaguchi A, Nishi T. 2012. Mouse SPNS2 functions as a sphingosine-1-phosphate transporter in vascular endothelial cells. *PLoS One*, 7 (6):e38941.
- Hla T, Venkataraman K, Michaud J. 2008. The vascular S1P gradient-cellular sources and biological significance. *Biochim Biophys Acta*, 1781 (9):477-482.
- Hoste EA, Bagshaw SM, Bellomo R, Cely CM, Colman R, Cruz DN, Edipidis K, Forni LG, Gomersall CD, Govil D, Honore PM, Joannes-Boyau O, Joannidis M, Korhonen AM, Lavrentieva A, Mehta RL, Palevsky P, Roessler E, Ronco C, Uchino S, Vazquez JA, Vidal Andrade E, Webb S, Kellum JA. 2015. Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Med*, 41 (8):1411-1423.
- Imeri F, Schwalm S, Lyck R, Zivkovic A, Stark H, Engelhardt B, Pfeilschifter J, Huwiler A. 2016. Sphingosine kinase 2 deficient mice exhibit reduced experimental autoimmune encephalomyelitis: Resistance to FTY720 but not ST-968 treatments. *Neuropharmacology*, 105:341-350.
- Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, Gomez H, Kellum JA, Ospina-Tascon GA, Hernandez G, Murray P, De Backer D, Workgroup AX. 2016. The Endothelium in Sepsis. *Shock*, 45 (3):259-270.
- Ito K, Anada Y, Tani M, Ikeda M, Sano T, Kihara A, Igarashi Y. 2007. Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 357 (1):212-217.
- Jat PS, Noble MD, Ataliotis P, Tanaka Y, Yannoutsos N, Larsen L, Kioussis D. 1991. Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (12):5096-5100.

- Jeon SM. 2016. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp Mol Med*, 48 (7):e245.
- Jian MY, Alexeyev MF, Wolkowicz PE, Zmijewski JW, Creighton JR. 2013. Metformin-stimulated AMPK- α 1 promotes microvascular repair in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 305 (11):L844-855.
- KDIGO. 2012. Section 2: AKI Definition. *Kidney Int Suppl* (2011), 2 (1):19-36.
- Khan S, Lakhe-Reddy S, McCarty JH, Sorenson CM, Sheibani N, Reichardt LF, Kim JH, Wang B, Sedor JR, Schelling JR. 2011. Mesangial cell integrin α v β 8 provides glomerular endothelial cell cytoprotection by sequestering TGF- β and regulating PECAM-1. *Am J Pathol*, 178 (2):609-620.
- Kimura T, Sato K, Kuwabara A, Tomura H, Ishiwara M, Kobayashi I, Ui M, Okajima F. 2001. Sphingosine 1-phosphate may be a major component of plasma lipoproteins responsible for the cytoprotective actions in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem*, 276 (34):31780-31785.
- Kimura T, Tomura H, Sato K, Ito M, Matsuoka I, Im DS, Kuwabara A, Mogi C, Itoh H, Kurose H, Murakami M, Okajima F. 2010. Mechanism and role of high density lipoprotein-induced activation of AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *J Biol Chem*, 285 (7):4387-4397.
- Ksiazek M, Chacinska M, Chabowski A, Baranowski M. 2015. Sources, metabolism, and regulation of circulating sphingosine-1-phosphate. *J Lipid Res*, 56 (7):1271-1281.
- Langenberg C, Wan L, Egi M, May CN, Bellomo R. 2007. Renal blood flow and function during recovery from experimental septic acute kidney injury. *Intensive Care Med*, 33 (9):1614-1618.
- Levine YC, Li GK, Michel T. 2007. Agonist-modulated regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in endothelial cells. Evidence for an AMPK \rightarrow Rac1 \rightarrow Akt \rightarrow endothelial nitric-oxide synthase pathway. *J Biol Chem*, 282 (28):20351-20364.
- Lewis AJ, Seymour CW, Rosengart MR. 2016. Current Murine Models of Sepsis. *Surg Infect (Larchmt)*, 17 (4):385-393.
- Liu CH, Thangada S, Lee MJ, Van Brocklyn JR, Spiegel S, Hla T. 1999. Ligand-induced trafficking of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1. *Mol Biol Cell*, 10 (4):1179-1190.
- Lundblad C, Axelberg H, Grande PO. 2013. Treatment with the sphingosine-1-phosphate analogue FTY 720 reduces loss of plasma volume during experimental sepsis in the rat. *Acta Anaesthesiol Scand*, 57 (6):713-718.

