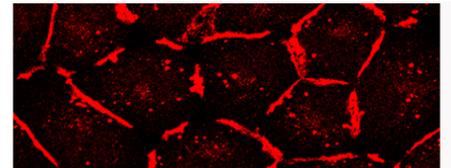
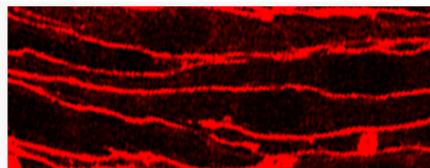
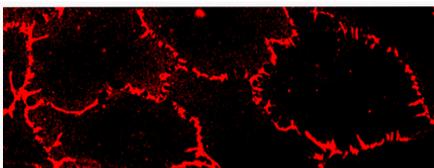
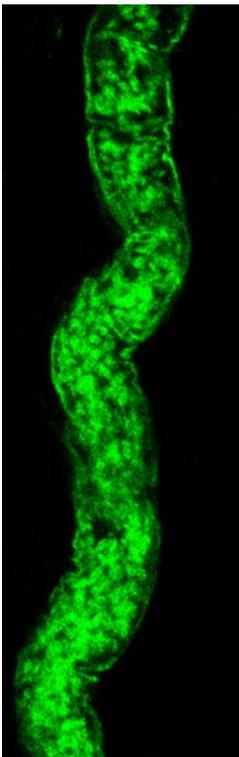


**Die Rolle und Mechanismen
der GTPasen Rac 1 und Rho A
in der Regulation der
Endothelbarriere**

Yvonne Baumer

2008



Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Lehrstuhl II, Vorstand/Betreuer: Prof. Dr. D. Drenckhahn

Betreuer: Prof. Dr. J. Waschke

und

Aus dem Institut für Biologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Dekan: Prof. Dr. M. J. Müller

Betreuer: Prof. Dr. T. Roitsch

Rolle und Mechanismen der GTPasen Rac 1 und Rho A in der Regulation der Endothelbarriere

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Yvonne Baumer
geboren in Meiningen

Würzburg im August 2008

Eingereicht am: 29.08.2008

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin J. Müller

Gutachter : Prof. Dr. Thomas Roitsch

Gutachter: Prof. Dr. Detlev Drenckhahn

Tag des Promotionskolloquiums: 26.01.2009

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Für meine Familie!

Jedes Wissen fordert ein zweites, ein drittes und immer so fort;
wir mögen den Baum in seinen Wurzeln oder in seinen Ästen und Zweigen
verfolgen, eins ergibt sich immer aus dem andern, und je lebendiger irgendein
Wissen in uns wird, desto mehr sehen wir uns getrieben, es in seinem
Zusammenhang auf- und abwärts zu verfolgen.

Johann Wolfgang von Goethe

(aus „Tages- und Jahreshefte 1807“)

1. ZUSAMMENFASSUNG	- 6 -
2. EINLEITUNG	- 11 -
2.1. Aufbau der Endothelbarriere	- 11 -
2.1.1. Occludenskontakte	- 12 -
2.1.2. Adhärenskontakte.....	- 14 -
2.1.3. Kommunikationskontakte.....	- 15 -
2.1.4. Weitere Adhäsionsmoleküle.....	- 16 -
2.1.5. Regulation der Zell-Zell-Adhäsion durch zytoplasmatische Adapterproteine	- 16 -
2.2. Das Zytoskelett von Endothelzellen	- 18 -
2.3. Familie der kleinen GTPasen	- 20 -
2.3.1. Ras als Prototyp der kleinen GTPasen	- 20 -
2.3.2. Rho- (Ras-Homologie Proteine) GTPasen	- 21 -
2.3.2.1. Funktionsprinzip.....	- 22 -
2.3.2.2. Struktur.....	- 23 -
2.3.2.3. Regulation.....	- 24 -
2.3.2.4. Regulation des Aktinzytoskeletts durch Rho-GTPasen	- 26 -
2.3.3. Rap 1	- 29 -
2.3.4. Aktivierung und Inhibition von Rho-GTPasen.....	- 32 -
2.3.4.1. Bakterielle Toxine	- 32 -
2.3.4.2. Transfektion mit DNA für konstitutiv aktive und inaktive GTPasen	- 33 -
2.4. Regulation der Endothelbarriere	- 34 -
2.4.1. Rolle der Rho-GTPasen.....	- 34 -
2.4.2. Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion durch cAMP	- 39 -
2.5. Zielsetzung der Arbeit	- 41 -
3. MATERIAL UND METHODEN	- 42 -
3.1. Material	- 42 -
3.1.1. Kulturzellen.....	- 42 -
3.1.2. Medien.....	- 42 -
3.1.3. Testreagenzien.....	- 43 -
3.1.4. Antikörper	- 44 -
3.1.5. Statistische Analyse.....	- 45 -
3.2. Methoden	- 46 -
3.2.1. Zellkultur.....	- 46 -
3.2.1.1. Vorbehandlung von Zellkulturmaterialien.....	- 46 -
3.2.1.2. PSEC-Präparation.....	- 47 -
3.2.1.3. Routinekulturen	- 47 -
3.2.1.4. Kryokonservierung von Zellen	- 49 -
3.2.1.5. Herstellung von Zelllysaten.....	- 50 -
3.2.2. Zellbiologische Methoden.....	- 50 -
3.2.2.1. Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	- 50 -
3.2.2.2. Proteinanalyse mittels Western Blot.....	- 51 -
3.2.2.3. Triton-vermittelte Proteinextraktion.....	- 54 -

3.2.2.4.	Messung der Aktivität von Rho-GTPasen mittels Pull Down-Assay	- 54 -
3.2.2.5.	Messung der Aktivität von Rho-GTPasen mittels GLISA.....	- 56 -
3.2.2.6.	Messung der cAMP-Konzentration	- 57 -
3.2.2.7.	Messung der zytoplasmatischen Ca ²⁺ -Konzentration mit FURA-2.....	- 58 -
3.2.2.8.	Permeabilitätsmessung mit Filtersystem	- 59 -
3.2.2.9.	Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TER)	- 60 -
3.2.2.10.	Laserpinzette.....	- 60 -
3.2.3.	Molekularbiologische Methoden.....	- 62 -
3.2.3.1.	Transformation von Bakterien mit Plasmiden	- 62 -
3.2.3.2.	Anzucht von Bakterien in Flüssigkulturen	- 63 -
3.2.3.3.	Anzucht von Bakterien auf Agarplatten	- 63 -
3.2.3.4.	Glycerinkulturen	- 63 -
3.2.3.5.	Isolierung doppelsträngiger Plasmid-DNA.....	- 64 -
3.2.3.6.	Transfektionsmethoden	- 67 -
3.2.4.	Einzelkapillarperfusion postkapillärer Venulen <i>in vivo</i>	- 69 -
4.	ERGEBNISSE	- 71 -
4.1.	Regulation der Endothelbarriere durch Rho-GTPasen in verschiedenen Endothelien	- 71 -
4.1.1.	Aktivierung der Rho-GTPasen durch CNF-1 in verschiedenen Endothelzellen	- 71 -
4.1.2.	Einfluss der Rho-GTPasen auf Adhärensjunktionen und Aktinzytoskelett.....	- 72 -
4.1.3.	Einfluss der Rho-GTPasen auf die Barrierefunktion <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	- 75 -
4.1.4.	Rolle der Rho-Kinase in der Regulation der Endothelbarriere.....	- 79 -
4.1.5.	Einfluss der Rho-GTPasen auf die Regulation der VE-Cadherin-vermittelten Adhäsion	- 82 -
4.2.	Die Rolle von Rac 1 in der durch cAMP vermittelten Stabilisierung der Endothelbarriere	- 84 -
4.2.1.	Stabilisiert die Endothelbarriere durch cAMP.....	- 84 -
4.2.2.	Einfluss von cAMP auf Adhärens- und Occludenskontakte	- 85 -
4.2.3.	Einfluss von cAMP auf die Aktivität von Rac 1 und Rho A.....	- 89 -
4.2.4.	Rolle von Rac 1 in der cAMP-vermittelten Stabilisierung der Endothelbarriere	- 92 -
4.3.	Die Rolle von cAMP und Rho-GTPasen bei dem Thrombin-vermittelten Zusammenbruch der Endothelbarriere	- 95 -
4.3.1.	Effekte von cAMP auf den Thrombin-induzierten Barrierezusammenbruch	- 95 -
4.3.2.	Mechanismen des Thrombin-induzierten Zusammenbruchs der Endothelbarriere	- 98 -
5.	DISKUSSION	- 104 -
5.1.	Effekte der Rho-GTPasen in der Regulation der Endothelbarriere sind zelltypabhängig	- 104 -
5.1.1.	Schwächung der Endothelbarrierefunktion durch Rho A.....	- 104 -
5.1.2.	Rac 1 und Cdc42 verstärken im mikrovaskulären Endothel die Barrierefunktion	- 105 -
5.1.3.	Mögliche Mechanismen der kleinen GTPasen in der Regulation der Endothelbarrierefunktion.....	- 106 -
5.2.	Rac 1 ist an den barriestabilisierenden Effekten von cAMP beteiligt	- 109 -
5.2.1.	cAMP-vermittelte Barriestabilisierung geht mit einer Umorganisation von Adhärens- und Occludensjunctionen einher	- 110 -
5.2.2.	cAMP induziert eine Endothelbarrierefestigung unter anderem durch Regulation der Aktivität der Rho-GTPasen.....	- 111 -
5.2.3.	cAMP-vermittelte Barriesteigerung wird sowohl durch den PKA-abhängigen als auch durch Epac/Rap 1-Signalweg vermittelt.....	- 114 -

5.3. Bedeutung von cAMP, Rac 1 und Rho A bei dem durch Thrombin induzierten Barrierezusammenbruch	- 115 -
5.3.1. Der Thrombin-induzierte Endothelbarrierezusammenbruch erfolgt durch Reduktion von cAMP	- 115 -
5.3.2. Rac 1 nimmt eine wesentliche Rolle in cAMP-vermittelten protektiven Effekten ein.....	- 116 -
5.4. Ausblick	- 119 -
6. LITERATURVERZEICHNIS	- 120 -
7. ANHANG	- 134 -
7.1. Chemikalienauflistung	- 134 -
7.2. Auflistung der Zusammensetzung von Lösungen und Puffer	- 138 -
7.3. Auflistung von Geräten und Verbrauchsmaterialien	- 141 -
7.3.1. Geräte	- 141 -
7.3.2. Verbrauchsmaterialien.....	- 143 -
7.4. Lebenslauf	- 145 -
7.5. Danksagung	- 146 -
7.6. Ehrenwörtliche Erklärungen	- 147 -
7.7. Publikationsliste	- 148 -

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase	gam	Goat anti-mouse
AJ	Adhärensjunktion	GAP	GTPase-activating protein
APS	Ammoniumperoxydisulfat	garb	Goat anti-rabbit
		gart	Goat anti-rat
BAPTA	1,2-bis(2-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'- tetraacetic acid	GDI	GDP-dissociation inhibitor
BSA	Bovines Serumalbumin	GDP	Guanosindiphosphat
		GEF	Guanotid exchange factor
Ca ²⁺	Calcium	GFP	Green-Fluorescent Protein
CAM	Cell adhesion molecule	GLISA	GTPase-linked
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat		Immunosorbent Assay
cm	Zentimeter	GTP	Guanosintriphosphat
CNF-1	Cytotoxic necrotizing factor 1	h	Stunde
CNFy	Cytotoxic necrotizing factor y	H ₂ O	Wasser
		HBSS	Hanks buffered salt solution
		HCl	Salzsäure
		HDMEC	Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen
Da	Dalton		
dag	Donkey anti-goat	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1- piperaziny)- ethansulfonsäure
DAG	Diacylglycerol		
DMEM	Dulbeccos modified eagle's medium	ICAM	Interzelluläres CAM
DMP	Dimethyl-Pimelimidat- Dihydrochlorid	IF	Immunfluoreszenz
DMSO	Dimethylsulfoxid	IQGAP 1	IQRas GTPase- aktivierendes Protein 1
DNA	Desoxyribonucleic acid/ Desoxyribonukleinsäure		
DTE/DTT	Dithiothreitol	kg	Kilogramm
		l	Liter
ECL	Enhanced chemoluminescence	LB	Lurani Bertani
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	Lp	Hydraulische Konduktivität
E-LISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	LPS	Lipopolysacharid
Epac	Exchange protein activated by cyclic AMP	LT	Letales Toxin
		M	Molar [g/mol]
F-Aktin	Filamentäres Aktin	MesEnd	Mikrovaskuläre mesenteriale Endothelzellen
FCS	Fetales Kälberserum		
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	min	Minute
FURA-2	Fluoreszierendes BAPTA	ml	Milliliter
		MLC	Myosin-Leichtketten
g	Gramm	MLCK	Myosin-Leichtketten- Kinase
g	Erdbeschleunigung (9,81m/s ²)	MLCP	MLC-Phosphatase

MyEnd	Mikrovaskuläre myokardiale Endothelzellen	Ras	Rat sarcoma
		Rho	Ras-Homologie-Protein
		rpm	Rounds per minute
		RT	Raumtemperatur
NDS	Normal donkey serum	SDS	Sodiumdodecylsulfat
NGS	Normal goat serum	sec	Sekunde
NPG	n-Propylgallat	siRNA	Silencing RNA
OD	Optische Dichte	TBS	Tris buffered saline
O-Me-cAMP	8-pCPT-2'-O-Me-cAMP	TEMED	N,N,N,N'- Tetramethyldiamin
P/S	PenicillinG/Streptomycin	TER	Transendothelialer elektrischer Widerstand
PAF	platelet-activating factor	TJ	Tight junctions/ Occludensjunctionen
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese	U	Unit (Enzymeinheit)
PAK	p21-aktivierte Kinase	VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
PAR 1	Protease-activated- receptor	VE-Cadherin	Vascular endothelial cadherin
PBS	Phosphate buffered saline	W	Watt
PECAM	platelet endothelial CAM	ZO	Zonula occludens-Protein
PFA	Paraformaldehyd	α MEM	α Modified eagle's medium
pH	pH-Wert		
PK	Proteinkinase		
PL	Phospholipase		
p-NPP	p-Nitrophenolphosphat		
PPL	Prestained protein ladder		
PSEC	Pulmonalearterielle Schweineendothelzellen		

1. Zusammenfassung

Endothelzellen kleiden als einschichtiger Zellverband das Innere der Blutgefäße aus und wirken als Barriere zwischen Blut und Interstitium. Entzündungen und Erkrankungen wie Lungenödem oder Arteriosklerose sind gekennzeichnet durch einen Zusammenbruch der Endothelbarriere. Erste Untersuchungen deuten auf eine bedeutende Rolle der GTPasen der Rho-Familie mit den Hauptvertretern Rho A, Rac 1 und Cdc42 als Regulatoren der Endothelbarriere hin. Bezüglich der Regulation der Endothelbarriereintegrität werden den GTPasen Rho A und Rac 1 meist antagonistische Funktionen zugeschrieben. Hierbei nimmt Rho A eine barriere destabilisierende und Rac 1 eine barriere stabilisierende Rolle ein. In einem ersten Teil dieser Dissertation wurde daher die Funktion der Rho-GTPasen Rho A, Rac 1 und Cdc42 für die Endothelbarriere in verschiedenen Endothelien untersucht. Hierzu wurden drei mikrovaskuläre Endothelzelltypen verschiedenen Ursprungs (Myokard, Mesenterium, Haut) sowie makrovaskuläre Endothelzellen der Pulmonalarterie mit GTPase-aktivierenden oder -inaktivierenden bakteriellen Toxinen behandelt. Messungen des transendothelialen Widerstandes, des FITC-Dextran-Flusses in Transwell-Filterstudien und der VE-Cadherin-vermittelten Adhäsion mit der Laserpinzettentechnik sowie Immunfluoreszenz-Studien dienten dabei als Auswertsysteme. Die Aktivierung von Rho A resultierte in allen Endothelzelltypen mit Ausnahme der mikrovaskulären myokardialen Endothelzellen in einem Zusammenbruch der Endothelbarriere. Die Aktivierung von Rac 1 und Cdc42 führte in allen Endothelzellarten zu einer Barriere stabilisierung. Darüber hinaus konnte in fast allen Endothelzelltypen durch pharmakologische Inhibition der Rho-Kinase eine Stabilisierung der Endothelbarriere induziert werden. Die Inaktivierung aller GTPasen sowie die alleinige Inaktivierung von Rac 1 führte zu einem kompletten Zusammenbruch der Endothelbarriere *in vitro*. Zudem ergaben *in vivo*-Experimente an perfundierten Rattenmesenterien eine gesteigerte Permeabilität nach Inaktivierung von Rho A, Rac 1 und Cdc42. Es lässt sich folgern, dass eine Rac 1-Aktivierung für die Aufrechterhaltung der Endothelbarriere notwendig ist, wohingegen ein negativer Einfluss der Aktivierung von Rho A auf die Endothelbarriereintegrität in den meisten Endothelzelltypen nachgewiesen wurde.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die cAMP-vermittelte Stabilisierung der Endothelbarriere genauer charakterisiert und dabei der Einfluss gesteigerter cAMP-Spiegel auf die Aktivität von Rho-GTPasen in humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen

untersucht. Hierbei wurde die cAMP-Konzentration zum einen durch den Einsatz einer Kombination aus dem Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin und dem Phosphodiesterase 4-Inhibitor Rolipram und zum anderen durch das cAMP-Analogon 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (O-Me-cAMP) gesteigert. O-Me-cAMP stellt hierbei einen selektiven Aktivator des cAMP nachgeschalteten Epac/Rap 1-Signalweges dar, wohingegen Forskolin/Rolipram durch die generelle cAMP-Steigerung zusätzlich die durch Proteinkinase A (PKA) vermittelten Signalwege stimuliert. Messungen des transendothelialen elektrischen Widerstandes zeigten nach cAMP-Anstieg in beiden Fällen eine Barrierestabilisierung, die mit den Effekten einer Aktivierung von Rac 1 vergleichbar waren. Dies ging mit Veränderungen der Organisation und der Morphologie von Zell-Zell-Kontakten einher. Zusätzlich kam es nach cAMP-Steigerung zu einer gesteigerten Rac 1-Aktivierung ohne Beeinflussung der Rho A-Aktivität. Darüber hinaus zeigten Endothelzellen nach cAMP-Anstieg die Bildung eines corticalen Aktinrings und verminderte Stressfaserbildung, was typische Indizien einer Aktivierung von Rac 1 sind. Um die Rolle von Rac 1 näher zu untersuchen, wurden Rac 1-Inhibitionsstudien durchgeführt. Die pharmakologische Inhibition der Rac 1-Aktivität resultierte in einer verminderten Endothelbarriereintegrität. Für beide cAMP-steigernden Mediatoren kann nach Kombinationsstudien angenommen werden, dass die durch cAMP-Steigerung vermittelten barrierestabilisierenden Effekte durch Rac 1 vermittelt zu sein scheinen. Somit kann aus den Untersuchungen des zweiten Teils dieser Arbeit geschlussfolgert werden, dass cAMP eine gesteigerte Endothelbarrierefunktion sowohl über PKA- als auch über Epac/Rap 1-abhängige Rac 1-Aktivierung vermittelt.

Um die Rolle der Rho-GTPasen und von cAMP während einer Barriere destabilisierung zu untersuchen, wurde im dritten Teil Thrombin als barriere destabilisierender physiologischer Mediator in humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen genutzt. Thrombin-Gabe führte zu einem reversiblen Zusammenbruch der Endothelbarriere mit deutlicher Lückenbildung und Stressfaserbildung nach 5 bis 15 min. Zu diesen Zeitpunkten kam es zu einer signifikanten Inhibition von Rac 1 und einer deutlichen Aktivierung von Rho A. Erst nach 15 min fielen die gesamtzellulären cAMP-Spiegel ab. Innerhalb von 60 min erholte sich die Endothelbarriere und Rac 1- bzw. Rho A-Aktivitäten sowie der cAMP-Spiegel erreichten wieder ihr Ausgangsniveau. Vorinkubation der Endothelzellen mit beiden cAMP-steigernden Mediatoren inhibierte den Thrombin-induzierten Barriere-zusammenbruch ebenso wie die Thrombin-vermittelten Veränderungen der Rac 1- und Rho A-Aktivitäten. Auch in diesem Zusammenhang durchgeführte Rac 1-

Inhibitionsstudien deuten darauf hin, dass die Hemmung der Thrombineffekte durch cAMP-Steigerung u.a. durch Aktivierung von Rac 1 vermittelt wird.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Aktivierung von Rho A in Zellrasen verschiedener Endothelzelltypen die Filtrationsbarriere destabilisiert, wohingegen Rac 1-Aktivierung in allen untersuchten Endothelzellarten eine Endothelbarrierestabilisierung vermittelte. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass sowohl die cAMP-induzierte Festigung der Endothelbarriere als auch ein durch Thrombin-Gabe verursachter Zusammenbruch der Barrierefunktion mit einer Aktivierung oder Inaktivierung von Rac 1 im Zusammenhang stehen.

Summary

Endothelial cells build a monolayer coating the inner surface of blood vessels and thereby form a dynamic barrier between plasma and interstitial space. Impaired endothelial barrier function can result in vascular diseases such as edema, atherosclerosis and inflammation. Small GTPases of the Rho family such as Rho A, Rac 1 and Cdc42 are well known regulators of endothelial barrier integrity. It is generally believed that Rho A and Rac 1 regulate endothelial barrier functions in antagonistic manner. According to this concept, Rho A destabilizes barrier integrity whereas Rac 1 enhances endothelial barrier properties. In a first step we investigated the role of Rho A, Rac 1 and Cdc42 in endothelial barrier regulation in four different types of endothelial cells. Microvascular endothelial cells of different origin (myocardium, mesentery and dermis) and macrovascular endothelial cells from pulmonary artery were treated with bacterial toxins to specifically activate or inactivate Rho GTPases. Effects on endothelial barrier functions were revealed by immunofluorescence microscopy, measurement of transendothelial electrical resistance and FITC-dextran flux as well as by quantification of VE-cadherin-mediated adhesion using laser tweezers. Activation of Rho A resulted in break-down of endothelial barrier functions in all endothelial cell types except microvascular myocardial endothelial cells. Activation of Rac 1 and Cdc42 as well as pharmacological inhibition of Rho kinase stabilized endothelial barrier function in all endothelial cell types. Moreover, inactivation of all three GTPases as well as inactivation of Rac 1 alone resulted in endothelial barrier-breakdown in all endothelial cell types. From these data we conclude that Rac 1 is a highly important regulator required for maintenance of endothelial barrier function.

In the second part of the study, we characterized the role of Rho GTPases in cAMP-mediated barrier stabilizing effects in microvascular endothelium. Therefore, we analyzed cAMP-induced effects on transendothelial electrical resistance, Rho GTPase activity and cell junction morphology in human dermal microvascular endothelial cells. To increase intracellular cAMP levels we used the cAMP-analogue 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (O-Me-cAMP) or combined treatment with adenylat cyclase-stimulating agent forskolin together with phosphodiesterase 4 inhibitor rolipram. In this approach O-Me-cAMP is used to selectively activate the Epac/Rap 1 pathway whereas forskolin/rolipram-induced increase of cAMP triggers both protein kinase A (PKA)- and Epac/Rap 1-dependent mechanisms. Measurement of transendothelial electrical resistance revealed barrier stabilizing effects of both Epac/Rap 1 and PKA signaling pathways. Barrier stabilization was accompanied by

changes in cell junction morphology and both O-Me-cAMP and forskolin/rolipram treatment strongly activated Rac 1 without affecting Rho A activity. Moreover, endothelial cells displayed changes in actin distribution and cortactin localization typical for activation of Rac 1. To investigate the role of Rac 1 activation in cAMP-mediated barrier stabilization we performed Rac 1 inhibition studies. Pharmacological inhibition of Rac 1 activity decreased transendothelial electrical resistance which was accompanied by formation of intercellular gaps. Under these conditions the efficacy of increased cAMP to stabilize endothelial barrier functions was reduced and O-Me-cAMP had no effect. This indicates that barrier-stabilizing effects of cAMP are at least in part mediated by Rac 1-dependent mechanisms which are induced via PKA and Epac/Rap 1 signaling.

Next, to address the importance of cAMP and of Rac 1 under conditions of impaired endothelial barrier integrity we used the physiological permeability-increasing mediator thrombin. Thrombin induced a transient breakdown of endothelial barrier function accompanied by increased stress fiber and gap formation in human dermal microvascular endothelial cells. Rac 1 was significantly inactivated whereas Rho A was strongly activated 5 and 15 min after thrombin treatment. Additionally, cAMP levels were decreased. After 60 min Rac 1 and Rho A activity as well as cAMP levels reached baseline values and endothelial barrier function was restored. Increase of cAMP completely blocked endothelial barrier breakdown and largely prevented thrombin-mediated effects on Rac 1 and Rho A activity indicating that reduction of cAMP was the primary mechanism causing the thrombin response. When Rac 1 was inactivated in parallel, both O-Me-cAMP and forskolin/Rolipram were not effective to prevent thrombin-induced endothelial barrier breakdown.

Taken together, these data demonstrate that Rho A activation leads to barrier destabilization in many endothelial cell types whereas Rac 1 activation is required for barrier stabilization in all endothelial cells. Moreover, the well-established barrier-stabilizing effects of cAMP as well as thrombin-induced endothelial barrier breakdown are at least in part mediated by activation and inhibition of Rac 1.

2. Einleitung

Endothelzellen bilden einen kontinuierlichen einschichtigen Zellverband, der Blutgefäße auskleidet. Sie erfüllen somit eine Barrierefunktion zwischen Blut und umliegendem Gewebe, dem Interstitium. Ebenso sind sie für einen selektiven transmembranären und transzellulären Stofftransport verantwortlich (Mehta and Malik, 2006; Vandenbroucke et al., 2008).

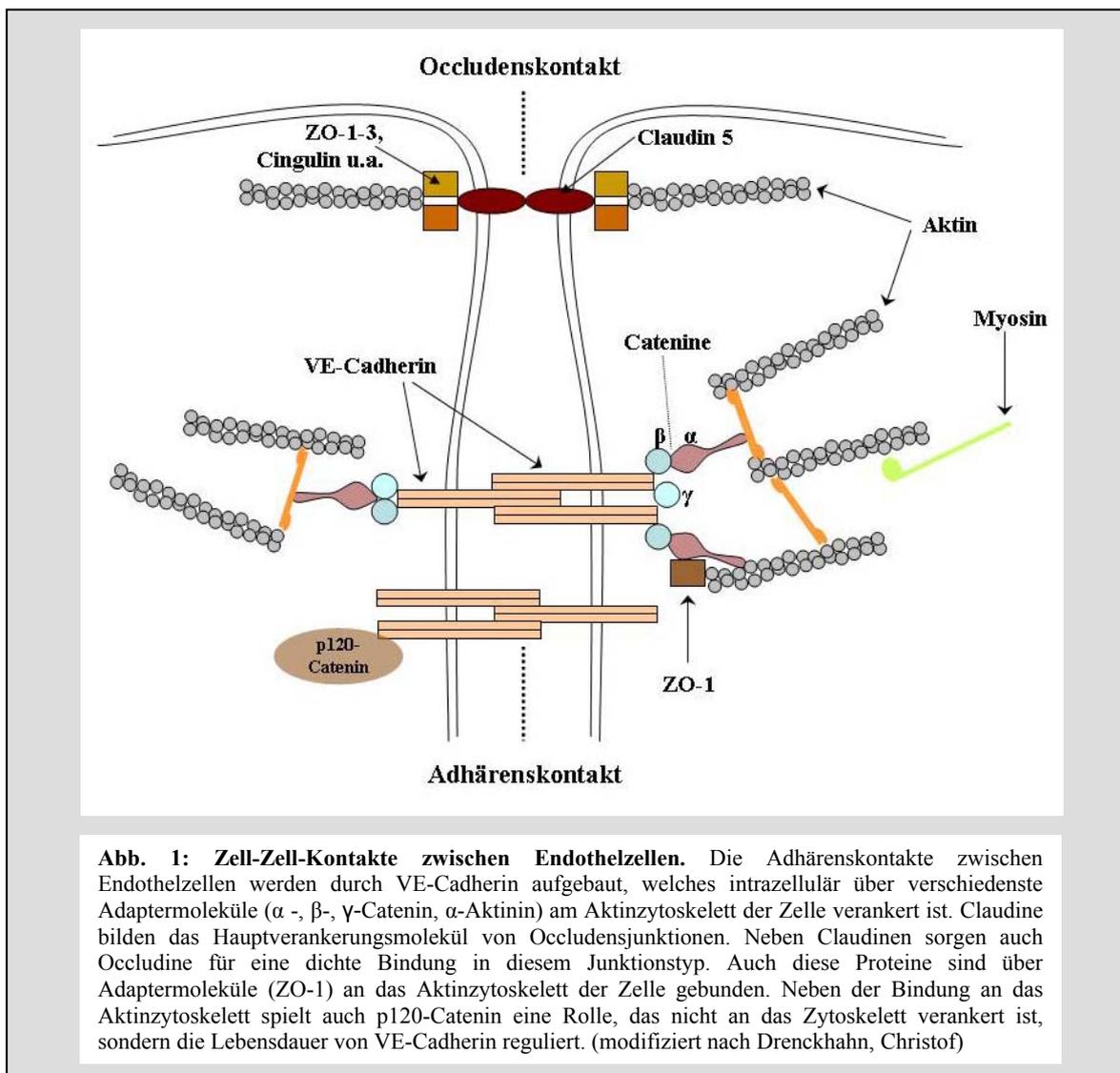
Die Aufrechterhaltung der endothelialen Barrierefunktion ist für einen gesunden Organismus grundlegend. Sie muss einerseits mechanischen Beanspruchungen von Blutdruck und Scherkräften standhalten, andererseits müssen parazelluläre Transportvorgänge oder Zellmigration kontrolliert ablaufen können. Eine gestörte Funktion und Regulation der Endothelbarriere führt im Rahmen verschiedenster Krankheitsbilder wie Lungenödem (Dudek and Garcia, 2001), Entzündung (Mehta and Malik, 2006; Michel and Curry, 1999), Arteriosklerose (Libby et al., 2006) und Diabetes (Kim et al., 2006) zu teilweise lebensbedrohlichen Zuständen. Aus diesem Grund sind genaue Kenntnisse über Bau, Funktion und Regulation der Endothelbarriere notwendig.

2.1. Aufbau der Endothelbarriere

Die Endothelbarriere wird im Wesentlichen durch Occludenskontakte und Adhärenskontakte aufgebaut (Abb. 1). Im Gegensatz zu Epithelzellen sind in Endothelzellen diese beiden Arten der Kontakte nicht streng voneinander getrennt, sondern wechseln sich entlang der Membran ab (Dejana, 2004).

Neben den Zell-Zell-Kontakten kommen auch Zell-Matrix-Kontakte vor, die indirekt auch die Barriereigenschaften des Endothels beeinflussen. Hier dienen Integrine als Adhäsionsbrücke zur extrazellulären Matrix (Mehta and Malik, 2006).

Durch ihren zytoplasmatischen Anteil binden alle junktionalen Adhäsionsmoleküle über intrazelluläre Adapterproteine an das Zytoskelett. Diese enge Verbindung zwischen Aktinzytoskelett und endothelialen Junktionen ermöglicht nicht nur deren feste Verankerung, sondern auch die Regulation der Barrierefunktion. Somit spielt auch das Aktinzytoskelett für die Aufrechterhaltung und Regulation der Endothelbarriere eine entscheidende Rolle (Mehta and Malik, 2006; Vandenbroucke et al., 2008).



2.1.1. Occludenskontakte

Die Occludenskontakte (tight junctions) dichten den Interzellularspalt so weit ab, dass selbst kleine hydrophobe Moleküle diese Grenze nur schlecht passieren können (Navarro et al., 1995; Wolburg and Lippoldt, 2002). Da die Organisation der Junctionen entsprechend der Bedürfnisse der benötigten Endothelbarriere im Blutgefäßsystem variiert, sind Occludenskontakte in der Blut-Hirn-Schranke sehr komplex, dafür aber in postkapillären Venulen weniger gut organisiert.

Die Adhäsion der Zonula occludens wird in Endothelzellen durch Proteine der Claudin-Familie (Claudin1, 5 und 12), durch Occludin, durch JAMs (junctional adhesion molecules A, B und C) und durch ESAM (endothelial selective adhesion molecule) gewährleistet.

Occludin war das erste in Occludensjunctionen identifizierte Junctionsprotein (Furuse et al., 1993). Es besitzt vier transmembranäre Domänen mit zwei extrazellulären Schleifen. Das N- und das C-terminale Ende befinden sich im Zytoplasma.

Claudine sind kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von 20-24 kDa, welche ebenfalls zwei extrazelluläre Domänen und vier Transmembrandomänen mit zytoplasmatisch lokalisierten N- und C-Termini besitzen. Der C-Terminus der meisten Claudine endet mit einer sogenannten PDZ-Bindedomäne, welche eine direkte Interaktion mit intrazellulären Adapterproteinen (ZO-1, -2 und -3) ermöglicht. Es wurden bislang mehr als 24 Mitglieder der Claudinfamilie identifiziert (Förster, 2008). Die Wichtigkeit der Claudine zeigt sich darin, dass eine Defizienz von Claudin 5 mit einer Letalität in den ersten 10 Stunden nach der Geburt einhergeht (Nitta et al., 2003) und Claudin 1-defiziente Mäuse innerhalb von 24 Stunden nach Geburt versterben (Furuse et al., 2002).

JAMs, die sowohl in Occludens- als auch Adhärensjunctionen vorkommen, sind transmembranäre Ca^{2+} -unabhängige Adhäsionsmoleküle. Sie gehören zu den Ig-ähnlichen Adhäsionsmolekülen, die extrazellulär homophile cis-Dimere und trans-Dimere ausbilden. Intrazellulär sind JAMs mit ZO-1 und Cingulin kolokalisiert. Des Weiteren binden sie an partitioning-defective (PAR) Proteine. PAR-3, auch bekannt als atypische Proteinkinase C (aPKC), und PAR-6 sind in der Lage, Signalkomplexe mit den kleinen GTPasen Rac 1 und Cdc42 zu bilden (Ebnet, 2008). JAM-2 und JAM-3 sind ebenfalls direkt mit PAR3 assoziiert (Miyoshi and Takai, 2005).

ESAM (endothelial cell selective adhesion molecule) gehört zu der Immunglobulin-Familie und ist ein weiteres Transmembranprotein der Occludenskontakte, welches homophile Bindungen ausbildet (Hirata et al., 2001; Nasdala et al., 2002). ESAM interagiert mit MAGI-1 (membrane-associated guanylate kinase) über eine PDZ-Domäne. Des Weiteren kolokalisiert ESAM mit MAGI-1 an Zell-Zell-Kontakten, so dass vermutet werden kann, dass ESAM MAGI-1 an die Zell-Zell-Konakte rekrutiert (Wegmann et al., 2004). MAGI-1 wiederum kann z.B. RapGAP, ein GAP für Rap, und mNet1, ein GEF für Rho-GTPasen binden und somit barriereregulatorische Aufgaben erfüllen. Allerdings sind ESAM-defiziente Mäuse phänotypisch normal und lebensfähig (Ishida et al., 2003).

2.1.2. Adhärenskontakte

Adhärenskontakte sind für die mechanische Stabilität endothelialer Junctionen verantwortlich und ubiquitär vorhanden. Das spezifisch in Endothelzellen vorkommende Adhäsionsmolekül dieser Kontaktart ist VE-Cadherin (vascular endothelial cadherin; auch Cadherin 5). Neben VE-Cadherin besitzen Endothelzellen auch N-Cadherin, das normalerweise überwiegend in Nerven- und Muskelzellen vorzufinden ist. Allerdings ist N-Cadherin nicht in den Junctionen lokalisiert, sondern diffus in der gesamten Zellmembran verteilt. N-Cadherin ist wohl für die Haftung mit Perizyten und Muskelzellen nötig (Dejana et al., 1995). Darüber hinaus nehmen auch Proteine des Nektin-Afadin-Komplexes an Adhärensjunctionen teil (Ebnet, 2008).

VE-Cadherin ist für die Bildung der Endothelbarriere maßgeblich (Dejana et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass in vivo Antikörper gegen VE-Cadherin zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität führen (Corada et al., 1999; Corada et al., 2001; Gotsch et al., 1997). In vitro konnten durch Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von VE-Cadherin in konfluenten Endothelzellen Lückenbildung und eine gesteigerte Permeabilität für Makromoleküle gemessen werden (Gulino et al., 1998). VE-Cadherin-defiziente Mäuse sind daher embryonal letal (Vittet et al., 1997).

VE-Cadherin bildet mit seiner extrazellulären Domäne Ca^{2+} -abhängige homophile Bindungen aus (Angst et al., 2001; Hirano et al., 1987; Takeichi, 1988). Die intrazelluläre Domäne von VE-Cadherin besitzt zwei funktionelle Domänen: die juxtamembranäre Domäne (JMD) und die C-terminale Domäne (CTD). Über die JMD bindet VE-Cadherin an p120-Catenin, wohingegen der C-Terminus an β - und γ -Catenin (Plakoglobin) bindet (Vandenbroucke et al., 2008). β - und γ -Catenin binden danach wiederum an α -Catenin, welches neben anderen Proteinen den Cadherin/Catenin-Komplex an das Aktinzytoskelett bindet (Mehta and Malik, 2006).

VE-Cadherin kann mit seiner extrazellulären Domäne an eine Phosphatase, die VE-PTP (vascular endothelial protein tyrosine phosphatase), binden, welche die Phosphorylierung von Cadherinen und Cateninen reguliert und somit die Barrierepermeabilität kontrolliert (Dejana, 2004). Da ein Ausschalten der VE-PTP Expression in Endothelzellen zu gesteigerter Permeabilität führt (Vestweber, 2008), wird die Hypothese unterstützt, dass Tyrosinphosphorylierungen des VE-Cadherin/Catenin-Komplexes in die VE-Cadherin-vermittelte Regulation der Zelladhäsion verwickelt sind.

Eine wichtige Rolle in Adhärensjunktionen spielt neben dem Cadherin/Catenin-System auch das Nektin/Afadin-System. Lange Zeit wurde das Nektin/Afadin-System besonders für epithelialen Zellen als wichtig angesehen, aber auch in endothelialen Zellen scheint es eine wesentliche Rolle im Aufbau der Endothelbarriere einzunehmen (Dejana, 2004). Nektine sind Proteine der Immunglobulinfamilie, die Ca^{2+} -unabhängige homophile oder heterophile Adhäsion vermitteln (Sakisaka et al., 2007). Im Zellinneren sind sie an Afadin (AF6) gebunden. Afadin wiederum kann zum einen direkt an F-Aktin binden und zum anderen kann es indirekt über Ponsin an Vinculin an F-Aktin binden (Ebnet, 2008; Takahashi et al., 1999). Nektin und Afadin binden zudem an ZO-1 und JAMs, so dass eine Rolle des Nektin/Afadin-Systems in der Regulation von Occludensjunkten möglich ist. Darüber hinaus kann Afadin auch an α -Catenin binden, was eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Adhärensjunktionsklassen möglich erscheinen lässt. Ähnlich zu den Cadherinen können Nektine Cdc42 und Rac 1 aktivieren. Die Transinteraktion von Nektinen resultiert in einer Aktivierung und Rekrutierung der Src-Kinase, welche eine Aktivierung von GEFs der GTPasen Rac 1 und Cdc42, wie FRG und Vav2, nach sich zieht (Fukuhara et al., 2003; Fukuhara et al., 2004; Honda et al., 2003; Kawakatsu et al., 2005).