- Maiden MJ, Otto S, Brealey JK, Finnis ME, Chapman MJ, Kuchel TR, Nash CH, Edwards J, Bellomo R. 2016. Structure and Function of the Kidney in Septic Shock. A Prospective Controlled Experimental Study. *Am J Respir Crit Care Med*, 194 (6):692-700.
- Malik FA, Meissner A, Semenkov I, Molinski S, Pasyk S, Ahmadi S, Bui HH, Bear CE, Lidington D, Bolz SS. 2015. Sphingosine-1-Phosphate Is a Novel Regulator of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Activity. *PLoS One*, 10 (6):e0130313.
- McBride A, Ghilagaber S, Nikolaev A, Hardie DG. 2009. The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. *Cell Metab*, 9 (1):23-34.
- McDonald DM, Thurston G, Baluk P. 1999. Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation. *Microcirculation*, 6 (1):7-22.
- Mehta D, Konstantoulaki M, Ahmmed GU, Malik AB. 2005. Sphingosine 1-phosphate-induced mobilization of intracellular Ca²⁺ mediates Rac activation and adherens junction assembly in endothelial cells. *J Biol Chem*, 280 (17):17320-17328.
- Messmer UK, Briner VA, Pfeilschifter J. 1999. Tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide induce apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells. *Kidney Int*, 55 (6):2322-2337.
- Michiels C. 2003. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol*, 196 (3):430-443.
- Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, Miller GF, Spiegel S, Proia RL. 2005. Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol*, 25 (24):11113-11121.
- Moussa MD, Santonocito C, Fagnoul D, Donadello K, Pradier O, Gaussem P, De Backer D, Vincent JL. 2015. Evaluation of endothelial damage in sepsis-related ARDS using circulating endothelial cells. *Intensive Care Med*, 41 (2):231-238.
- Murata N, Sato K, Kon J, Tomura H, Yanagita M, Kuwabara A, Ui M, Okajima F. 2000. Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem J*, 352 Pt 3:809-815.
- Naseem KM. 2005. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med*, 26 (1-2):33-65.
- Ni H, Chen J, Pan M, Zhang M, Zhang J, Chen P, Liu B. 2013. FTY720 prevents progression of renal fibrosis by inhibiting renal microvasculature endothelial dysfunction in a rat model of chronic kidney disease. *J Mol Histol*, 44 (6):693-703.
- Oo ML, Thangada S, Wu MT, Liu CH, Macdonald TL, Lynch KR, Lin CY, Hla T. 2007. Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate

receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor. *J Biol Chem*, 282 (12):9082-9089.

Opal SM, van der Poll T. 2015. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J Intern Med*, 277 (3):277-293.

Oppert M, Engel C, Brunkhorst FM, Bogatsch H, Reinhart K, Frei U, Eckardt KU, Loeffler M, John S, German Competence Network S. 2008. Acute renal failure in patients with severe sepsis and septic shock--a significant independent risk factor for mortality: results from the German Prevalence Study. *Nephrol Dial Transplant*, 23 (3):904-909.

Paugh SW, Payne SG, Barbour SE, Milstien S, Spiegel S. 2003. The immunosuppressant FTY720 is phosphorylated by sphingosine kinase type 2. *FEBS Lett*, 554 (1-2):189-193.

Peng X, Hassoun PM, Sammani S, McVerry BJ, Burne MJ, Rabb H, Pearse D, Tudor RM, Garcia JG. 2004. Protective effects of sphingosine 1-phosphate in murine endotoxin-induced inflammatory lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 169 (11):1245-1251.

Radeva MY, Waschke J. 2017. Mind the gap: mechanisms regulating the endothelial barrier. *Acta Physiol (Oxf)*.

Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Grundling M, John S, Kern W, Kreymann G, Kruger W, Kujath P, Marggraf G, Martin J, Mayer K, Meier-Hellmann A, Oppert M, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Seifert H, Spies C, Stuber F, Weiler N, Weimann A, Werdan K, Welte T, German Sepsis S, German Interdisciplinary Association of Intensive C, Emergency M. 2010. Prevention, diagnosis, therapy and follow-up care of sepsis: 1st revision of S-2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG)) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)). *Ger Med Sci*, 8:Doc14.

Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, Kumar A, Sevransky JE, Sprung CL, Nunnally ME, Rochweg B, Rubenfeld GD, Angus DC, Annane D, Beale RJ, Bellingham GJ, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith C, De Backer DP, French CJ, Fujishima S, Gerlach H, Hidalgo JL, Hollenberg SM, Jones AE, Karnad DR, Kleinpell RM, Koh Y, Lisboa TC, Machado FR, Marini JJ, Marshall JC, Mazuski JE, McIntyre LA, McLean AS, Mehta S, Moreno RP, Myburgh J, Navalesi P, Nishida O, Osborn TM, Perner A, Plunkett CM, Ranieri M, Schorr CA, Seckel MA, Seymour CW, Shieh L, Shukri KA, Simpson SQ, Singer M, Thompson BT, Townsend SR, Van der Poll T, Vincent JL, Wiersinga WJ, Zimmerman JL, Dellinger RP. 2017. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med*, 43 (3):304-377.

- Sakr Y, Dubois MJ, De Backer D, Creteur J, Vincent JL. 2004. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med*, 32 (9):1825-1831.
- Sanchez T, Hla T. 2004. Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J Cell Biochem*, 92 (5):913-922.
- Sanchez T, Estrada-Hernandez T, Paik JH, Wu MT, Venkataraman K, Brinkmann V, Claffey K, Hla T. 2003. Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced vascular permeability. *J Biol Chem*, 278 (47):47281-47290.
- Sarai K, Shikata K, Shikata Y, Omori K, Watanabe N, Sasaki M, Nishishita S, Wada J, Goda N, Kataoka N, Makino H. 2009. Endothelial barrier protection by FTY720 under hyperglycemic condition: involvement of focal adhesion kinase, small GTPases, and adherens junction proteins. *Am J Physiol Cell Physiol*, 297 (4):C945-954.
- Satchell SC, Braet F. 2009. Glomerular endothelial cell fenestrations: an integral component of the glomerular filtration barrier. *Am J Physiol Renal Physiol*, 296 (5):F947-956.
- Schlegel N, Waschke J. 2009. Impaired cAMP and Rac 1 signaling contribute to TNF-alpha-induced endothelial barrier breakdown in microvascular endothelium. *Microcirculation*, 16 (6):521-533.
- Schlegel N, Baumer Y, Drenckhahn D, Waschke J. 2009. Lipopolysaccharide-induced endothelial barrier breakdown is cyclic adenosine monophosphate dependent in vivo and in vitro. *Crit Care Med*, 37 (5):1735-1743.
- Selim S, Sunkara M, Salous AK, Leung SW, Berdyshev EV, Bailey A, Campbell CL, Charnigo R, Morris AJ, Smyth SS. 2011. Plasma levels of sphingosine 1-phosphate are strongly correlated with haematocrit, but variably restored by red blood cell transfusions. *Clin Sci (Lond)*, 121 (12):565-572.
- Shea BS, Brooks SF, Fontaine BA, Chun J, Luster AD, Tager AM. 2010. Prolonged exposure to sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists exacerbates vascular leak, fibrosis, and mortality after lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 43 (6):662-673.
- Shirwany NA, Zou MH. 2014. AMPK: a cellular metabolic and redox sensor. A minireview. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 19:447-474.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315 (8):801-810.