2.1.3. Kommunikationskontakte

Die Kommunikationskontakte der Endothelzellen sind gap junctions (GJ), die elektrische und metabolische Kommunikation ermöglichen. Sie sind durch Connexine (Cx) gebildete transmembranäre Verbindungen. Als Connexon bezeichnet man den porenbildenden Komplex aus jeweils sechs Connexin-Molekülen. In Endothelzellen kommen Cx37, Cx40 und Cx43 vor (van Rijen et al., 1997; van Rijen et al., 1998). Zwei Connexone bilden einen GJ-Kanal, der die Membranen zweier aneinandergrenzender Zellen durchquert und so die Zytoplasmen zweier benachbarter Zellen miteinander verbindet. Einige hundert GJ-Kanäle bilden gemeinsam die GJ, die den Austausch von Ionen und kleinen Molekülen zwischen Nachbarzellen ermöglicht. So werden GJs genutzt, um vor allem intrazelluläre Botenstoffe wie Ca^{2+} und IP_3 auszutauschen (Beyer et al., 2000; Moerenhout et al., 2001). GJs werden vor allem durch Serin/Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierungen reguliert. Studien haben gezeigt, dass alleiniges Fehlen von Cx37 oder Cx40 zu keinen phänotypischen Veränderungen führte, eine Doppel-Defizienz allerdings bereits perinatal letal war (Mehta and Malik, 2006; Simon and McWhorter, 2002).

2.1.4. Weitere Adhäsionsmoleküle

Ein Junctionsprotein, das keiner der bisher genannten Gruppen zuzuordnen ist, ist das platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM), ein Mitglied der Immunglobulin-Familie von Transmembranproteinen. PECAM-1 interagiert mit der Tyrosin-phosphorylierten Form von β -Catenin. Möglicherweise moduliert PECAM-1 als Reservoir zur Bereitstellung von β -Catenin die AJ. PECAM-1-defiziente Mäusen wiesen eine verlangsamte Erholung der Endothelbarrierefunktion nach Histamingabe auf (Graesser et al., 2002), so dass es nahe liegt, dass PECAM eine Rolle bei der Wiederherstellung der Endothelbarriere zukommt. Ebenso spielt PECAM bei der Leukozytenmigration eine Rolle, da es ein Ligand für $\alpha_v\beta_3$ -Integrin der Leukozyten ist (Mehta and Malik, 2006).

2.1.5. Regulation der Zell-Zell-Adhäsion durch zytoplasmatische Adapterproteine

Adapterproteine der endothelialen Junctionen binden üblicherweise an das C-terminale Ende der CAMs im Zytoplasma und verbinden diese direkt oder indirekt mit dem Aktin-Zytoskelett der Zelle.

ZO-Proteine verbinden die Adhäsionsproteine der Occludensjunctionen mit dem perijunctionalen Aktin-Myosin-Ring. ZO-1 ist ein 220 kDa großes Protein, das drei PDZ-Domänen, eine Src-homology (SH)-3-Domäne und eine inaktive Guanylatkinasedomäne besitzt. ZO-Proteine binden verschiedene weitere Proteine, die die Dynamik von Occludensjunctionen beeinflussen. So assoziiert ein ZO-1-Nukleinsäure-bindendes Protein (ZONAB) mit der SH3-Domäne von ZO-1. Ebenso binden Nektin/Afadin-Kontakte an ZO-1 und stellen somit eine Verbindung zwischen Adhärens- und Occludenskontakten her (Miyoshi and Takai, 2005; Sakisaka et al., 2007). ZO-1 geht aber nicht nur Verbindungen mit TJ-Proteinen ein, es bindet auch an α -Catenin, Connexine und vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) (Comerford et al., 2002; Lee et al., 2006; Miyoshi and Takai, 2005). Obwohl diese Interaktionen bislang nur unvollständig verstanden sind, legen sie die Wichtigkeit von ZO-1 in der Organisation der Zell-Zell-Kontakte und somit auch in der Kontrolle der Endothelpermeabilität nahe.

Catenine sind eine weitere Gruppe von zytoplasmatischen Adapterproteinen. α -Catenin reguliert die Anordnung vieler Proteine, die den Cadherin/ β -Catenin-Komplex mit dem Aktinzytoskelett verbinden. α -Catenin kann mittels seiner C-terminalen Domäne direkt mit

F-Aktin, Afadin, Vinculin und Proteinen der Zyxin-Familie interagieren. Derartige direkte Interaktionen führen zu einer nachfolgenden Rekrutierung weiterer Proteine an die Adhärensjunktionen, wie zum Beispiel auch Ena/VASP. Die direkte Bindung von α -Catenin an Vinculin und α -Aktinin stabilisiert die Verankerung der AJ am Aktinzytoskelett (Bazzoni and Dejana, 2004). Allerdings wurde in den letzten Jahren zunehmend deutlich, dass die Bindung von α -Catenin an den β -Catenin/Cadherin-Komplex keine statische Verbindung, sondern eher eine dynamische Interaktion darstellt. So zeigen Befunde aus dem Labor um Nelson, dass α -Catenin nicht gleichzeitig an den β -Catenin/Cadherin-Komplex und direkt an F-Aktin binden kann (Drees et al., 2005; Yamada et al., 2005). Man geht nunmehr davon aus, dass α -Catenin ständig wechselnd entweder an den β -Catenin/Cadherin-Komplex oder an das Aktinzytoskelett der Zelle gebunden ist (Drees et al., 2005; Yamada et al., 2005). α -Catenin kommt im Rahmen dieser neuen Beobachtungen eine regulatorische Funktion bezüglich der Aktindynamiken u.a. über den Arp2/3-Komplex und über Ena/VASP-Proteine zu (Gates and Peifer, 2005). β -Catenin ist neben der Funktion der Verankerung der Cadherine auch in den Wnt-Signalweg involviert (Erez et al., 2005). Der Wnt-Signalweg stellt einen von vielen Signaltransduktionswegen dar, durch die Zellen auf äußere Signale reagieren. Zahlreiche Proteine sind an diesem Signalweg beteiligt. So bindet während der Embryonalentwicklung Wnt an seinen Rezeptor, was zur Inaktivierung der Glykogen-Synthase-Kinase (GSK-3) führt und letztlich den proteosomalen Abbau von β -Catenin inhibiert (Lampugnani and Dejana, 1997). Somit kann β -Catenin in den Zellkern wandern und mit TCF einen Protein-Komplex bilden und so spezifische Zielgene aktivieren (Eisenmann, 2005).

p120-Catenin reguliert die Zell-Zell-Adhäsion vor allem indem es die Lebensdauer von VE-Cadherin und die Lokalisation von VE-Cadherin auf der Zelloberfläche steuert (Reynolds, 2007). Dies könnte angesichts der Tatsache, dass viele Entzündungsmediatoren wie Histamin, Thrombin und LPA die PKC-vermittelte Phosphorylierung von p120-Catenin modulieren, bei der Aufrechterhaltung der Endothelbarriere wichtig sein (Miyoshi and Takai, 2005; Reynolds, 2007). p120-Catenin kann p190RhoGAP rekrutieren und somit eine Inaktivierung von Rho A bewirken (Anastasiadis and Reynolds, 2001). Darüber hinaus kann es zudem Rac 1 und Cdc42 aktivieren (Grosheva et al., 2001; Noren et al., 2000). Möglicherweise stellt p120-Catenin somit einen der wichtigsten Regulatoren der Interaktionen zwischen Cadherinen, Kinasen und Rho-GTPasen dar, wodurch über den Phosphorylierungsstatus der Cadherine die Zelladhäsion beeinflusst wird (Reynolds, 2007).

Die Wichtigkeit von p120-Catenin in einem Organismus zeigt auch der Befund, dass p120-Catenin-defiziente-Mäuse embryonal letal sind (Perez-Moreno et al., 2006).

Afadin ist ein F-Aktin bindendes Protein, dass Nektine an das Aktin-Zytoskelett der Zelle bindet. Afadin kann durch indirekte oder auch direkte Interaktion mit ZO-1 und α -Catenin Occludens- und Adhärensjunktionen an Nektin-basierte Zell-Zellverbindungen rekrutieren. Allerdings ist die genaue Rolle der Nektin-Afadin-Kontakte in der Aufrechterhaltung der Endothelbarriere bislang unbekannt (Mehta and Malik, 2006).

Ein weiteres AJ-bindendes Scaffoldprotein ist *IQRas GTPase-aktivierendes Protein-1* (IQGAP-1), welches an Aktin, aktives Rac 1 und Cdc42, β -Catenin und Calmodulin bindet (Briggs and Sacks, 2003). In epithelialen Zellen konnte gezeigt werden, dass IQGAP die E-Cadherin-Adhäsion reduziert und die Permeabilität steigerte. Aktives Rac 1 und Cdc42 verhinderten eine Interaktion zwischen IQGAP-1 und β -Catenin, was die Schlussfolgerung zulässt, dass Rac und Cdc42 die Barriere durch diesen Mechanismus stabilisieren könnten (Kuroda et al., 1996).

2.2. Das Zytoskelett von Endothelzellen

Das Zytoskelett ist für die mechanische Stabilisierung einer Zelle und ihrer äußeren Form verantwortlich. Des Weiteren dient es der aktiven Bewegung einer Zelle und es vermittelt Transportvorgänge und Signale innerhalb der Zellen (Drenckhahn, 2003). Es handelt sich nicht um ein Gerüst einer Zelle, sondern ist vielmehr variabel und anpassungsfähig. Es unterstützt so zum Beispiel die Ausbildung von speziellen Zellfortsätzen wie Mikrovilli und Zilien. Das Zytoskelett ist aus spezialisierten auf- und abbaubaren Strukturproteinen, die sich zu feinen Fäden (Filamente) zusammenlagern (polymerisieren), aufgebaut. Durch derartige Polymerisierungsprozesse kann sich innerhalb einer Zelle ein ganzes Netzwerk bilden. Die Strukturen des Zytoskeletts sind zumeist mit Adapterproteinen assoziiert, die die Filamente verstärken, sich entlang der Filamente bewegen oder mit Strukturen verbinden.

In eukaryotischen Zellen werden drei verschiedene Zytoskelettfilamente unterschieden: die Aktinfilamente, die Intermediärfilamente und Mikrotubuli.

Mikrotubuli sind Hohlzylinder mit einem Durchmesser von 25 nm, die sich aus Tubulin zusammensetzen. Intrazellulär sind sie für längere Transportvorgänge und die Bewegung

bzw. die Befestigung von Organellen im Zytosol verantwortlich. Sie sind weniger an der mechanischen Stabilisierung der Zelle beteiligt. In manchen Zellen sind sie am Aufbau von Kinozilien beteiligt. Mikrotubuli sind an der Regulation der Endothelbarriereintegrität beteiligt. So führt die Destabilisierung von Mikrotubuli zu einer Aktivierung von Rho A (Birukova et al., 2004a; Birukova et al., 2004d; Birukova et al., 2005; van Horck et al., 2001) zum einen über die Aktivierung von p190RhoGEF (van Horck et al., 2001) oder über p115RhoGEF und die p38 mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK) (Birukova et al., 2004a; Birukova et al., 2004d; Birukova et al., 2005), was möglicherweise in Stressfaserbildung und gesteigerter Kontraktilität resultiert. Studien haben zudem gezeigt, dass der durch Thrombin induzierte Anstieg der endothelialen Permeabilität teilweise abhängig von dem Polymerisationsstatus der Mikrotubuli in Endothelzellen ist (Birukova et al., 2004a). Darüber hinaus nehmen Mikrotubuli durch ihre Wechselwirkung mit z.B. p120-Catenin am Transport von Cadherinen und anderen an Junctionen beteiligten Proteinen teil (Ichii and Takeichi, 2007).

Intermediärfilamente stehen mit ihrem Durchmesser von 8-10 nm zwischen Mikrotubuli und Aktinfilamenten. Ihre genaue Funktion für die Regulation der Endothelbarriere ist unbekannt, allerdings wird ihnen eine passive mechanische Stützfunktion zugeschrieben (Mehta and Malik, 2006).

Aktinfilamente sind Fasern mit einem Durchmesser von 7 nm bestehend aus Aktin. Aktin ist mit ca. 10 % (abhängig von Zelltyp) der Gesamtproteinmenge das am stärksten exprimierte Protein im Zytoplasma von eukaryotischen Zellen. F-Aktin (Mikrofilamente) setzen sich aus Aktinmonomeren (G-Aktin) durch Polymerisation zusammen. Sie dienen hauptsächlich der Stabilisierung der äußeren Form einer Zelle und halten membranständige Proteine an ihrem Platz, so auch die Adhärensjunktionsproteine. Wichtige an Aktinfilamente assoziierte Proteine sind α -Aktinin, Spectrin und Filamin. Verzweigungen der Aktinfilamente können durch den Arp2/3-Komplex induziert werden. Ein Zusammenwirken mit dem Motorprotein Myosin führt zur Bildung kontraktile Filamentbündel (Stressfasern). Ebenso dienen Stressfasern u.a. der Stabilisierung der Zelle gegen externe Zugkräfte. An bestimmten Regionen ist das Aktinzytoskelett der Zelle mit der extrazellulären Matrix verbunden. In diese fokalen Kontakte sind Aktinfilamente unter Zwischenschaltung von Adapterproteinen an Integrinen verankert. Ähnlich sind auch Kontakte von Aktin mit Adhärensjunctionen verbunden.

Wie wichtig das Zytoskelett einer Zelle für eine intakte Barrierefunktion ist, zeigen Studien, in denen mittels Cytochalasin D eine Depolymerisation des Aktinzytoskeletts der Zelle herbeigeführt wurde. In vivo resultierte die Cytochalasin D-Behandlung in einer drastisch gesteigerten Permeabilität, welche in vitro mit einer deutlichen Lückenbildung einherging (Blum et al., 1997; Haselton et al., 1996; Waschke et al., 2005). Durch den Einsatz von Jasplakinolid, welches das Aktinzytoskelett stabilisieren kann, wurde die durch Cytochalasin D-Gabe hervorgerufene Störung der Endothelbarrierefunktion vermindert (Waschke et al., 2005). Im Gegensatz zu den barriestabilisierenden Effekten niedriger Dosen von Jasplakinoliden, kam es durch den Einsatz hoher Dosen von Jasplakinoliden zu einer gesteigerten Permeabilität in vivo und interzelluläre Lückenbildung in myokardialen Endothelzellen in vitro. Aus diesen beiden Studien kann man schlussfolgern, dass die Regulation des Zytoskeletts gut ausbalanciert sein muss, um die Endothelbarriestabilität zu gewährleisten.

Des Weiteren konnte durch direkte Regulation der Kontraktilität des Aktinzytoskeletts gezeigt werden, dass eine verminderte Kontraktion in vivo und in vitro durch die Hemmung der Rho-Kinase mittels Y27632 und zum anderen durch Hemmung der Myosin-ATPase zu einer verminderten basalen Permeabilität und somit zu einer gesteigerten Barrierefunktion führte (Adamson et al., 2002; Waschke et al., 2004c).

2.3. Familie der kleinen GTPasen

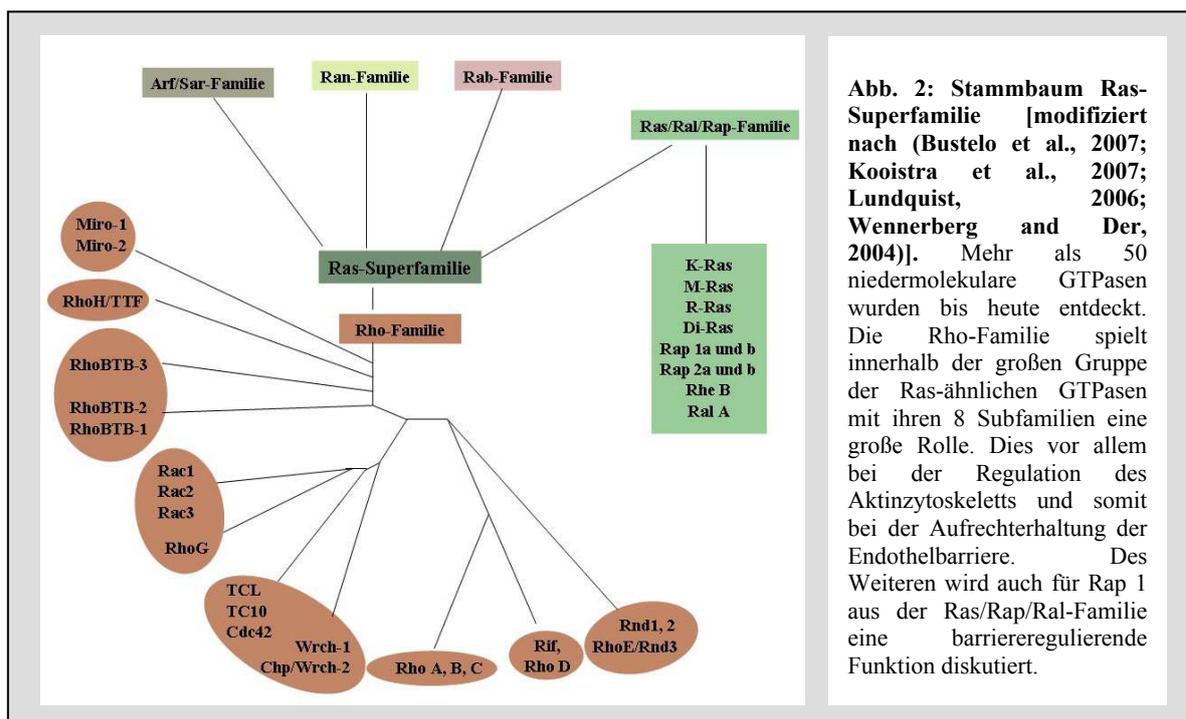
Rho-GTPasen sind niedermolekulare GTP-bindende Proteine, die zur Ras-Superfamilie gehören. Mehr als 150 niedermolekulare GTP-bindende Proteine wurden bislang identifiziert (Yang and Kazanietz, 2007). Ihre Einteilung erfolgt in fünf große Familien. Die Ras-, Rab-, Sar1/Arf-, Ran- und die Rho-Familie (Abb. 2).

2.3.1. Ras als Prototyp der kleinen GTPasen

Ende der 70er Jahre führte ein onkogenes Mäusesarkomvirus auf die Spur der Ras-GTPasen. Man erkannte, dass von den Harvey- und Kirsten-Viren kodierte 21 kDa-Proteine infizierte Zellen zur Proliferation zwingen.

In den 80er Jahren fand man das Ras-Gen in Sarkoma-Viren von Ratten, woher die Bezeichnung Ras (rat sarcoma) rührt (Ellis et al., 1981). Gene der Ras-Superfamilie sind weit verbreitet und wurden aus einer Vielzahl eukariotischer Zellen, von Hefen bis Säugerzellen, isoliert (Madaule and Axel, 1985). Bis heute wurden mehr als 50 Mitglieder der Ras-Subfamilie gefunden, zu denen die Ras/Ral/Rap-Proteine zählen (Lundquist, 2006; Takai et al., 2001).

Ras-GTPasen sind proto-oncogene Proteine mit einem Molekulargewicht von 20-29 kDa. Sie sind vor allem an der Regulation der Genexpression und der Zellproliferation und -differenzierung beteiligt. Der intrazelluläre Vesikeltransport wird unter anderem durch die Rab- und Sar1/Arf-Familie geregelt. Die Ran-Familie reguliert den nukleoplasmatischen Transport und die Organisation von Mikrotubuli während des Zellzyklus. Die Regulation der Zelladhäsion und die Reorganisation des Zytoskeletts gehören zu den wichtigsten Funktionen der Rho-Familie (Bokoch and Der, 1993; Takai et al., 2001; Vega and Ridley, 2007). Daher sind Rho-GTPasen möglicherweise entscheidend an der Regulation der Endothelbarriere beteiligt.



2.3.2. Rho- (Ras-Homologie Proteine) GTPasen

Rho-GTPasen sind zu annähernd 25 % mit Ras identisch (Madaule and Axel, 1985; Wojciak-Stothard and Ridley, 2002). Seit Entdeckung von Rho 1985 (Madaule and Axel,

1985) wurden viele weitere dazugehörige GTPasen entdeckt. Zu den Rho-GTPasen im engsten Sinne zählen vor allem die Isoformen Rho A, B und C, die eine Vielzahl biochemischer Charakteristika teilen und deren Aminosäuresequenzen bis zu 94% identisch sind.

Bis heute wurden 27 Mitglieder der Rho-GTPasen beim Menschen gefunden, die in 8 Subfamilien unterteilt werden können (Tab.1 und Abb. 2) (Aspenstrom et al., 2004; Sorokina and Chernoff, 2005; Vega and Ridley, 2007).

Rho A, Rac 1 und Cdc42 sind die am besten untersuchten Rho-GTPasen und besitzen jeweils weitere Isoformen. In die Rho-Gruppe gehören Rho A, Rho B und Rho C. In die Cdc42-Gruppe gehören neben Cdc42 auch TC10, TCL, Chp und Wrch1 und 2. Zur Rac-Gruppe zählen Rac 1, Rac 2, Rac 3 und RhoG. RhoD, RhoH und Rnd bilden jeweils eine eigene Gruppe. Die Aminosäuresequenzen der Rho-verwandten GTPasen stimmen mit der Sequenz von Rho A zu 40 % bei RhoH und sogar 54 % bei Rac 1 überein.

Die Mitglieder dieser sechs Gruppen besitzen jeweils den klassischen Aufbau der Rho-GTPasen aus einer GTPase-Domäne und einem isoprenyliertem C-terminalem Ende.

In neueren Studien wurden auch atypisch aufgebaute Mitglieder entdeckt, die eine zusätzliche Domäne enthalten. So besitzen RhoBTB Proteine eine GTPase-Domäne und zwei BTB-Domänen am C-terminalen Ende. BTB (Broad-Complex, Tramtrack and Bric à brac) sind evolutionär konservierte Domänen, die in Protein-Protein-Interaktionen involviert sind (Rivero et al., 2001). Die Miro-Proteine setzen sich aus zwei GTPase-Domänen zusammen, zwischen denen sich zwei EF-Handmotive, die potentielle Ca^{2+} -bindende Motive darstellen, befinden (Fransson et al., 2003).

Typische Rho-GTPasen	
Gruppe	Isoformen
Rho- Gruppe	Rho A, Rho B, Rho C
Cdc42- Gruppe	Cdc42, TC10, TCL, Chp und Wrch1/2
Rac- Gruppe	Rac 1, Rac 2, Rac 3, Rho G
Rnd- Gruppe	Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE
RhoD- Gruppe	RhoD und Rif
RhoH	RhoH/TTF
Atypische Rho-GTPasen	
Gruppe	Isoformen
RhoBTB-Gruppe	RhoBTB1, RhoBTB2
Miro-Gruppe	Miro1, Miro2

Tab.1: Einteilung der Rho-GTPasen (Wennerberg and Der, 2004): Die Rho-GTPasen können in acht Subfamilien unterteilt werden. Sechs Subfamilien besitzen den klassischen Aufbau einer Rho-GTPase. Zwei Gruppen besitzen eine etwas abgewandelte Struktur und werden deshalb als atypisch bezeichnet.

2.3.2.1. Funktionsprinzip

Rho-GTPasen sind Guanosintriphosphat (GTP)-hydrolysierende Proteine, die zwischen einer aktiven und einer inaktiven Form pendeln. Im GTP-gebundenen Zustand sind diese

Proteine „aktiv“, im Komplex mit GDP sind sie dagegen „inaktiv“. Diese beiden Zustände sind zyklisch miteinander verbunden (Wojciak-Stothard and Ridley, 2002). Wenn GDP freigesetzt wird, tritt das Protein in einen nur vorübergehenden Zustand ohne Bindungspartner ein. Unter physiologischen Bedingungen lagert sich sofort an der frei gewordenen Bindungsstelle GTP an, wodurch sich die Konformation der GTPase und auch deren Eigenschaften (z.B. Affinität zu Effektorproteinen) ändern. Schließlich wird durch die hydrolytische Aktivität des Proteins GTP zu GDP abgebaut und die GTPase erreicht wieder ihren Ausgangszustand. Der Kreislauf kann so von neuem beginnen.

Die intrinsischen GTP-Hydrolyse- und GDP-Dissoziationsraten sind sehr niedrig (Bourne et al., 1991), wobei sich die Hydrolysearten der einzelnen GTPasen untereinander unterscheiden. So ist die Hydrolyserate von Rho A kleiner als die von Rac 1 oder Cdc42 (Zhang and Zheng, 1998). Die Hydrolyse von GTP stellt in diesem Kreislauf einen irreversiblen Schritt dar, somit ist gewährleistet, dass der Zyklus nur in eine Richtung ablaufen kann (Bourne et al., 1991). Die Kinetik sowohl der Freisetzung von GDP als auch die des Hydrolyseschrittes wird durch eine Reihe von Steuerproteinen präzise reguliert.

GTPasen sind in ihrem aktiven Zustand, d.h. GTP-gebundenem Zustand, mittels eines Farnesylankers an der Zellmembran verankert. Durch Inaktivierung lösen die GTPasen ihre Verankerung an der Zellmembran.

2.3.2.2. Struktur

Ein typisches Merkmal der Rho-GTPasen, welche monomere Proteine sind, ist das geringe Molekulargewicht zwischen 21 kDa und 35 kDa. Ihre Struktur zeichnet sich durch zwei flexible Schleifen, die Switch-I- und die Switch-II-Region aus. Beim Austausch von GDP zu GTP vollziehen die Switch-Regionen eine deutliche Konformationsänderung, welche die Bindung der Rho-GTPase an Effektormoleküle ermöglicht.

Im Gegensatz zu Ras dienen bei den Rho-GTPasen auch andere Regionen außer der Switch-I-Region (Aminosäuren 32-41) der Effektorbindung. So sind daran auch die Switch-II-Region, die Insert-Region und Teile des C- und N-terminalen Endes beteiligt (Li et al., 1999). Die Switch-II-Region (AS 62-78) ist an der GTP-Bindung und an der Hydrolysereaktion der Rho-GTPasen beteiligt. Für die Hydrolysereaktion sind zwei Aminosäuren (AS) erforderlich, Glycin 14 und Glutamin 63 (Foster et al., 1996). Glutamin 63 aus der Switch-II-Region interagiert dabei mit dem hydrolysierendem Wassermolekül

und bewegt sich während der Reaktion in Richtung γ -Phosphat des GTP-Moleküls. Dort stabilisiert es den für den Ablauf der Hydrolyse notwendigen Übergangszustand (Garavini et al., 2002). Eine Rho-GTPase ohne Glutamin 63 hat keine GTPase Aktivität.

2.3.2.3. Regulation

Rho-GTPasen werden durch drei Gruppen regulatorischer Proteine in ihrem Zyklus beeinflusst. Zum einen sind GAPs (GTPase-activating proteins) als Hydrolyse vorantreibende Proteine zu nennen. Die zweite Große Gruppe der GTPase-beeinflussenden Proteine sind GEFs (Guanotid exchange factors). GEFs führen zu einer schnelleren Dissoziation des im inaktiven Zustand gebundenen GDP und somit zu einer Aktivierung der GTPasen. GDIs (GDP dissociation inhibitors) inhibieren die Aktivierung von GTPasen, indem sie die Dissoziation des im inaktiven Zustand gebundenen GDPs verhindern.

GAPs (GTPase-activating proteins)

Die Existenz eines Proteins, das die GTP-Hydrolyse stimuliert, wurde von Trahey und McCormick (Trahey and McCormick, 1987) vorgeschlagen. Derartige Proteine werden als GAPs (GTPase-activating proteins) bezeichnet und sind entsprechend ihrer Funktion inaktivierend, d.h. sie überführen mehr GTPase-Moleküle aus dem aktiven in den inaktiven GDP-gebunden Zustand.

Es gibt eine Vielzahl bislang entdeckter GAPs, die oftmals unterschiedliche Spezifität zu den einzelnen GTPasen aufweisen. Beispiele für Rho-spezifische GAPs sind myr5 (Muller et al., 1997), p190 (Zhang and Zheng, 1998) und p122 (Sekimata et al., 1999). Ebenfalls auf Rho wirkt p50RhoGAP, jedoch soll dieses für Cdc42 eine höhere Affinität aufweisen als für Rho (Zhang and Zheng, 1998). Bis heute wurden mehr als 70 Rho-GAPs identifiziert (Yang and Kazanietz, 2007). Für die GTPase Rac sind bisher nur 12 dieser 70 GAPs spezifisch. So wurden beispielsweise 3BP-1 [SH3 (Src-homology domain 3)-binding protein 1], Abr [active BCR (breakpoint cluster region)-related protein], Chimärine, Oligophrenin-1 gefunden (Bernards, 2003). Für Cdc42 sind RGA1, RGA2 und RGA3 sowie BEM3 (Smith et al., 2002) als spezifische GAPs charakterisiert worden. Einige GAPs zeigen neben ihrer eigentlichen GAP-Funktion noch andere Aktivitäten. So bindet beispielsweise p122 an PLC-delta 1 und aktiviert dieses Enzym. Dadurch wird die Hydrolyse von 4,5-PIP₂ gesteigert (Homma and Emori, 1995).

GEFs (Guanotid exchange factors)

Die zweite große Gruppe der die GTPase beeinflussenden Proteine sind GEFs (Guanotid exchange factors), auch GDSs (GTP/GDP dissociation stimulators) genannt. GEFs führen zu einer schnelleren Dissoziation des im inaktiven Zustand gebundenen GDP und somit zu einer Aktivierung der GTPasen.

GEFs für Rho-GTPasen können in zwei Subtypen unterschieden werden. Zum einen die klassische DH-PH- (Dbl homology-pleckstrin homology domain) Familie mit momentan 69 Vertretern im menschlichen Genom (Rossman et al., 2005). Hierbei spielt die DH-Domäne vor allem in der Regulation der GDP/GTP-Austauschaktivität eine Rolle und die PH-Domäne vermittelt die direkte Interaktion DH-Domäne an Rho-Protein (Debreceni et al., 2004). Zum anderen wurden 11 menschliche Mitglieder der Dock 180-abhängigen Proteine entdeckt, die eine DHR (Dock homology region domain) enthalten (Brugnera et al., 2002; Cote and Vuori, 2007). Zum Teil können Rho-GEFs mit mehreren Rho Unterfamilien interagieren (Rho, Rac und Cdc42), andere hingegen sind für einzelne Proteine spezifisch. Als Rho spezifisch gelten Lbc (Zheng et al., 1995), mRho GEP, Vav2 und p155RhoGEF (Takai et al., 2001).

Für Rac 1 sind spezifische GEFs Tiam 1 (Habets et al., 1994) und GEF-H1. Für die Rac 1-spezifische GEF-Interaktion ist die Aminosäure Tryptophan an Stelle 56 (Trp⁵⁶) essentiell. Viele Rac 1-vermittelte barrierestabilisierende Effekte scheinen über Tiam 1 reguliert zu sein, da nach Expression einer Tiam 1-inaktiven Mutante die entsprechenden Rac 1-Effekte nicht mehr vermittelt werden konnten (Malliri et al., 2004). Trio besitzt zwei große funktionelle DH/PH-Domänen. Mit der N-terminalen Domäne wird eine spezifisch auf Rac 1 wirksame GEF-Aktivität vermittelt, wohingegen die C-terminale Domäne Rho A-spezifische GEF-Aktivität aufweist (Gao et al., 2001). Es ist bekannt, wie sich durch die Bindung von Trio oder Tiam 1 die Struktur von Rac 1 verändert (Gao et al., 2001). Darauf basierend fand die Arbeitsgruppe um Yaun Gao einen pharmakologischen Inhibitor (NSC-23766), der passgenau die Bindungstasche von Rac 1 um Trp⁵⁶ abschirmt und somit die Interaktion der Rac 1-spezifischen GEFs verhindert (Gao et al., 2004). Ein für Cdc42 spezifisches GEF ist Frabin (Obaishi et al., 1998).

GDI (GDP dissociation inhibitors)

GDI (GDP dissociation inhibitors) bilden die dritte Gruppe regulatorischer Proteine der kleinen GTPasen. Die bislang 3 bekannten (Jaffe and Hall, 2005) GDIs inhibieren die

Aktivierung von GTPasen, indem sie die Dissoziation des im inaktiven Zustand gebundenen GDP verhindern. So wurde schon 1992 gezeigt (Kikuchi et al., 1992), dass ein Rho-GDI die Aktivierung von Rho A durch ein GEF vermindert. Rho-GDI hemmt nicht nur die GAP-katalysierende GTPase, sondern auch die intrinsische Aktivität. Rho-GDI führt zur Dissoziation der GDP-gebundenen Form von der Zellmembran. Basierend auf diesen Befunden wurde vermutet, dass Rho-GDI auch in die Translokation von GTPasen einbezogen ist (Takai et al., 1993). RhoGDI beeinflusst auch die Aktivität auf Rac 1 (Chuang et al., 1993) und Cdc42 (Hart et al., 1992).

2.3.2.4. Regulation des Aktinzytoskeletts durch Rho-GTPasen

Eine der Hauptfunktionen der Rho-GTPasen liegt in der Regulation des Zytoskeletts der Zellen. So sind Zellmigration, Pino- und Exozytose, Phagozytose, Zellpolarität, Vesikeltransport, Zytokinese, Morphogenese, Axonwachstum und zytoskelettale Umorganisation typische Beispiele für Prozesse, bei denen die durch Rho-GTPasen vermittelte Zytoskelett-Reorganisation eine Rolle spielt (Jaffe and Hall, 2005; Ridley, 2001a; Ridley, 2001b). Als Regulatoren des Zytoskeletts einer Zelle haben Rho-GTPasen auch einen großen Einfluss auf die Barrierefunktion des Endothels. Den GTPasen Rho A und Rac 1 werden in diesem Zusammenhang meist antagonistische Funktionen zugeschrieben (Vandenbroucke et al., 2008; Wojciak-Stothard and Ridley, 2002; Wojciak-Stothard et al., 2005). Dabei wird Rho A zumeist Barriere destabilisierung zugeschrieben, wohingegen Rac 1 zumeist mit gesteigerter Barrierefunktion in Verbindung gebracht wird.

Die meisten bekannten Effektoren der Rho-GTPasen nehmen Einfluss auf Abläufe in der Zelle, die durch Aktin vermittelt werden. Rho-GTPasen nehmen auf drei Organisationsformen von F-Aktin Einfluss. Zum einen die Stressfasern. Sie sind über die Integrine der Fokaladhäsionskontakte an die Extrazellulärmatrix gebunden. Zweites regulieren Rho-GTPasen das corticale junctions assoziierte Zytoskelett. Und drittens regulieren Rho-GTPasen die Aktinfilamente in Zellausläufern wie Lamellipodien und Filopodien (Nobes and Hall, 1995).

Rho A und das Aktinzytoskelett

Wird Rho A in Kulturzellen aktiviert, kommt es zu einer Verstärkung der Stressfasern. Aktivierung von Rho A führt zur Aktivierung der nachgeschalteten Rho-Kinase. Die Rho-Kinase ist eine 160 kDa Serin/Threonin-Kinase, die spezifisch an GTP-Rho bindet und deren Aktivität durch diese Interaktion etwa um den Faktor zwei erhöht wird (Matsui et al., 1996). Die Rho-Kinase ihrerseits hemmt die MLCP (myosin light chain phosphatase), so dass phosphoryliertes Aktin nicht mehr dephosphoryliert werden kann und somit die phosphorylierte Form akkumuliert (Leung et al., 1995; Matsui et al., 1996). Außerdem kann Rho-Kinase selbst Myosinleichtketten phosphorylieren (Amano et al., 1996), so dass resultierend aus beiden Mechanismen mehr phosphorylierte Myosinleichtketten vorliegen, die verstärkt an Aktinfilamente binden und somit Stressfasern entstehen lassen.

Die durch Rho A-Aktivierung vermittelte Steigerung der Stressfasern erfolgt auch durch den Rho-Effektor, mDia das ein forminähnliches Protein ist, und durch Bindung an das aktinbindene Profilin die Stressfaserbildung fördert (Narumiya et al., 1997).

Die Bildung von Stressfasern durch Rho A kann über einen dritten Weg vermittelt werden. Dieser geht mit der Aktivierung von PIP-5-Kinase (Phosphatidylinositolphosphat-5-Kinase) einher (Nobes and Hall, 1995). Durch eine Aktivierung von PIP-5-Kinase kommt es zur Bildung von Phosphoinositiden, welche Kappenproteine am Plusende der Aktinfilamente verdrängen, so dass Aktin polymerisiert werden kann (Chong et al., 1994).

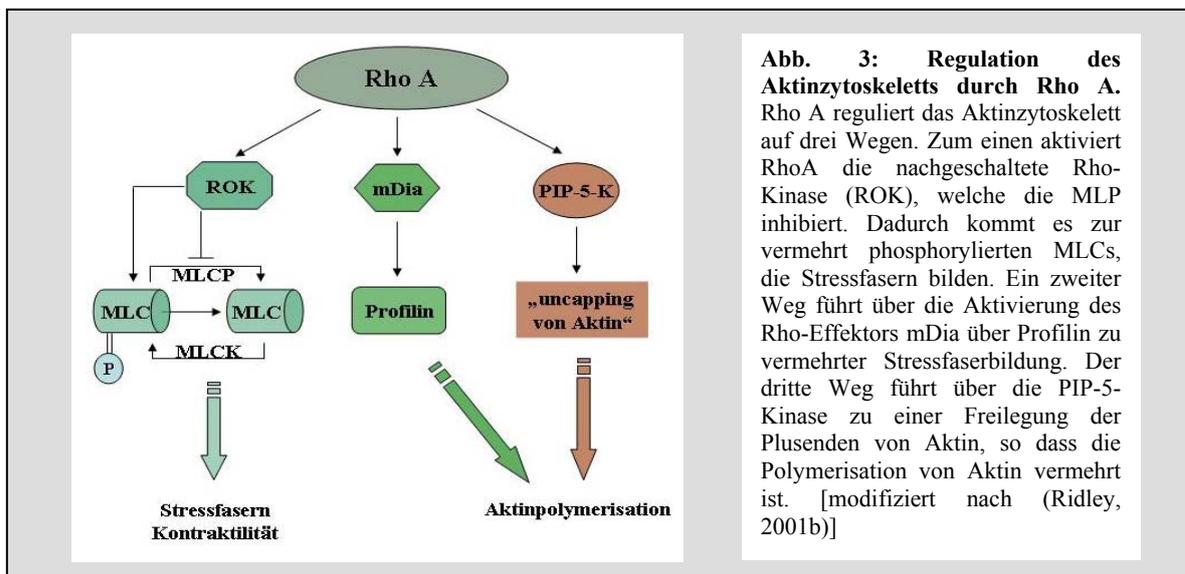


Abb. 3: Regulation des Aktinzytoskeletts durch Rho A. Rho A reguliert das Aktinzytoskelett auf drei Wegen. Zum einen aktiviert RhoA die nachgeschaltete Rho-Kinase (ROK), welche die MLP inhibiert. Dadurch kommt es zur vermehrt phosphorylierten MLCs, die Stressfasern bilden. Ein zweiter Weg führt über die Aktivierung des Rho-Effektors mDia über Profilin zu vermehrter Stressfaserbildung. Der dritte Weg führt über die Freilegung der Plusenden von Aktin, so dass die Polymerisation von Aktin vermehrt ist. [modifiziert nach (Ridley, 2001b)]

Cdc42 und das Aktinzytoskelett

Aktives Cdc42 führte in Swiss 3T3-Zellen (Fibroblasten) zur Ausbildung von Filopodien, welche dünne längliche Ausstülpungen der Plasmamembran darstellen. Sie bestehen aus

Bündeln von Aktinfilamenten, die durch aktinbindende Proteine vernetzt sind (Nobes and Hall, 1995). In migrierenden Zellen scheinen Filopodien eine korrekte Ausrichtung der Zelle zu gewährleisten (Nobes and Hall, 1999).