- Stapleton D, Woollatt E, Mitchelhill KI, Nicholl JK, Fernandez CS, Michell BJ, Witters LA, Power DA, Sutherland GR, Kemp BE. 1997. AMP-activated protein kinase isoenzyme family: subunit structure and chromosomal location. *FEBS Lett*, 409 (3):452-456.
- Stepanovska B, Lange AI, Schwalm S, Pfeilschifter J, Coldewey SM, Huwiler A. 2020. Downregulation of S1P Lyase Improves Barrier Function in Human Cerebral Microvascular Endothelial Cells Following an Inflammatory Challenge. *Int J Mol Sci*, 21 (4).
- Stolwijk JA, Matrougui K, Renken CW, Trebak M. 2015. Impedance analysis of GPCR-mediated changes in endothelial barrier function: overview and fundamental considerations for stable and reproducible measurements. *Pflugers Arch*, 467 (10):2193-2218.
- Sumida GM, Stamer WD. 2010. Sphingosine-1-phosphate enhancement of cortical actomyosin organization in cultured human Schlemm's canal endothelial cell monolayers. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51 (12):6633-6638.
- Sun X, Shikata Y, Wang L, Ohmori K, Watanabe N, Wada J, Shikata K, Birukov KG, Makino H, Jacobson JR, Dudek SM, Garcia JG. 2009. Enhanced interaction between focal adhesion and adherens junction proteins: involvement in sphingosine 1-phosphate-induced endothelial barrier enhancement. *Microvasc Res*, 77 (3):304-313.
- Suzuki S, Enosawa S, Kakefuda T, Shinomiya T, Amari M, Naoe S, Hoshino Y, Chiba K. 1996. A novel immunosuppressant, FTY720, with a unique mechanism of action, induces long-term graft acceptance in rat and dog allotransplantation. *Transplantation*, 61 (2):200-205.
- Takasu O, Gaut JP, Watanabe E, To K, Fagley RE, Sato B, Jarman S, Efimov IR, Janks DL, Srivastava A, Bhayani SB, Drewry A, Swanson PE, Hotchkiss RS. 2013. Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 187 (5):509-517.
- Tani M, Sano T, Ito M, Igarashi Y. 2005. Mechanisms of sphingosine and sphingosine 1-phosphate generation in human platelets. *J Lipid Res*, 46 (11):2458-2467.
- Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Lindenmeyer MT, Vielhauer V. 2013. Distinct contributions of TNF receptor 1 and 2 to TNF-induced glomerular inflammation in mice. *PLoS One*, 8 (7):e68167.
- Tauseef M, Kini V, Knezevic N, Brannan M, Ramchandaran R, Fyrst H, Saba J, Vogel SM, Malik AB, Mehta D. 2008. Activation of sphingosine kinase-1 reverses the increase in lung vascular permeability through sphingosine-1-phosphate receptor signaling in endothelial cells. *Circ Res*, 103 (10):1164-1172.