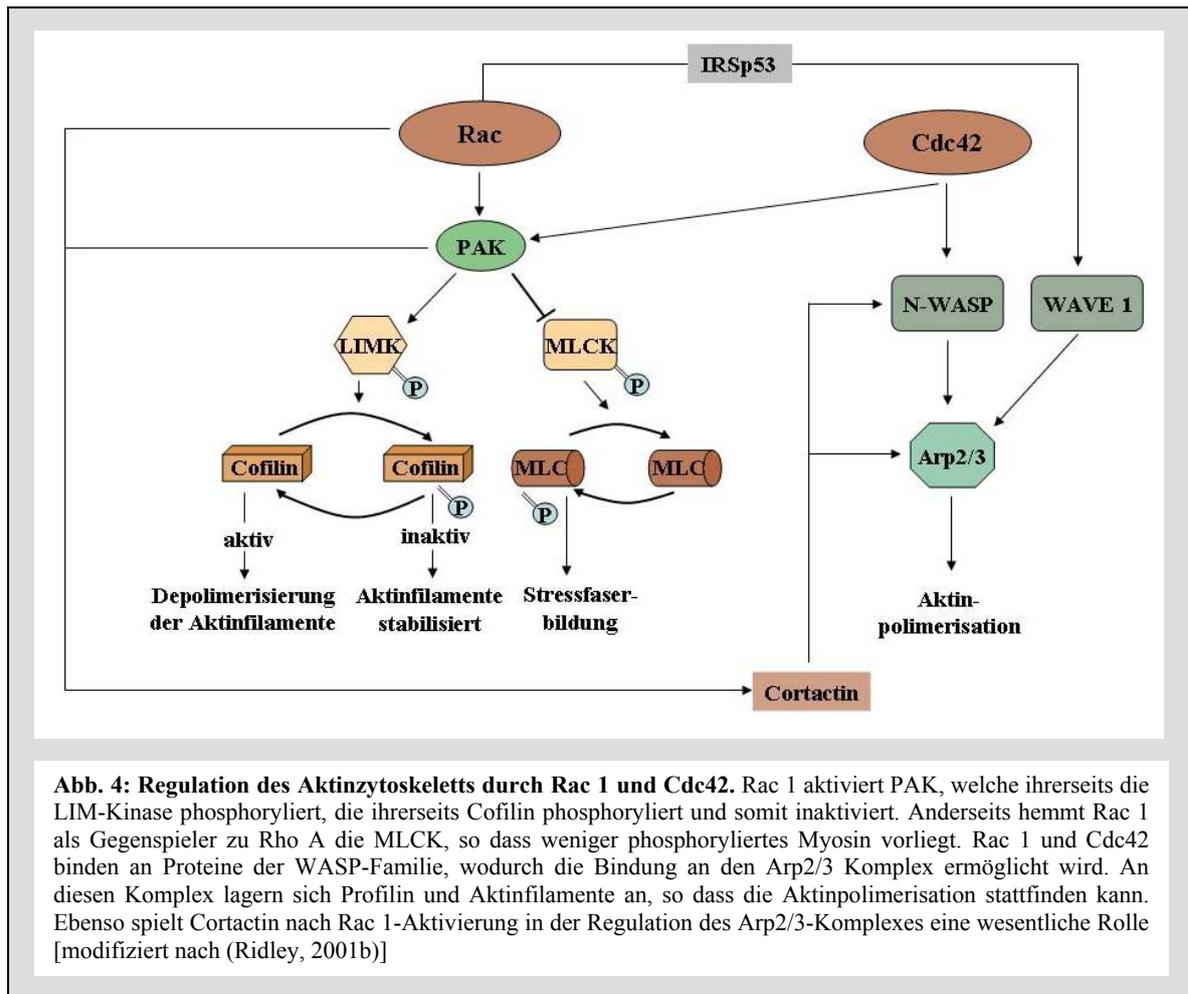
Der wohl am besten erforschte Weg, wie Cdc42 auf das Aktinzytoskelett wirkt, ist der über N-WASP. WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) ist ein direkter Effektor von Cdc42 und interagiert direkt mit dem Arp2/3-Komplex (actin-related protein 2/3) (Hall, 2005; Takai et al., 2001).

Rac 1 und das Aktinzytoskelett

Die Aktivierung von Rac 1 zeigt in kultivierten Endothelzellen ein ganz typisches Bild. Es kommt es zur Ausbildung eines corticalen Aktinrings entlang der Zellgrenzen (Ridley et al., 1992). Die Zellen bilden Lamellipodien, Ausläufer, die von einem Aktinnetzwerk durchzogen sind und vor allem der Zellmigration dienen.

Typische Effektoren von Rac (auch gleichzeitig für Cdc42) sind Ser/Thr-Kinasen der PAK Proteinfamilie (p21-aktivierte Kinasen), die die Fähigkeit besitzen, die Bildung von Lamellipodien und Filopodien hervorzurufen (Matozaki et al., 2000). Am Aktinzytoskelett hemmen die PAKs die MLCK (myosin light chain kinase), den Gegenspieler der MLCP (Abb. 4), und führen durch diese Inhibition zu einer verminderten Phosphorylierung der Myosinleichtketten und somit zu einer verminderten Stressfaserverbreitung. PAKs phosphorylieren auch die LIM-Kinase (LIMK) (Ridley, 2001b), welche ihrerseits Cofilin phosphoryliert und somit inhibiert. Cofilin ist ein Protein, das die Depolymerisation von Aktinfilamenten vermittelt. Durch die Hemmung dieser Depolymerisation kann Rac 1 über PAK und LIMK die Aktinfilamente stabilisieren. Ebenso bindet Rac 1 an WAVE 1, welches ein WASP-ähnliches Protein ist, das sich in „membrane ruffles“ befindet und wie WASP/N-WASP mit Arp2/3 interagiert (Hall, 2005; Jaffe and Hall, 2005; Ridley, 2001b; Weed and Parsons, 2001). Die Bindung von WAVE an Rac 1 scheint allerdings keine direkte Bindung darzustellen, sondern durch das Adapterprotein IRSp53 an WAVE 1 vermittelt zu werden (Miki et al., 2000). Interessanterweise ist es WASP-Proteinen möglich, GEFs für Rho-GTPasen zu binden. So kann WAVE 1 direkt das Rac 1-GEF WRP binden (Daly, 2004). Aktivierung von Rac 1 führt zu einer corticalen Verlagerung von Aktinfilamenten. Dieser Vorgang wird unter anderem durch eine Rac 1-vermittelte Rekrutierung von Cortactin, welches direkt an F-Aktin bindet, an den Arp2/3-Komplex vermittelt. Cortactin kann die Aktinpolymerisation durch Bindung an WASP-Proteine und

durch direkte Aktivierung des Arp2/3-Komplexes fordern. Es kommt folglich zu einer Anreicherung des Cortactin/Aktin/Arp2/3-Komplexes und dessen Verlagerung an die Zellgrenzen. Darüber hinaus ist der aktivierte Arp2/3/Cortactin-Komplex in der Lage, direkt an den intrazellulären Teil der Cadherine zu binden (Bershadsky, 2004; Weed et al., 2000; Weed and Parsons, 2001).



2.3.3. Rap 1

Rap 1 ist eine Ras-ähnliche kleine GTPase, welche Ende der 80er Jahre entdeckt wurde (Bourne et al., 1991; Kitayama et al., 1989). Frühe Studien konzentrierten sich vor allem auf die Rolle von Rap 1 in Ras-abhängigen Signalwegen. Allerdings deuten viele Untersuchungen an, dass Rap 1 auch Ras-unabhängige Signalwege aktiviert, so zum Beispiel Zelladhäsion, Regulation des Zytoskeletts, Zellpolarität und die Bildung von Zell-Zell-Kontakten (Bos, 2005; Knox and Brown, 2002; Lundquist, 2006; Schwamborn and

Puschel, 2004; Wittchen et al., 2005). Durch vielfältige extrazelluläre Stimuli wird die GDP-gebundene Rap 1 Form in die aktive GTP-gebundene Form überführt. Viele dieser Stimuli sind durch bekannte intrazelluläre Botenstoffe, wie Ca^{2+} , Diacylglycerol und cAMP reguliert. Rap 1 selbst reguliert in seiner aktiven GTP-gebundenen Form viele Prozesse, wie zum Beispiel die Integrin-vermittelte Adhäsion, den Vesikeltransport, neuronale Polarität und die Phagozytose (Bos, 2005). Des Weiteren ist Rap 1 in die Regulation der Zell-Zell-Adhäsion durch VE-Cadherin eingebunden (Bos, 2005; Kooistra et al., 2007).

Erste Kenntnisse über die Rolle von Rap 1 in Zell-Zell-Junktionen wurden aus Studien in *Drosophila melanogaster* (Knox and Brown, 2002) gewonnen. In diesen Untersuchungen wurde Rap 1 eine stabilisierende und regulierende Rolle in der peripheren Verteilung von Adhärensjunktionen zugeschrieben. Unterstützt wurden diese Befunde durch Ergebnisse, dass GFP-Rap 1 mit Adhärensjunktionen kolokalisiert und an Stellen neuer Zell-Zell-Kontakte vermehrt vorkommt (Kooistra et al., 2007). In Säugetierzellen wurde die Rolle von Rap 1 durch die Identifizierung von DOCK-4 als atypischem Rap-GEF verstärkt (Yajnik et al., 2003). In MDCK-Zellen stabilisiert Rap 1 Zell-Zell-Kontakte. Darüber hinaus blockiert Rap 1 den durch HGF- (hepatocyte growth factor) induzierten endothelialen Barrierezusammenbruch (Birukova et al., 2007a; Price et al., 2004). Rap 1 scheint durch cAMP und Aktin-bindende Proteine wie IQGAP1 reguliert zu werden.

cAMP, welches schon sehr lange als endothelbarrieresteigernder Mediator bekannt ist, vermittelt seine stabilisierenden Effekte nicht nur über Proteinkinase A (PKA), sondern auch über Rap 1. So aktiviert cAMP direkt Epac 1 (Exchange protein activated by cyclic AMP), welches ein GEF für Rap 1 darstellt (de Rooij et al., 1998). Endothelzellen, die mit dem cAMP-Analogen 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (O-Me-cAMP) behandelt wurden, zeigen eine Umorganisation von Zellkontakten (Cullere et al., 2005; Fukuhara et al., 2005), welche durch ein Ausschalten von Epac 1 komplett verhindert werden konnte (Kooistra et al., 2005). Darüber hinaus weisen mit O-Me-cAMP behandelte Zellen eine gestärkte Endothelbarriere auf (Birukova et al., 2008). Es wird angenommen, dass VE-Cadherin dabei eine wesentliche Rolle spielt (Lorenowicz et al., 2008). So wurde gezeigt, dass die Adhäsion von Endothelzellen auf mit VE-Cadherin beschichteten Platten durch Expression von RapGAP, welches Rap 1 inaktiviert, gemindert wird, so dass Rap 1 für VE-Cadherin-vermittelte Adhäsion wichtig zu sein scheint (Fukuhara et al., 2005). Darüber hinaus

zeigen Zellen, die kein VE-Cadherin exprimieren, keine durch O-Me-cAMP vermittelte Barriestärkung (Kooistra et al., 2005).

Ebenso bindet IQGAP 1 in epithelialen Zellen Calmodulin-abhängig an GTP-Rap 1. Durch eine derartige Interaktion findet wahrscheinlich eine gesteigerte GTP-Hydrolyse statt, die zu vermehrt inaktivem Rap 1 führt. Im Gegensatz führte die Bindung von IQGAP 1 an Rac 1 und Cdc42 nicht zu einer Inaktivierung. Der Grund hierfür scheinen verschiedenen Bindedomänen der GTPasen an dem IQGAP 1-Molekül zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass Überexprimierung von IQGAP 1 die cAMP-vermittelte Aktivierung von Rap 1 vermindert und Zellen, die IQGAP 1 nicht exprimieren, eine gesteigerte Rap 1-Aktivität aufweisen. Daher scheint IQGAP 1 als Regulator von Rap 1 die barriestabilisierenden Effekte von Rap 1 zu vermindern (Jeong et al., 2007).

Rap 1 scheint einige seiner Funktionen durch Regulation von Rho-GTPasen auszuüben. So wurde gezeigt, dass Rap 1-Aktivität für die Aktivierung von Cdc42 während der Bildung von Zell-Zell-Kontakten notwendig ist, und eine aktive Mutante von Cdc42 die negativen Effekte von RapGAP blockieren konnte, was eine Rap 1 nachgeschaltete Stellung von Cdc42 vermuten lässt (Hogan et al., 2004). Andere postulieren ein Modell, in welchem die Aktivierung von Vav, ein Rac-GEF, und FRG, ein Cdc42-GEF, eine aktive Src-Kinase und aktives Rap 1 benötigen (Fukuyama et al., 2005a; Fukuyama et al., 2005b). Darüber hinaus interagiert das Rac-GEF Tiam 1 mit Rap 1 und ist notwendig für die Zell-Zell-Kontakt-Entwicklung (Malliri et al., 2004; Mertens et al., 2005). So könnte eine weitere Funktion von Rap 1 die Rekrutierung von Rac 1- und Cdc42-spezifischen GEFs an die Zell-Zell-Kontakte darstellen und zur in der Bildung eines corticalen Aktinrings beitragen (Cullere et al., 2005; Kooistra et al., 2005). Daneben scheint Rap 1 durch Arap3 die Rho A-Aktivität zu reduzieren (Krugmann et al., 2004; Maillet et al., 2003).

Viele weitere Proteine werden durch Aktivierung von Rap 1 an die Junctionsproteine verlagert. So z.B. Afadin 6 (AF6), welches ein Adapterprotein vieler junctionaler Proteine wie Nektin und ZO-1 darstellt (Bos, 2005). In vitro-Studien haben gezeigt, dass AF6 in Anwesenheit von Rap 1 die Endozytose von E-Cadherin verhindert, wobei die Bindung von AF6 an p120-Catenin beteiligt zu sein scheint (Hoshino et al., 2005).

Neben Rho-GTPasen hat Rap 1 weitere Effektormoleküle wie z. B. Riam. Die Expression von Riam induziert Integrin-vermittelte Adhäsion ähnlich wie aktives Rap 1. Studien, die die Aktivität von Riam mittels siRNA ausschalteten, wiesen eine Block der Rap 1-induzierten Integrin-vermittelten Zell-Adhäsion auf. Des Weiteren scheint eine Aktin-

regulierende Rolle von Riam möglich zu sein, da Riam-defiziente Zellen einen geringeren Anteil F-Aktin besitzen und Rap 1 nicht mehr an Fokaladhäsionen lokalisiert ist. Ebenso bindet Riam an Ena/VASP und Profilin. Beide Proteine sind in die Regulation des Aktinzytoskeletts involviert (Lafuente et al., 2004).

2.3.4. Aktivierung und Inhibition von Rho-GTPasen

Für viele Studien ist es notwendig, die Aktivität von Rho-GTPasen gezielt zu steigern oder zu reduzieren. Dies kann zum einen durch bakterielle Toxine oder durch entsprechende Mutanten erreicht werden.

2.3.4.1. Bakterielle Toxine

Der Einsatz bakterieller Toxine ermöglicht es, Rho-GTPasen in ihrem Aktivitätszustand gezielt und selektiv innerhalb kurzer Inkubationszeiten zu beeinflussen (Aktories, 1997).

Rho-GTPasen werden durch C3-ADP-Ribosyltransferasen inaktiviert (Aktories et al., 1992), welche von verschiedensten Bakterien produziert werden, so z.B. Clostridium botulinum, Bacillus cereus und Staphylococcus aureus. Derartige Proteine haben eine Größe von 25 kDa und sind bis zu 70 % untereinander identisch. C3-ähnliche Transferasen ADP-ribosylieren vor allem Rho A, B und C, nicht aber Rac und Cdc42. Die ADP-Ribosylierung am Asparagin 41 hat nur geringfügige Effekte auf die Nukleotidbindung und die GTPase-Aktivität, dafür ist die Effektoraktivierung gestört. Eine zweite Möglichkeit der Inaktivierung von GTPasen ist eine Glykosylierung. Zu diesen Toxinen gehören die Clostridientoxine, so z.B. Toxin A und B aus Clostridium difficile (Bobak, 1999). Sie haben ein wesentlich größeres Molekulargewicht von ca. 300 kDa. Toxin A und B aus Clostridium sordellii und Clostridium novyi modifizieren Rho A, Rac 1 und Cdc42, wohingegen Letales Toxin (LT) aus Clostridium sordellii Rac 1 und Ras glykosyliert. Ein Toxin B aus Clostridium difficile (Toxin B 1470) modifiziert vor allem Rac 1 und ein wenig Cdc42, hat aber keine Effekte auf Rho A (Chaves-Olarte et al., 1999). Alle diese Toxine modifizieren die GTPasen durch UDP-Glykosylierung von Threonin 37 bei Ras und Rho A und von Threonin 35 bei Rac 1 und Cdc42 (Chaves-Olarte et al., 1996; Chaves-Olarte et al., 1997; Popoff et al., 1996). Durch eine derartige Glykosylierung an Thr^{35/37} werden sowohl die intrinsische und GAP-stimulierte GTPase-Aktivität als auch

die Effektorbindung reduziert. Ebenso scheint es zusätzlich zur Hemmung der Translokation der GTPase vom Zytosol an die Membran zu kommen (Aktories et al., 2000).

Aktivierende Toxine der Rho-GTPasen sind z.B. cytotoxic necrotizing factor 1 und 2 (CNF-1/2) von *Escherichia coli*. Diese 115 kDa großen Proteine deamidieren Glutamin (Gln⁶³ für Rho A; Gln⁶¹ für Rac 1 und Cdc42) zu Glutaminsäure. Diese Modifikation resultiert in einer konstitutiven Aktivierung der GTPase, da sowohl die intrinsische als auch die GAP-vermittelte GTPase-Inaktivierung gehemmt werden. So können CNFs nicht nur Rho A, sondern auch Rac 1 und Cdc42 deamidieren (Boquet, 2001; Schmidt et al., 1997; Schmidt et al., 1998). CNFy (cytotoxic necrotizing factor y) aus *Yersinia pseudotuberculosis* aktiviert selektiv nur Rho A (Hoffmann et al., 2004; Lockman et al., 2002).

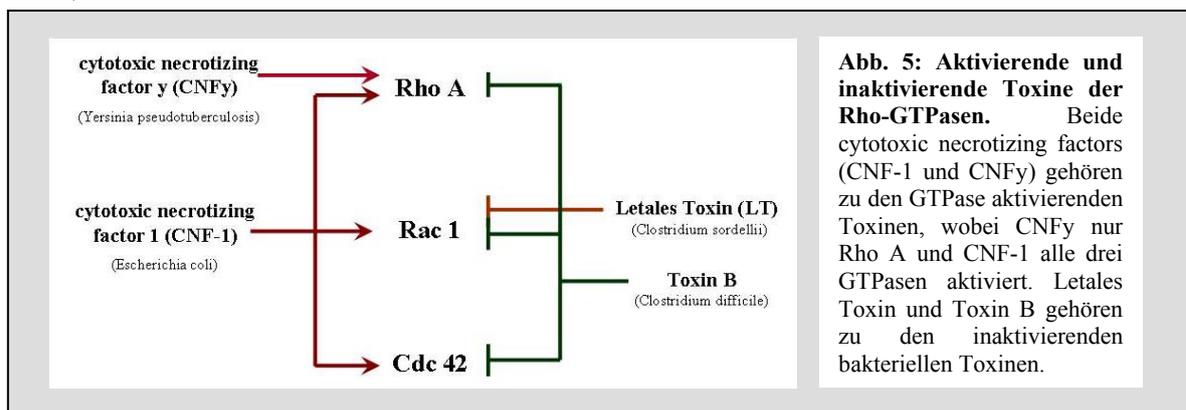


Abb. 5: Aktivierende und inaktivierende Toxine der Rho-GTPasen. Beide cytotoxic necrotizing factors (CNF-1 und CNFy) gehören zu den GTPase aktivierenden Toxinen, wobei CNFy nur Rho A und CNF-1 alle drei GTPasen aktiviert. Letales Toxin und Toxin B gehören zu den inaktivierenden bakteriellen Toxinen.

2.3.4.2. Transfektion mit DNA für konstitutiv aktive und inaktive GTPasen

Eine weitere Möglichkeit der Regulation der Aktivitätszustände der GTPasen sind Mutationen der GTPasen, die sowohl zu konstitutiv aktiven oder dominant negativen Molekülen (Bourne et al., 1991) führen können. Mutationen, die die GTPase-Aktivität aufheben (beispielsweise Glycin 12 zu Valin; G12V) ergeben z.B. eine konstitutiv aktive Variante der kleinen GTPasen. Dagegen führen Mutationen, welche die Interaktion zwischen GTPase und deren Effektoren reduzieren (z.B. Threonin 17 gegen Asparagin; T17N) zur Bildung einer dominant negativen Variante der Moleküle. Die entsprechenden Plasmide können durch verschiedenste Transfektionsmethoden oder durch Mikroinjektion in Zellen eingebracht werden (Bourne et al., 1991).

2.4. Regulation der Endothelbarriere

2.4.1. Rolle der Rho-GTPasen

Der Einfluss von Rho-GTPasen auf das Aktinzytoskelett und dessen Auswirkungen auf die Aufrechterhaltung der Endothelbarriere sind gut untersucht. Allerdings ist im Gegensatz dazu die Rolle der Rho-GTPasen auf endotheliale Junctionen noch wenig verstanden. Es gibt in vielen Publikationen sehr oft auch widersprüchliche Hinweise darauf, welche Einflüsse Rho-GTPasen auf endotheliale Junctionen ausüben und somit barriereschwächende oder auch stärkende Mechanismen vermitteln können. So scheinen derartige Effekte aber auch abhängig vom Ursprung der Endothelzellen, also zelltypabhängig, zu sein (Erez et al., 2005; Miyoshi and Takai, 2005).

Der Zusammenbruch der Endothelbarriere wird in vielen Veröffentlichungen vor allem durch gesteigerte Aktin-Myosin-Kontraktibilität und verminderte interzelluläre Haftung erklärt (Drenckhahn D, 1997; Michel and Curry, 1999). Rho A vermittelt über die nachgeschaltete Rho-Kinase vermehrte Kontraktibilität, die oftmals als ursächlich für den Zusammenbruch der Endothelbarriere gesehen wird (Aepfelbacher and Essler, 2001). So zeigten Studien in HUVECs, dass Rho A/Rho-Kinase einen wesentlichen Einfluss während des Thrombin- oder Histamin-induzierten Zusammenbruchs der Endothelbarriere besitzen. Sowohl durch Transfektion der Endothelzellen mit dominant negativem Rho A, als auch durch Inhibition von Rho A durch C3-Transferase, oder durch Hemmung der Rho-Kinase mittels Y27632 konnten die barriere destabilisierenden Effekte von Thrombin und Histamin vermindert werden (Wojciak-Stothard et al., 2001), was im Einklang zu den Erkenntnissen früherer Studien steht (Carbajal and Schaeffer, 1999; Essler et al., 1998). Nicht nur in vitro zeigt die Inhibition der Rho A/Rho-Kinase-vermittelten Kontraktion barriestabilisierende Effekte, es konnten Untersuchungen an intakten isolierten Koronarvenulen von Schweinen zeigen, dass der VEGF-induzierte Anstieg der Permeabilität durch Y27632-Inkubation verhindert werden konnte (Sun et al., 2006). Darüber hinaus legen in vivo-Befunde der Arbeitsgruppe um Roy Curry dar, dass die hydraulische Konduktivität, gemessen in postkapillären Venulen des Rattenmesenteriums, durch basale Inhibition der Rho-Kinase mit Y27632 gesenkt werden konnte. Allerdings reichte diese in vivo erlangte Barrierefestigung nicht aus, den barriere destabilisierenden Effekt des Entzündungsmediators PAF zu verhindern (Adamson et al., 2003). Aus dieser Studie kann

geschlossen werden, dass die Rho A/Rho-Kinase-vermittelte Kontraktilität nicht in jedem Fall ursächlich für einen Zusammenbruch der Endothelbarriere sein muss.

Der Rho A/Rho-Kinase-Signalweg scheint zudem auch Effekte auf die Junctionsproteine zu besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition sowohl von Rho A und als auch der Rho-Kinase den durch Thrombin-induzierten Verlust von Occludensjunctionen verhinderte (Wojciak-Stothard et al., 2001). Der Mechanismus über den Rho A einen Einfluss auf endotheliale Junctionen nimmt, ist noch weitestgehend unklar. Ein möglich denkbarer Effekt von Rho A auf Junctionsproteine könnte die Regulation des Phosphorylierungsstatus von Junctionsproteinen über Rho-Kinase darstellen (Wojciak-Stothard et al., 2001). Allerdings ist es interessant zu bedenken, dass konträr zu den Befunden in Endothelzellen die Inhibition von Rho A in Epithelzellen eine Reduktion von Occludensjunctionen bewirkte (Nusrat et al., 1995), so dass die Regulation der Junctionen zwischen Endothelzellen und Epithelzellen verschieden zu sein scheint. Ähnliche Befunde ergaben sich auch für Adhärensjunctionen. Hier zeigte die Inhibition von Rho A oder Rac 1 einen Verlust an Cadherin in Epithelzellen, was in Endothelzellen nicht der Fall war (Braga et al., 1999).

Die Inhibition aller drei GTPasen durch Toxin B verursachte sowohl *in vitro* (Hippenstiel et al., 1997) als auch *in vivo* (Adamson et al., 2002) einen Zusammenbruch der Endothelbarriere. Zudem zeigte auch die alleinige Inhibition von Rac 1 durch LT eine gesteigerte hydraulische Konduktivität in mikrovaskulären Venulen von Rattenmesenterien und *in vitro* eine Dissoziation der endothelialen Junctionen, was mit einem Verlust der VE-Cadherin-vermittelten Adhäsion einherging (Waschke et al., 2004a; Waschke et al., 2004b). Darüber hinaus konnten weiterführende *in vitro*-Untersuchungen an mikrovaskulären myokardialen Endothelzellen einen barriestabilisierenden Effekt nach Aktivierung von Rac 1 und Cdc42 durch CNF-1-Behandlung aufzeigen. Diese Endothelbarriestabilisierung ging mit der Bildung eines corticalen Aktinrings und der Umverteilung von Cortactin und VASP an die Zellmembranen einher. Allerdings konnte die Barriestabilisierung nicht durch veränderte VE-Cadherin-vermittelte Haftung erklärt werden. *In vivo* konnten Messungen der hydraulischen Konduktivität basal keinen stabilisierenden Effekt nach CNF-1-Zugabe zeigen, allerdings waren derartig behandelte Gefäße partiell vor einem durch PAF induzierten Zusammenbruch der Endothelbarriere geschützt (Waschke et al., 2006).

Des Weiteren ergaben andere in vitro-Studien nach Transfektion von dominant negativem Rac 1 in Endothelzellen eine gestörte Endothelbarrierefunktion (Vouret-Craviari et al., 2002). Darüber hinaus zeigen auch die GTPasen Rac 1 und Cdc42 eine Aktin-Myosin-regulatorische Funktion. Durch die Rac 1 und Cdc42 nachgeschalteten Effektoren PAK wird die MLCK und folglich die Kontraktilität gehemmt. Darüber hinaus wird nach Rac 1-Aktivierung über die nachgeschaltete PAK die LIM-Kinase aktiviert, welche Cofilin phosphoryliert und somit inaktiviert, was die Bildung eines corticalen Aktinrings zur Folge hat. Somit nimmt Rac 1 eine zu Rho A antagonistische Funktion bezüglich der Regulation der Kontraktilität und folglich der Permeabilität ein (Wojciak-Stothard and Ridley, 2002). Rac 1 und Cdc42 haben zusätzlich zu ihrer Aktin-regulatorischen Funktion auch Einflüsse auf Junctionsproteine (Mehta and Malik, 2006; Vestweber, 2008). In nichtendothelialen Zellen wurde gezeigt, dass z.B. E-Cadherin mit dem aktinbindenden Protein Arp2/3 interagiert, welches WASP und Cortactin bindet. WASP und Cortactin sind Effektorproteine von Cdc42 und Rac 1, was eine Interaktion dieser GTPasen mit Adhärensjunctionen nahe legt. Rac 1 moduliert Cadherin-vermittelte Zell-Zellkontakte möglicherweise auch durch die Akkumulation von Aktin an geklusterte Cadherinkomplexe (Braga et al., 1997). Rac 1 ist in Epithelzellen an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert (Braga et al., 1999). Des Weiteren wird angenommen, dass Rac 1 einen Einfluss auf die Bindung von β -Catenin und IQGAP besitzt. Rac 1 kann die Bindung zwischen β -Catenin und IQGAP verhindern, wodurch β -Catenin verstärkt an α -Catenin bindet und somit den Cadherin-Catenin-Komplex stabilisieren kann (Kuroda et al., 1996). All diese Befunde zeigen eine wesentliche Rolle von Rac 1 in der Aufrechterhaltung und der Regulation der Endothelbarriere.

Studien der Arbeitsgruppe um Braga haben im Gegensatz zu anderen Studien widersprüchliche Befunde gezeigt. So konnte diese Arbeitsgruppe u.a. zeigen, dass die Mikroinjektion von C3 Transferase in Endothelzellen, welche Rho A-Aktivität inhibiert, genauso wie die Mikroinjektion von inaktivem Rac (N17Rac) keinen Effekt auf VE-Cadherin ausübte (Braga et al., 1999), so dass die Inaktivierung von Rho A oder Rac 1 in dieser Studie keinen Effekt auf die VE-Cadherin-vermittelte Adhäsion zu besitzen schien. Auch die Neubildung von VE-Cadherin-Kontakten zwischen Endothelzellen war unabhängig von einer Rho A- oder Rac 1-Inaktivierung durch mikroinjizierte DNA (Braga

et al., 1999). Darüber hinaus zeigte diese Gruppe in Epithelzellen, dass Rho-Proteine die E-Cadherin-vermittelte Adhäsion beeinflussen (Braga et al., 1997; Lozano et al., 2008).

Die Rolle von Cdc42 in der Regulation der Endothelbarrierefunktion ist momentan unzureichend verstanden. In der Vergangenheit wurde aus Transfektionsstudien mit konstitutiv aktivem oder dominant negativem Cdc42 angenommen, dass Cdc42 keine wesentliche Rolle in der Regulation der Endothelbarriere einnimmt (Vouret-Craviari et al., 1998; Wojciak-Stothard et al., 2001). Zunehmend zeigen Studien, dass Cdc42 eine wesentliche Rolle während der Neubildung von Adhärensjunktionen nach Thrombin-induzierter Zerstörung der Endothelbarriere einnimmt. Die Arbeitsgruppe um Malik fand heraus, dass in humanen Endothelzellen 1 h nach Thrombinzugabe die Aktivität von Cdc42 zunahm, korrelierend mit einer Umverteilung von aktivem Cdc42 an die Membranen der Endothelzellen und einer Wiederherstellung der Endothelbarriere (Kouklis et al., 2004). Zu diesem Zeitpunkt begann in den Studien dieser Arbeitsgruppe die Wiederherstellung der Adhärensjunktionen und des transendothelialen elektrischen Widerstandes. Bestärkt wird dieser Befund durch die Tatsache, dass innerhalb dieser Studie verwendete dominant negative Cdc42-transfizierte Endothelzellen eine deutlich verzögerte Wiederherstellung der Adhärensjunktionen und der Endothelbarrierefunktion aufwiesen (Kouklis et al., 2004). Darüber hinaus wird in weiterführenden Studien dieser Gruppe eine Cdc42-vermittelte Interaktion von α - und β -Catenin diskutiert (Broman et al., 2006). Dazu wurden Endothelzellen zum einen mit einem VE-Cadherin, welches keine Extrazellulärdomäne aufwies oder mit einem VE-Cadherin ohne Extrazellulärdomäne und fehlender intrazellulärer α -/ β -Catenin-Bindedomäne transfiziert. Anschließend erfolgten Koimmunpräzipitationen. Man fand heraus, dass α - und β -Catenin koimmunopräzipitiert wurden, wenn die intrazelluläre Domäne intakt war, nicht aber bei gestörter α -/ β -Catenin-Bindung. Führte man diese Transfektionen als Doppeltransfektionen mit dominant negativem Cdc42 durch, konnten α - und β -Catenin nicht mehr kopräzipitiert werden, so dass dies nahe legt, dass die Bindung von α - an β -Catenin möglicherweise über eine Aktivierung von Cdc42 vermittelt wird. Rac 1 spielte innerhalb dieser Untersuchungen keine Rolle (Broman et al., 2006; Broman et al., 2007).

Eine weitere GTPase, von der Endothelbarriere-regulierende Eigenschaften berichtet werden, ist Rap 1. Rap 1 ist vor allem an der Regulation der Cadherin- und der Integrin-

vermittelten Adhäsion von Zellen untereinander und zur Matrix beteiligt (Retta et al., 2006; Wittchen et al., 2005). So führt durch cAMP-Steigerung über Epac 1 zur Aktivierung von Rap 1, welches die Funktion von VE-Cadherin positiv unterstützt (Fukuhara et al., 2005; Kooistra et al., 2005). Untersuchungen in HUVECs ergaben, dass diese Zellen nach cAMP-Anstieg in Epac/Rap 1-abhängiger Weise an VE-Cadherin-beschichteten Glasflächen eine gesteigerte Haftung aufwiesen (Fukuhara et al., 2005). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass ein cAMP-Anstieg über Epac/Rap 1-abhängige Mechanismen zur Umverteilung von AF6 entlang der Zell-Zell-Kontakte führt und somit AF6 als molekulare Verbindung zwischen Epac/Rap 1 und gesteigerter Barrierefunktion agieren könnte (Cullere et al., 2005). Zusätzlich konnte innerhalb dieser Studien auch eine veränderte VE-Cadherin-Verteilung beobachtet werden. Darüber hinaus deutet eine aktuelle Untersuchung eine Interaktion von Rap 1 mit IQGAP an, was einen weiteren Mechanismus der Epac/Rap 1-vermittelten Regulation der Endothelbarriere darstellen könnte (Jeong et al., 2007).

Für die Aufrechterhaltung der Endothelbarriere scheint besonders auch eine korrekte Anbindung von VE-Cadherin an das Aktinzytoskelett über die Catenine grundlegend wichtig zu sein. Die Expression eines VE-Cadherins, dem die β -Catenin-Bindedomäne fehlte, führte zu einer verminderten Zell-Zell-Adhäsion (Carmeliet et al., 1999). Genauso wichtig erscheint die Interaktion von VE-Cadherin mit p120-Catenin, auch wenn dieses nicht mit dem Aktinzytoskelett assoziiert ist. Allerdings scheint die Verbindung aus VE-Cadherin und p120-Catenin die kontraktile Mechanismen der Zelle durch Inaktivierung von Rho A und die Aktivierung von Rac 1 und Cdc42 zu regulieren (Noren et al., 2000). Das Ausschalten von p120-Catenin führte in humanen Zellen zu einer Destabilisierung der Adhärensjunktionen, ebenso zeigten Zellen mit reduzierter Expression von p120-Catenin eine verminderte Membranlokalisierung und gestörte AJ-Bildung (Erez et al., 2005). Diese p120-Catenin-vermittelten Effekte auf AJ gingen mit Veränderungen der Aktivität von Rho-GTPasen einher (Erez et al., 2005).

2.4.2. Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion durch cAMP

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass cAMP-steigernde Mediatoren wie Forskolin, welches die Adenylatzyklase aktiviert, die Permeabilität des Endothels reduzieren (Stelzner et al., 1989). Es ist somit eine etablierte Meinung, dass ein Anstieg an intrazellulärem cAMP in vivo und in vitro zu einer gesteigerten Barrierefunktion führt (Lorenowicz et al., 2007; Michel and Curry, 1999; van Nieuw Amerongen and van Hinsbergh, 2002). Die zugrunde liegenden Mechanismen beinhalten zum einen eine gesenkte Aktin-Myosin-Kontraktilität, verursacht durch eine verminderte Phosphorylierung der Myosinleichtketten (myosin light chain; MLC) über Proteinkinase A (PKA)-vermittelte Hemmung der MLC-Kinase (MLCK) (Gallagher et al., 1997; Garcia et al., 1997; Nishikawa et al., 1984). Zum anderen spielt auch eine PKA-vermittelte Inhibition von Rho A durch Serin¹⁸⁸-Phosphorylierung eine Rolle (Ellerbroek et al., 2003; Loirand et al., 2006). Dies verursacht eine gesteigerte Interaktion von phosphoryliertem Rho A mit GAPs, die zu Inaktivierung der GTPase führt (Loirand et al., 2006), so dass weniger phosphorylierte MLC vorliegen (Qiao et al., 2003). Außerdem phosphoryliert PKA einige aktinbindende Proteine wie VASP (Blume et al., 2007; Harbeck et al., 2000; Rosenberger et al., 2007) oder Filamin (Hastie et al., 1997; Wu et al., 1994), welche möglicherweise über Regulation der Aktindynamik die Barriere beeinflussen. So soll es durch Phosphorylierung von VASP zu einer Reduktion der VASP-abhängigen Aktinpolymerisation und Stressfaserbildung kommen (Bogatcheva et al., 2002). Eine gestörte Regulation der Aktindynamik führt zu gesteigerter Permeabilität in vivo (Waschke et al., 2005). Es scheinen Aktinfilamente nötig zu sein, endotheliale Junctionen zu stabilisieren (Bazzoni and Dejana, 2004). Darüber hinaus konnte eine barriestabilisierende Aktivität von PKA in früheren Studien ermittelt werden (Patterson et al., 2000), die nicht nur über Regulation kontraktile Mechanismen erklärbar war.