- Venkataraman K, Lee YM, Michaud J, Thangada S, Ai Y, Bonkovsky HL, Parikh NS, Habrukowich C, Hla T. 2008. Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circ Res*, 102 (6):669-676.
- Venkataraman K, Thangada S, Michaud J, Oo ML, Ai Y, Lee YM, Wu M, Parikh NS, Khan F, Proia RL, Hla T. 2006. Extracellular export of sphingosine kinase-1a contributes to the vascular S1P gradient. *Biochem J*, 397 (3):461-471.
- Wang L, Chiang ET, Simmons JT, Garcia JG, Dudek SM. 2011. FTY720-induced human pulmonary endothelial barrier enhancement is mediated by c-Abl. *Eur Respir J*, 38 (1):78-88.
- Wang L, Sammani S, Moreno-Vinasco L, Letsiou E, Wang T, Camp SM, Bittman R, Garcia JG, Dudek SM. 2014. FTY720 (s)-phosphonate preserves sphingosine 1-phosphate receptor 1 expression and exhibits superior barrier protection to FTY720 in acute lung injury. *Crit Care Med*, 42 (3):e189-199.
- Wang Z, Sims CR, Patil NK, Gokden N, Mayeux PR. 2015. Pharmacologic targeting of sphingosine-1-phosphate receptor 1 improves the renal microcirculation during sepsis in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, 352 (1):61-66.
- Wilkerson BA, Grass GD, Wing SB, Argraves WS, Argraves KM. 2012. Sphingosine 1-phosphate (S1P) carrier-dependent regulation of endothelial barrier: high density lipoprotein (HDL)-S1P prolongs endothelial barrier enhancement as compared with albumin-S1P via effects on levels, trafficking, and signaling of S1P1. *J Biol Chem*, 287 (53):44645-44653.
- Winkler MS, Martz KB, Nierhaus A, Daum G, Schwedhelm E, Kluge S, Graler MH. 2019. Loss of sphingosine 1-phosphate (S1P) in septic shock is predominantly caused by decreased levels of high-density lipoproteins (HDL). *J Intensive Care*, 7:23.
- Winkler MS, Nierhaus A, Holzmann M, Mudersbach E, Bauer A, Robbe L, Zahrte C, Geffken M, Peine S, Schwedhelm E, Daum G, Kluge S, Zoellner C. 2015. Decreased serum concentrations of sphingosine-1-phosphate in sepsis. *Crit Care*, 19:372.
- Xiong Y, Hla T. 2014. S1P control of endothelial integrity. *Curr Top Microbiol Immunol*, 378:85-105.
- Xu C, Wu X, Hack BK, Bao L, Cunningham PN. 2015. TNF causes changes in glomerular endothelial permeability and morphology through a Rho and myosin light chain kinase-dependent mechanism. *Physiol Rep*, 3 (12).
- Xu C, Chang A, Hack BK, Eadon MT, Alper SL, Cunningham PN. 2014. TNF-mediated damage to glomerular endothelium is an important determinant of acute kidney injury in sepsis. *Kidney Int*, 85 (1):72-81.

12 Anhang

12.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der glomerulären Filtrationsbarriere....	7
Abbildung 2: Übersicht über den Sphingosin-Metabolismus.....	9
Abbildung 3: Darstellung eines möglichen S1P/AMPK-Signalwegs mit endothelstabilisierenden Mechanismen.	17
Abbildung 4: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme von GEnC.	27
Abbildung 5: Schematische Darstellung der ECIS-Elektrode mit Endothelzellen.	32
Abbildung 6: Wachstum der GEnC im ECIS.	40
Abbildung 7: Einfluss eines inflammatorischen Stimulus auf die endotheliale Barriere.	43
Abbildung 8: Einfluss eines inflammatorischen Stimulus auf die Konfluenz der Zellschicht.	44
Abbildung 9: Einfluss eines Mediumwechsels auf den Resistenzverlust nach inflammatorischen Stimulus.	46
Abbildung 10: Einfluss von FTY720 auf den Resistenzabfall nach Behandlung mit dem inflammatorischen Stimulus.	48
Abbildung 11: FACS-Analyse der S1P ₁ -Expression auf GEnC.	50
Abbildung 12: Einfluss von S1P auf die AMPK-Phosphorylierung in GEnC.....	52

12.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien.....	21
Tabelle 2: Zellkulturreagenzien.	22
Tabelle 3: Stimulanzen.	22
Tabelle 4: Primärantikörper für FACS und Immunoblot.....	23
Tabelle 5: Sekundärantikörper für FACS und Immunoblot.	23
Tabelle 6: Puffer und Stammlösungen	24
Tabelle 7: Materialien.	25
Tabelle 8: Geräte.	25
Tabelle 9: Software/Programme.....	26
Tabelle 10: Zellkulturgefäße und genutzte Volumina.	28
Tabelle 11: Zusammensetzung des inflammatorischen Stimulus (LPS+Cyt) ...	30

12.3 Lebenslauf

Karl Robin Finke

Wissenschaftliche Publikationen und Vorträge

Originalpublikation:

"Sphingosine-1-phosphate promotes barrier-stabilizing effects in human microvascular endothelial cells via AMPK-dependent mechanisms."

Dennhardt, S.¹, Finke, K. R.¹, Huwiler, A., Coldewey, S. M.

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease 2019 1865 (4):774-781.doi: 10.1016/j.bbadis.2018.12.022.