Es wurde gezeigt, dass eine Verstärkung der Barrierefunktion auch über eine Reorganisation und Umverteilung von Adhärens- und Occludensjunctionsproteinen (Cullere et al., 2005) oder auch über eine Verstärkung der VE-Cadherin-Bindung (Fukuhara et al., 2005; Kooistra et al., 2005) funktionieren könnte. Diese veränderte Regulation von VE-Cadherin ist allerdings PKA-unabhängig reguliert. So kann ein Anstieg von cAMP auch über die Aktivierung der GTPase Rap 1 und deren GEF Epac laufen. Dies wurde gezeigt, da das cAMP-Analog O-Me-cAMP konzentrationsabhängig spezifisch an Epac bindet und somit nur den Epac/Rap 1-Signalweg aktiviert (Christensen et al., 2003;

Holz et al., 2006). Durch O-Me-cAMP war es möglich, die durch PAF induzierte Umstrukturierung der endothelialen Adhärensjunktionen und den damit assoziierten Permeabilitätsanstieg zu verhindern (Adamson et al., 2008). Über welche nachgeschalteten Effektoren cAMP und Rap 1 die Endothelbarriere stabilisieren, war sehr lange unklar. In früheren Studien wurde eine direkte PKA-vermittelte Modulation von Rac 1 durch Phosphorylierung ausgeschlossen (Ellerbroek et al., 2003). Allerdings wurde auch gezeigt, dass cAMP über PKA-abhängige Mechanismen in der Lage war, die barriere destabilisierenden Effekte einer Rac 1-Inaktivierung durch Letales Toxin in vivo zu blockieren, so dass ein cAMP-vermittelter Rac 1-regulierender Mechanismus angenommen wurde (Waschke et al., 2004b). Die genaue Rolle von cAMP, Rap 1 und Rac 1 in der Regulation der Barrierefunktion im mikrovaskulärem Endothel ist nicht bekannt. Erst seit kurzer Zeit gibt es Anhaltspunkte, dass Rac 1 dabei im Endothel eine wesentliche Rolle spielen könnte (Birukova et al., 2007b). Rap 1 kann in Fibroblasten Rac 1 über die GEFs Vav2 und Tiam 1 aktivieren. Außerdem kann Rap 1 Rho A über Arap3 inaktivieren. Somit sind Rho A und Rac 1 geeignete Kandidaten, protektive Effekte von cAMP zu vermitteln (Kooistra et al., 2005; Lorenowicz et al., 2007). Tatsächlich wurde in makrovasulären Zellen gezeigt, dass O-Me-cAMP die durch Thrombin-induzierte Permeabilitätssteigerung vermindern konnte, was mit einer Inhibition der durch Thrombin verursachten Rho A-Aktivierung einherging (Cullere et al., 2005).

2.5. Zielsetzung der Arbeit

Eine intakte Endothelbarrierefunktion ist grundlegend für einen gesunden Organismus. Das Verständnis der Rolle und der Funktion barriereregulatorischer Mediatoren und Proteine ist somit äußerst wichtig. So regulieren GTPasen der Rho-Familie die Endothelbarriere zum einen durch Regulation des Aktinzytoskeletts, zum anderen wohl aber auch durch direkte Modulation endothelialer Junctionsproteine. Sehr viele Studien wurden an sehr verschiedenen Endothelzelltypen vorgenommen, die Unterschiede bezüglich der Regulation und der Effekte von Rho-GTPasen in Abhängigkeit des zellulären Hintergrunds andeuteten. So konnte entgegen der allgemeinen Meinung durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Rho A-Aktivierung nicht in allen Endothelzellen zu einem Barrierezusammenbruch führt. So gaben die Befunde aus myokardialen mikrovaskulären Endothelzellen (MyEnd) den Ausgangspunkt zu dieser Dissertation. Daher wurde in einer ersten Studie in vier verschiedenen Endothelzelltypen *in vitro* und in postkapillären Venulen *in vivo* untersucht, welche Unterschiede bezüglich der Regulation und der Effekte der Rho-GTPasen bestehen. Es wurde mittels bakterieller Toxine eine Aktivierung oder Inaktivierung der Rho-GTPasen herbeigeführt, da bakterielle Toxine die GTPase-Aktivität schnell in allen Zellen eines Verbandes modulieren. In dieser Studie wurden je zwei inaktivierende (Toxin B und Letales Toxin) und zwei aktivierende Toxine (CNF-1 und CNF γ) verwendet.

In einem zweiten Teil dieser Dissertation wurde der schon lang bekannte barriestabilisierende Effekt von cAMP untersucht. Es war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht klar, ob gesteigerte cAMP-Spiegel die Barriere möglicherweise auch über Rac 1-Aktivierung beeinflussen und in wie weit der Epac/Rap 1-Signalweg dabei involviert ist. Es sollte im Rahmen dieser Untersuchungen ermittelt werden, welche morphologischen und funktionellen Veränderungen durch cAMP-Steigerung induziert werden. Hierzu wurde zum einen Forskolin/Rolipram (F/R), welches sowohl PKA-abhängige als auch Epac/Rap 1-abhängige Signalwege aktiviert, und zum anderen das speziell Epac/Rap 1 aktivierende cAMP-Analogon O-Me-cAMP genutzt.

Ebenso sollte in diesem Zusammenhang geklärt werden, wie Thrombin als barriereschwächender Mediator die Aktivität von Rho-GTPasen und den cAMP-Spiegel moduliert. Dabei sollte geklärt werden, ob Thrombin die Barriere nur über Aktivierung von Rho A oder auch über Rac 1- und cAMP-abhängige Mechanismen destabilisiert.

3. Material und Methoden

Eine Auflistung der verwendeten Chemikalien, Lösungen, Puffer, Geräte, Verbrauchsmaterialien und Vektoren ist im Anhang zu finden.

3.1. Material

3.1.1. Kulturzellen

Es wurde sowohl mit makrovaskulären als auch mit mikrovaskulären Endothelzellen (EZ) gearbeitet, die entweder als Primärkultur oder immortalisiert vorhanden waren. Die genutzten Primärzellarten waren zum einen Endothelzellen der Arteria pulmonalis des Schweins (PSEC) und zum anderen humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen aus Brustbiopsaten des Menschen (HDMEC). Als immortalisierte Zelllinien wurden mikrovaskuläre Endothelzellen des Mesenteriums (MesEnd) und des Myokards (MyEnd) von Mäusen verwandt. Für Versuche genutzte Endothelzellen wurden immer erst nach Erreichen der Konfluenz verwendet. MyEnd, MesEnd und PSEC wurden selbst präpariert, während die HDMECs kommerziell über die Firma PromoCell erworben wurden.

Tab. 2: Auflistung der verwendeten Zellen.

				Herkunft
PSEC	makrovaskulär	Primärzellen	(Schnittler et al., 1990)	Schwein
HDMEC	mikrovaskulär	Primärzellen	PromoCell	Mensch
MesEnd	mikrovaskulär	immortalisiert	(Baumer et al., 2008a)	Maus
MyEnd	mikrovaskulär	immortalisiert	(Golenhofen et al., 1999)	Maus

Die in dieser Arbeit genutzten Endothelzellen wurden vor Gebrauch mit Immunfluoreszenz- und Western Blot-Analyse auf das Vorhandensein typischer Endothelzellmarker überprüft. Durch das Vorhandensein von VE-Cadherin, PECAM 1, β -Catenin und Von-Willebrand-Faktor konnte sichergestellt werden, dass mit Endothelzellen gearbeitet wurde.

3.1.2. Medien

Zur Kultivierung der mikrovaskulären Endothelzellen aus der Maus (MesEnd und MyEnd) diente Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), das mit 10 % FCS und 50 U/ml Penicillin/Streptomycin (P/S) versetzt wurde. Die Endothelzellen, präpariert aus der Arteria pulmonalis des Schweins (PSEC), wurden in Passage 0 mit 20 % FCS-versetztem

M199 kultiviert und anschließend ab Passage 1 in 10 % FCS in M199 gehalten. Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC) wurden in Endothelial Growth Medium (PromoCell, Heidelberg) kultiviert. Dem Medium wurde ein Supplement-Mix (PromoCell, Heidelberg) und 50 U/ml PenicillinG und 50 µg Streptomycin (P/S) hinzugefügt.

Tab.3: Auflistung der für die jeweiligen Zelllinie benutzten Medien.

	FCS	P/S	Medium	Hersteller des Mediums	Sonstiges
PSEC	20 % / 10 %	ja	M199	Sigma-Aldrich, Steinheim	p0: 20 % FCS, ab p1: 10 % FCS
MyEnd	10 %	ja	DMEM	Life Technologies, Karlsruhe	---
MesEnd	10 %	ja	DMEM		---
HDMEC	---	ja	Endothelial Growth Medium	PromoCell, Heidelberg	Supplement Mix-Zugabe

3.1.3. Testreagenzien

Toxine:

Tab.4: Auflistung der für die jeweiligen Zelllinie benutzten Toxin-Konzentrationen.

	Herkunft	MyEnd	MesEnd	HDMEC	PSEC	in vivo
CNFy	Prof. Gudula Schmidt (Institut für Pharmakologie und Toxikologie Freiburg)	900 ng/ml				
CNF-1		300 ng/ml				---
Toxin B	Prof. Holger Barth (Universität Ulm)		100 ng/ml		300 ng/ml	100 ng/ml
LT	Dr. Torsten Giesemann (Universität Freiburg)		50 ng/ml		100 ng/ml	---

Entzündungsmediator:

Thrombin: Die Serinprotease Thrombin ist nicht nur ein Koagulationsinduktor, sondern steigert auch die Endothelpermeabilität in kultivierten Endothelzellen, weshalb Thrombin in vielen Studien als Entzündungsmediator eingesetzt wird (Malik et al., 1986).

Verwendung: 10 U/ml

Andere Mediatoren:

Forskolin: Ein aus dem Harfenkraut (*Coleus forskohlii*) gewonnener Wirkstoff, der Adenylatzyklasen stimuliert und dadurch den intrazellulären Spiegel von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) erhöht.

Verwendung: 5 µM (in Kombination mit Rolipram)

- Rolipram*: Ist ein PDE 4-Inhibitor, der den Abbau von cAMP in der Zelle hemmt.
Verwendung: 10 μ M (in Kombination mit Forskolin)
- O-Me-cAMP*: 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (O-Me-cAMP) ist ein selektiver Aktivator von Epac (Exchange protein directly activated by cAMP), einem cAMP-reguliertem GEF für Rap 1 und Rap 2.
Verwendung: 200 μ M
- Y27632*: Y27632 hemmt selektiv die Rho-assoziierte Protein-Kinase p160ROK.
Verwendung: 30 μ M
- BAPTA*: BAPTA ist Ca^{2+} -spezifischer Chelator. Er besitzt vier Carboxylsäuregruppen, die die Bindung jeweils zweier Ca^{2+} -Ionen ermöglichen. Damit eine Bindung von Ca^{2+} erst intrazellulär geschieht, sind die Carboxylgruppen verestert. Die Ester werden erst nach Aufnahme in die Zelle gespalten.
Verwendung: 20 μ M
- NSC-23766*: NSC-23766 ist ein spezifischer und reversibler Rac 1-Inhibitor. Er hemmt die Rac 1-GDP/GTP-Austauschaktivität, indem es mit den Rac 1-spezifischen GEFs Trio und Tiam 1 interagiert. Dieser Inhibitor hat keine Effekte auf Rho A oder Cdc42 (Gao et al., 2004).
Verwendung: 200 μ M

3.1.4. Antikörper

Erstantikörper

Die im Folgenden aufgeführten Primärantikörper wurden sowohl für Immunfluoreszenzanalysen als auch im Immunoblot eingesetzt.

Zum Anfärben von filamentärem Aktin in grün wurde farbstoffgekoppeltes Alexa-Phalloidin 488 in einer Verdünnung von 1:60 verwendet. Phalloidin ist das Toxin des Knollenblätterpilzes und bindet an die Verbindungsstelle der Aktinuntereinheiten in einem Aktinfilament. Um filamentäres Aktin rot darzustellen, wurde TRITC-Phalloidin in einer Verdünnung von 1:60 eingesetzt. Beide Substanzen wurden von Mobitec (Goettingen, Deutschland) bezogen und zusammen mit dem Zweitantikörper zugegeben.

Tab.5: Auflistung der für das jeweilige Protein genutzten Erstantikörpers und dessen Eigenschaften.

Zielstruktur	Bemerkung	Verdünnung		Quelle/ Referenz	Sekundär- antikörper
		in IF	im Blot		
β-Catenin	---	1:100	1:1000	Sigma, Steinheim	garb
Cdc42	IF nur in PSEC und HDMEC	1:100	1:1000	Dianova, Hamburg	garb
Claudin 5	---	1:50	1:500	Zymed Laboratories, San Fransisco	garb
Cortactin	Alexa-Phalloidin 488- gekoppelt	1:100	---	Upstate, NY	---
PECAM 1	funktioniert in IF nicht	---	1:1000	Santa Cruz, CA	garb
P-VASP	funktioniert in IF nicht	---	1:1000	Prof. U. Walter, Universität Würzburg	gam
Rac 1	IF nur in PSEC und HDMEC	1:100	1:500	Upstate, NY	gam
Rho A	funktioniert in IF nicht	---	1:1000	Upstate, NY	gam
VASP	---	1:100	1:1000	Prof. U. Walter, Universität Würzburg	garb
VE-Cadherin	nur in MyEnd/MesEnd	unverdünnt (Hybridoma Überstand)		IgG _{2a} 11D4.1, Hybridomazellen Gotsch et al.,1997	gart
VE-Cadherin	in PSEC und HDMEC	1:100	1:1000	Santa Cruz, CA	dag
Von-Willebrand-Faktor	---	1:100	1:1000	Sigma, Steinheim	garb

Zweitantikörper

Folgende Zweitantikörper wurden nach Erstantikörperinkubation genutzt, um ein Protein sichtbar zu machen.

Tab.6: Auflistung der genutzten Zweitantikörper.

	Abkürzung	Konzentration		Hersteller
		Blot (Peroxidase-gekoppelt)	IF (cy3- o. cy2-gekoppelt)	
goat anti-mouse	gam	1:3000	1:600	Dianova, Hamburg
goat anti-rabbit	garb			
goat anti-rat	gart			
donkey anti-goat	dag			

3.1.5. Statistische Analyse

Statistische Unterschiede der verschiedenen Versuchsansätze wurden anhand eines zweiseitigen “student’s T-Test” (Microsoft ExcelTM) beurteilt. Die Werte sind als Mittelwerte ± Mittelwertabweichung angegeben. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

3.2.1.1. Vorbehandlung von Zellkulturmaterialien

Gelatinieren von Kulturschalen

Manche Endothelzellen benötigen für ihr Wachstum in Kulturschalen einen gelatinierten Untergrund. Dazu zählen PSEC, MyEnd- und MesEnd-Zellen. Bevor diese Zellen in eine neue Kulturschale überführt werden konnten, mussten diese gelatinieren werden. Dazu wurde der Boden der Kulturflasche mit 0,5 % Gelatinelösung bedeckt. Nach 20 min wurde diese wieder entfernt. Vor Kultivieren der Zellen wurden die Kulturschalen mit dem später benötigten Medium gespült und etwas Medium vorgelegt.

Gelatinieren und Quervernetzen von Deckgläschen

Da oben genannte Zellen gelatinieren Flaschen und Kulturschalen benötigten, mussten auch alle anderen Gegenstände gelatinieren werden, auf denen diese Zellen kultiviert wurden. Dazu gehörten Deckgläschen verschiedenster Größen. Die zuvor mit Hitze sterilisierten Deckgläschen wurden unter sterilen Bedingungen mit Gelatinelösung 30 min inkubiert. Danach wurde die Gelatinelösung abgesaugt und zweimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden anschließend mit einer 2 % Glutaraldehydlösung für 30 min ebenfalls unter sterilen Bedingungen quervernetzt (Schnittler et al., 1990). Das Glutaraldehyd musste sorgfältig abgenommen werden und die Deckgläschen wurden dreimal mit PBS gründlich gewaschen. Die Aufbewahrung gelatinierter und quervernetzter Deckgläschen erfolgte bei 4°C in PBS, welches mit 10000 U P/S versetzt wurde.

Gelatinieren und Quervernetzen von Transwellfiltern

Die Kultivierung von MyEnd- und MesEnd-Zellen auf Transwellfiltern erforderte ebenfalls eine Gelatinierung. Für PSEC-Zellen wurde zusätzlich eine Quervernetzung der Gelatineschicht durchgeführt. Die Filter wurden unter sterilen Bedingungen in eine 6-Loch-Platte überführt und für 20 min mit Gelatinelösung inkubiert. Die Gelatine musste danach gründlich mit PBS abgewaschen werden. Zusätzlich wurde mit dem späteren Medium gespült. Um die entstandene Gelatineschicht für die Kultivierung von PSEC quervernetzen, wurden die Filter für 20 min mit 2 % Glutaraldehydlösung überschichtet.

Nach mehrfach gründlichem Waschen mit PBS wurden die Filter in eine neue 6-Loch-Platte überführt.

3.2.1.2. PSEC-Präparation

Pulmonale Schweineendothelzellen aus der Arteria pulmonalis sind primäre makrovaskuläre Endothelzellen. Bevor diese Zellen präpariert werden konnten, mussten Arteriae pulmonales von frisch geschlachteten Schweinen auf dem Schlachthof entnommen werden.

Die entnommenen Gefäße wurden unter der Sterilbank von eventuellen Fett- und Geweberesten befreit. Danach wurde das Gefäß mit sterilem PBS gewaschen, am unteren Ende mit einer Gefäßklemme abgeklemmt, mit Kollagenase-Lösung befüllt und mit einer zweiten Gefäßklemme verschlossen. Es folgte eine Inkubationszeit in 37°C vorgewärmtem sterilem PBS für 11 min. Nach dieser Inkubation wurde die Kollagenase abgegossen und das Gefäß mit 5 ml warmem M199 (ohne FCS) gefüllt, nach oben erneut abgeklemmt und vorsichtig massiert. Durch diese Bewegungen lösten sich die Endothelzellen von ihrem Untergrund ab und gingen in das Medium über. Die so gewonnene Zellsuspension wurde in ein 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und nach Wiederholen dieses Vorgangs bei 900 rpm für 5 min zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 5 ml M199 mit 20 % FCS in eine gelatinierte T25-Zellkulturflasche überführt. Die so präparierten Zellen befanden sich somit in Passage 0 und wurden mit 20 % FCS versetztem M199 versorgt. Zwei Stunden nach Aussat dieser Zellen erfolgte ein erster Mediumwechsel, der einen Tag nach Präparation wiederholt wurde. Ab Passage 1 wurden PSEC in M199 mit 10 % FCS kultiviert.

3.2.1.3. Routinekulturen

Die Zellkulturhaltung erfolgte als offenes System in einem CO₂-Brutschrank bei 37°C, ca. 80 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂.

Als Kultivierungsmedien dienen:

- DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium)
- M199
- HDMEC-Medium (Endothelial Growth Medium)

DMEM und M199 wurden in fertigen Pulvermischungen geliefert, für den Gebrauch in H₂O gelöst und durch Zugabe von NaHCO₃ gepuffert (pH 7,5). Die Medien wurden steril filtriert und anschließend bei 4°C gelagert. Vor dem Gebrauch wurden die Medien mit 50 U/ml Penicillin- G, 50 µg Streptomycin und 10% FCS supplementiert. Endothelial Growth Medium wurde von PromoCell (Heidelberg) bezogen. Diesem Medium musste vor Gebrauch ein Supplement-Mix (PromoCell) und P/S zugesetzt werden.