¹ geteilte Erstautorschaft

Vortrag:

„Sphingosin-1-Phosphat vermittelt über AMPK-abhängige Mechanismen in humanen mikrovaskulären Endothelzellen Barriere-stabilisierende Effekte“

33. Wissenschaftliche Arbeitstage (WAT) der deutschen Gesellschaft für Anästhesie und Intensivmedizin (DGAI), 15/16.02.2019 Würzburg

Das Abstrakt wurde publiziert in Anästhesiologie & Intensivmedizin:

„Sphingosin-1-Phosphat vermittelt über AMPK-abhängige Mechanismen in humanen mikrovaskulären Endothelzellen Barriere-stabilisierende Effekte“

K.R. Finke¹, S. Dennhardt¹, A. Huwiler, S.M. Coldewey

Anästhesiologie & Intensivmedizin 2019;60:344-380.

¹ geteilte Erstautorschaft

Corrigendum betreffend die Originalpublikation

Corrigendum to "Sphingosine-1-phosphate promotes barrier-stabilizing effects in human microvascular endothelial cells via AMPK-dependent mechanisms."

[*Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2019 Apr 1;1865(4):774–781]

Dennhardt, S.¹, Finke, K. R.¹, Huwiler, A., Coldewey, S. M.

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease 2020;165892

doi:10.1016/j.bbadis.2020.165892

¹ geteilte Erstautorschaft

Erklärung zum Corrigendum betreffend die Originalpublikation

Das Corrigendum betrifft die Tabelle 11: Zusammensetzung des inflammatorischen Stimulus (Abschnitt 7.2, S.30). In dieser Arbeit werden die korrigierten Konzentrationsangaben dargestellt. Es wird versichert, dass diese Korrekturen nicht die wissenschaftlichen Aussagen der Originalpublikation oder dieser Arbeit beeinflussen.

Corrigendum to "Sphingosine-1-phosphate promotes barrier-stabilizing effects in human microvascular endothelial cells via AMPK-dependent mechanisms."

[*Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2019 Apr 1;1865(4):774–781]

Dennhardt, S.¹, Finke, K. R.¹, Huwiler, A., Coldewey, S. M.

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease 2020;165892

doi:10.1016/j.bbadis.2020.165892

¹ geteilte Erstautorschaft

12.4 Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken die mich bei der Durchführung der Versuche und Erstellung dieser Promotionsarbeit unterstützt haben. Besonderen Dank gilt:

Prof. Dr. Dr. Sina M. Coldewey für die Überlassung des Dissertationsthemas, die exzellente Betreuung, motivierenden Gespräche, Unterstützung in u. a. Stipendiums- und Kongressbewerbungen und der Korrektur des Manuskripts.

Sophie Dennhardt (Msc.), naturwissenschaftliche Doktorandin in der NWG Translational Septomics, für die Einarbeitung und Betreuung im Labor, die Zusammenarbeit im Rahmen der Publikationen, die kreativen und konstruktiven Gespräche sowie der Unterstützung bei der Erstellung des Manuskripts.

Dr. Bianka Wissuwa, Post-doc der NWG Translational Septomics, für die Mitbetreuung im Labor sowie das Korrekturlesen des Manuskripts.

Jefri Jeyapaul, naturwissenschaftlicher Doktorand der AG Gräler, für die Unterstützung bei der Durchflusszytometrie.

Prof. Dr. Michael Bauer, Direktor der Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin der Uniklinik Jena, als Zweitbetreuer der Arbeit.

Jaqueline Fischer, für die technische Unterstützung im Labor. Dem gesamten weiteren Team der NWG Translational Septomics für die gute Zusammenarbeit. Dem IZKF-Jena für das Promotionsstipendium während des Wintersemesters 17/18.

Weiterhin gilt ein besonderer Dank an meine Familie und Freunde, die mich in jedem Schritt unterstützen und motivieren. Danke!

12.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt haben und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Dr. Sina M. Coldewey, Sophie Dennhardt, Dr. Bianka Wissuwa,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Daten dieser Arbeit sind wie vorher beschrieben bereits in einer Publikation erschienen und an den Schlüsselstellen wird durch ein Zitat erneut darauf hingewiesen.

Jena, 30.07.2020

Karl Robin Finke