MyEnd-Kulturen/MesEnd-Kulturen

Die Kulturflaschen und Transwellfilter wurden vor Gebrauch gelatiniert. Der Medienwechsel erfolgte alle zwei Tage. Die Zellen waren 2 Tage nach dem Aussäen konfluent und wurden einmal pro Woche im Verhältnis 1:3 ausgesät. Vor der etwa zehnminütigen Trypsin-Inkubation wurden sie kurz mit Trypsin-Lösung gewaschen.

Tab.7: Angabe der pro Flächeneinheit jeweils benötigten Mengen an Medium und Trypsin.

Kulturgefäß	Grundfläche	Menge an Medium	Menge an Trypsin
12 well	3,83 cm ²	1 ml	0,3 ml
6 well	9,4 cm ²	2 ml	1,0 ml
T 25	25 cm ²	5 ml	1,5 ml
T 75	75 cm ²	18 ml	3,0 ml

PSEC-Kulturen

Wie die meisten Endothelzellen brauchten auch diese gelatinierte Kulturflaschen, Deckgläschen und Transwellfilter. Deckgläschen und Filter mussten zusätzlich quervernetzt werden. Die Kultivierung von PSEC erfolgte in M199 mit ab Passage 1 10 % FCS. PSEC wurden bei Erreichen von Konfluenz im Verhältnis 1:3 ausgesät. Dies war meistens nach ca. 5 Tagen der Fall. PSEC wurden vor dem Splitten mit Trypsinlösung vorsichtig abgespült und danach bei 37°C mit Trypsinlösung ca. 5 min abgelöst.

HDMEC-Kulturen

HDMEC-Zellen brauchten als spezielles Kulturmedium Endothelial Growth Medium (PromoCell, Heidelberg), dem ein Supplement-Mix und P/S zugesetzt wurde. Sie wurden auf ungelatinierten Flaschen, Deckgläschen, Elektroden und Transwellfiltern kultiviert.

Das Medium zum Medienwechsel wurde bei RT verwendet. Beim Aussäen der HDMEC im Verhältnis 1:3 wurde das in die Kulturgefäße vorgelegte Medium eine halbe Stunde im Brutschrank inkubiert, um damit Temperatur und pH-Wert für die frisch abtrypsinieren Zellen richtig einzustellen. Alle für das Aussäen nötigen Lösungen wurden vorher

aufgetaut und ebenfalls bei RT verwendet. Vor der Zugabe der Trypsinierungs-Lösung wurde mit 100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ HEPES/BSA-Lösung (PromoCell) gewaschen. Mit 100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ Trypsinlösung (Trypsin/EGTA; PromoCell) erfolgte bei RT das Abtrypsinieren und nach ca. 3 min Ablösezeit unter mikroskopischer Beobachtung konnte mit 100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ Trypsin-Neutralisations-Lösung der Ablösevorgang abgeschlossen werden. Die Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz (80-90 %) ausgesät. HDEMC wurden für 6-8 Passagen verwendet.

Tab.8: Angabe der pro Flächeneinheit benötigten Mengen Medium und der Bestandteile des Splitkits.

Fläche	Medium	HEPES/BSA-Lösung	Trypsinlösung	Neutralisationslösung
10 cm^2	2 ml	1 ml	1 ml	1 ml
25 cm^2	5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
75 cm^2	18 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml

3.2.1.4. Kryokonservierung von Zellen

Je häufiger eine Zelllinie passagiert wird, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass es zu morphologischen und genomischen Veränderungen der Zellen kommt. Deshalb wurden immortalisierte Zelllinien regelmäßig kryokonserviert und bei Bedarf rekultiviert. Kryokonservierung war möglich bei MesEnd- und MyEnd-Zellen.

Einfrieren von Zellen

Die Zellen einer konfluenten T75-Kulturflasche wurden durch Trypsinbehandlung abgelöst und bei 900 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment in 2 ml vorgekühltem Einfriermedium, das 10 % des kryoprotektiven Dimethylsulfoxid (DMSO) enthielt, resuspendiert. Da DMSO bei RT toxisch an den Zellen wirkt (Zerstörung der Membranen), wurde zügig gearbeitet. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und für eine Woche in einer Einfrierbox bei -80°C , danach in flüssigem Stickstoff gelagert.

Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen in ein 37°C warmes Wasserbad gehalten. Dann wurde die Zellsuspension zum schnellen Verdünnen des DMSO in 10 ml Medium aufgenommen und zentrifugiert (900 rpm, 5 min). Die abzentrifugierten Zellen wurden in 5 ml frischem Medium resuspendiert und in einer entsprechend vorbehandelten T25-Kulturflasche ausgesät. Am folgenden Tag wurden tote Zellen durch Mediumwechsel entfernt.

3.2.1.5. Herstellung von Zelllysaten

Zelllysate sind die Grundlage des Nachweises von Proteinen mittels einer Western Blot-Analyse. Es wurde immer mit Zellen einer Petrischale gearbeitet, die mindestens 70 % Konfluenz erreicht hatten. Für eine einfache Western Blot-Analyse wurden die Proben mit 80 µl dreifach konzentriertem Probenpuffer abgekratzt und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach Zerkleinern des Lysats mittels Ultraschall wurden sie weiter verwendet (siehe 3.2.2.2.). Die Lysatgewinnung für einen Triton-Extraktionsassay wurden ebenfalls aus konfluent in Petrischalen gewachsenen und mit den entsprechenden Toxinen bzw. Mediatoren inkubierten Zellen gewonnen. Hierzu wurden die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen, mit 200 µl 0,5 % Triton-Puffer überschichtet und für 10 min auf Eis belassen. Danach konnte das Lysat durch Abschaben gewonnen werden. Die für Pull Down-Assays benötigten Zelllysate wurden aus in einer T75-Kulturflasche kultivierten Zellen gewonnen, da die Proteinmenge aus kleineren Kulturflaschen nicht ausreichte. Die Zellen wurden mit 1 ml Lysepuffer abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt.

3.2.2. Zellbiologische Methoden

3.2.2.1. Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden die Zellen auf Deckgläschen (Ø 12 mm) in Petrischalen ausgesät, mit Toxinen oder Mediatoren behandelt und nach erfolgter Inkubation mit Formaldehyd hergestellt aus Paraformaldehyd fixiert. Bei der Formaldehydfixierung wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen, dann mit 2 % Formaldehydlösung 5 - 7 min bei RT fixiert, 3 x mit PBS gewaschen und anschließend für 5 min mit 0,1 % Triton-X-100 in PBS permeabilisiert und wiederum 3 x mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden dann auf Objektträger platziert. Unspezifische Bindungsstellen wurden 30 min mit BSA/NGS (normal-goat-serum) oder 10% NDS - (normal-donkey-serum) (abhängig von der Wahl des Zweitantikörpers) abgesättigt und die Zellen anschließend über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer mit einem Erstantikörper (Tab.5) inkubiert. Vor der Zugabe eines markierten Zweitantikörpers wurden die Objektträger wieder 3 x mit PBS gespült. Die Zellen wurden 45 min bei RT mit dem Zweitantikörper (Tab.6) inkubiert, 3 x mit PBS gewaschen und mit 60 %

Glycerin/1 % NPG (n-Propylgallat) - zum Schutz vor Verbleichen - eingedeckt. Alle verwendeten Antikörper wurden in PBS/Natriumazid verdünnt.

3.2.2.2. Proteinanalyse mittels Western Blot

Derartige Analysen dienen dem Nachweis des Vorhandenseins bestimmter Proteine oder dem Auftreten von Mengenveränderungen eines Proteins in einem Zelllysat, welches mittels Probenpuffer gewonnen wurde.

Amidoschwarz-Proteinbestimmung

Eine Proteingehaltsbestimmung mit Amidoschwarz (Zlatanova et al., 1994) erlaubt im Gegensatz zu dem Verfahren nach Bradford eine genaue Bestimmung auch in Anwesenheit hoher Konzentrationen an Detergentien (Triton X-100) oder Salzen und ermöglicht so die Messung von Proben, die in SDS-Probenpuffer oder auch in Triton-Puffer gelöst sind.

Zuerst wurde eine Zelluloseacetatfolie in 1 cm² große Felder aufgeteilt und mit zwei Metallklammern frei schwebend aufgehängt. Je 5 µl der mit SDS- Probenpuffer versetzten Proben wurden auf ein entsprechend beschriftetes Feld aufgetragen. Als Proteinstandard wurde BSA in den Konzentrationen 1,25; 2,5; 5; 10; 20 und 40 µg pro 10 µl analog eingesetzt. Nach dem Trocknen wurden die Foliestreifen 10 min in der Amidoschwarz-Färbelösung auf dem Schüttler gefärbt. Durch mehrfaches Wechseln der Entfärbelösung wurde entfärbt, bis der Hintergrund erneut weiß war. Die Zelluloseacetatfolie wurde in der Luft getrocknet, bevor die Felder auseinander geschnitten und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit je 1 ml Auflöselösung 30 min im 50°C Wasserbad inkubiert wurden. Die Folie löste sich dabei vollständig auf. Die Absorption wurde bei 620 nm im Photometer gemessen. Mit Hilfe des Standards wurde die Proteinkonzentration errechnet.

SDS- PAGE

Das Prinzip der von Laemmli (1970) beschriebenen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) basiert auf der Trennung von Proteinen durch den Molekularsieb-Effekt einer polymerisierten Gelmatrix aus Acrylamid und Bisacrylamid (Laemmli, 1970). Durch das im Probenpuffer und im Gel enthaltene SDS werden die Proteine denaturiert und mit negativen Ladungen besetzt und somit deren Eigenladung

überdeckt, so dass sie nach Anlegen der Spannung in Richtung Anode wandern und dabei ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch ein vorgeschaltetes Sammelgel niedriger Dichte und mit niedrigerem pH-Wert als das Trenngel werden die Proben zunächst durch Isotachophorese am Übergang Sammelgel/Trenngel gestapelt. Erreichten die Folgeionen (Glycin-Ionen) diesen Übergang, so ist der Spannungsgradient zwischen Leit- (Cl⁻-Ionen) und Folgeionen, der die Stapelung bewirkte, aufgehoben und die Proteine werden nun vom gleichen Startpunkt aus im Trenngel nach ihrer Größe aufgetrennt.

Die Flachbettgele wurden zwischen zwei Glasplatten, die durch ca. 1 mm dicke Abstandhalter voneinander getrennt und in einer Halterung eingespannt waren, gegossen. Die Polymerisierung der Gele wurde durch Ammoniumpersulfat (APS) initiiert und Tetramethylethyldiamin (TEMED) diente als Katalysator. Zunächst wurde die 10 % Trenngellösung zwischen die Platten gefüllt und mit Wasser überschichtet, um Sauerstoff fernzuhalten und für eine gerade Oberfläche zu sorgen. Nach dessen Polymerisation wurde das Wasser wieder entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Taschenkamm, der für das Einfüllen der Proben für Aussparungen im Sammelgel sorgte, eingesetzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 3:1 mit dreifach konzentriertem Probenpuffer mit DTT (Dithiothreitol, spaltet intra- bzw. intermolekulare Disulfidbrücken) vermischt und für 5 min auf 56°C erhitzt. Der Auftragspuffer enthielt Glycerin, damit die Gesamtprobe durch ihre höhere Dichte in die Taschen sank, und den Farbstoff Bromphenolblau zum visuellen Verfolgen des Auftrags- und Elektrophoreseprozesses. Es wurde immer auch ein Größenmarker aufgetragen (Prestained protein ladder; PPL Marker; Fermentas, St. Leon – Rot). Die Elektrophorese wurde in 1 x Elektrophoresepuffer bei einer Spannung von 80 V im Sammelgel und bis zu 160 V im Trenngel durchgeführt, bis die durch den Farbstoff markierte Lauffront aus dem Gel herausgelaufen war. Anschließend wurde das Gel für einen Immunoblot genutzt.

Western Blot

Beim Westernblot (Immunoblot) werden Proteine nach einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese im elektrischen Feld auf eine Nitrozellulose-Membran mit hoher Proteinaffinität übertragen. Der Transfer wurde in einer Horizontal-Blot-Kammer mittels Semi-dry-Technik durchgeführt (Kyhse-Andersen, 1984).

Das Gel wurde im Blotpuffer luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Dann wurden Gel und Membran - flankiert von je zwei mit Blotpuffer angefeuchteten Filterpapieren gleicher Größe - zwischen die horizontal angeordneten Graphitplatten gelegt, die als Elektroden dienten. Da die Proteine im elektrischen Feld in Richtung Anode wandern, wurde die Membran auf die Anodenseite und das Gel auf die Kathodenseite der Blotapparatur platziert. Der Transfer erfolgte bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gel über 90 min. Transferierte Proteine wurden zunächst zur Kontrolle des Transfers mit Ponceau für 1-2 min gefärbt. Nach Entfärben mit H_2O wurde das Proteinmuster sichtbar, und bei Bedarf konnten so verschiedene Spuren voneinander getrennt werden.

Western Blot-Analyse

Bei der Western Blot-Analyse können Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern auf der Nitrozellulosemembran nachgewiesen werden. Antigen-Antikörper-Komplexe wurden über das Peroxidase-System durch die Umsetzung eines Chemilumineszenzsubstrates (Entstehung von Photonen und Schwärzung eines Röntgenfilmes) nachgewiesen.

Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran durch Schwenken in 5 % Magermilchpulver in PBS + 0,05 % Tween blockiert. Danach wurde die Membran mit Erstantikörper inkubiert (Erstantikörper Tab.5) Es folgten 45 min Inkubation der Membran mit dem in 5 % Magermilch in PBS + 0,05 % Tween verdünnten Zweitantikörper. Dieser ist gegen den Fc-Teil des Erstantikörpers gerichtet und mit Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt. Nach erneuten 3 x 5 min Waschschritten mit PBS + 0,05 % Tween konnte die Detektion mit Hilfe der ECL-Lösungen (enhanced chemiluminescence) erfolgen. Die Nitrozellulosemembran wurde hierzu 1 min in einer 1 zu 1 Mischung aus den ECL-Lösungen I und II geschwenkt, in der Dunkelkammer in eine Röntgenfilmkassette gelegt und mit Klarsichtfolie abgedeckt. Die Ecken der Nitrozellulosemembran wurden mit einem Edding markiert und schließlich bei Rotlicht ein Röntgenfilm darauf positioniert. Die Exposition erfolgte bei geschlossener Röntgenfilmkassette in der Regel für 1 min, bei Bedarf auch länger (10 min) oder kürzer (bis 15 sec). Hierbei katalysierte die Peroxidase die Oxidation des in der ECL I-Lösung enthaltenen Luminol und löste die Chemilumineszenz aus. Der Röntgenfilm wurde anschließend 1 min in Entwicklerlösung gebadet, mit Wasser gewaschen, dann in Fixierer gelegt und erneut in Wasser gespült. Der Größenmarker der Nitrozellulosemembran wurde auf den getrockneten Röntgenfilm übertragen.

3.2.2.3. Triton-vermittelte Proteinextraktion

Der Triton-Extraktionsassay ist eine Methode zur Analyse von Proteinen, die frei zytosolisch oder gebunden an das Zytoskelett vorliegen. Durch die Herstellung der Zellysate mit einem Triton-Puffer und folgender Abzentrifugation entsteht im Pellet eine Fraktion mit zytoskelettal gebundenen Proteinen und im entstandenen Überstand eine Fraktion aus nicht-zytoskelettal gebundenen Proteinen (Wright et al., 2002). Das so gewonnene Lysat wurde in einer Kühlzentrifuge bei 4°C 14000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand, der die tritonlöslichen Bestandteile wurde abgenommen, mit DTE-haltigem dreifach konzentriertem Probenpuffer versetzt und bis zur Proteinbestimmung bei -20°C tiefgefroren. Das bei der Zentrifugation entstandene Pellet wurde mit 100 µl dreifach konzentriertem Probenpuffer mit DTE versetzt und für 10 min auf 95°C erhitzt. Mit je 5 µl Probe wurden von beiden Fraktionen die Proteingehalte mittels Amidoschwarz bestimmt. Anschließend wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Auch hier wurden angegliche Proteinnengen beider Fraktionen auf ein Gel aufgetragen und mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse VE-Cadherin (10 % Gel) und Claudin 5 (15 % Gel) detektiert.

3.2.2.4. Messung der Aktivität von Rho-GTPasen mittels Pull Down-Assay

Pull Down-Assays sind eine *in vitro*-Methode, die genutzt wird, um Interaktionen zwischen zwei oder mehreren Proteinen zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurden Pull Down-Assays dazu verwendet, um die Aktivierung von Rho-GTPasen nachzuweisen. Um spezifisch aktivierte GTPase aus einem Zellysate zu gewinnen benutzt man Sepharose, die mit einer für die GTPasen spezifischen Bindedomäne beschichtet ist, so dass nur die aktive GTPase bindet. Rho A bindet im aktiven Zustand an Rhotekin und aktives Rac 1 bzw. Cdc42 binden beide an die PAK.

Herstellung der beschichteten Sepharose

Zur Herstellung der für die Sepharose benötigten Proteine wurden in Übernacht-Kulturen Bakterien angezüchtet, welche die Rhotekin- bzw. PAK-Bindedomäne produzierten. Dazu wurde 100 µl der Glyzerinkultur in 300 ml LB-Medium gegeben und mit 2 µl/ml Ampicillin versetzt. Die Kultur inkubierte unter Rotation über Nacht bei 37°C. Am nächsten Tag wurde mit LB-Medium ad 1000 ml aufgefüllt und weiter inkubiert, bis eine

optische Dichte von 1,164 (gemessen bei 600 nm) erreicht war. IPTG, ein künstlicher Induktor des Lac-Operons, wurde 0,5 mM zugegeben und für 3 h weiter bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert, damit eine gesteigerte Translation des entsprechenden Proteins stattfinden konnte. Die entstandene Bakteriensuspension wurde anschließend bei 4°C und 5000G für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 40 ml PBS gelöst und 1 mg/ml Lysozym zugegeben. Die so entstandene Suspension wurde für 30 min auf Eis unter Bewegung inkubiert. Danach wurden 40 ml einer Triton-Lösung (0,2% Triton X-100, 1 mM EDTA in PBS), 40 µl DNase und 40 µl RNase zugegeben und bei 4°C für 10 min auf einem Drehrad inkubiert. Die somit entstandene zähe Masse wurde mittels Ultraschallbad zerkleinert und abzentrifugiert (30 min, 4°C, 5000G), so das im klaren gelblichen Überstand das gewünschte Protein enthalten war. Dieser Überstand wurde mit 3,5 ml equilibrierter Sepharose gemischt und für 1 h bei RT am Drehrad unter Zugabe von 1 M DTT inkubiert. Während dieser Zeit kam es zur Bindung des gewünschten Proteins an die Sepharose. Die mit Protein beladenen Sepharose wurden 3 x mit PBS gewaschen und bei -80°C gelagert.

Rho A/Rac 1 Pull Down-Assay

Nach Inkubation der Zellen mit bzw. ohne Toxine in einer ca. 70 % konfluenten T75-Kulturflasche wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit kaltem TBS (Rho A)/PBS (Rac 1) gewaschen. Wenn alle Medienreste abgespült waren, wurde 1 ml kalter Rho A- bzw. Rac 1-Lysepuffer zugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 15 min bei 4°C an einem Drehrad belassen. Nach dem folgenden Zentrifugationsschritt (5 min bei 14000 U/min) wurde der Überstand abgenommen (Zelllysatsfraktion) und dessen Proteinkonzentration mittels Bradford bestimmt. Jeweils gleiche Proteinmengen des jeweiligen Überstandes wurden zu der mit Rhotekin- bzw. PAK-Dindedomänen beladenen Sepharose gegeben. Diese inkubierten danach 1 h bei 4°C unter Rotation. Nach Beenden der Inkubation wurde die Sepharose mit gebundenem aktiven Rho A/Rac 1 abzentrifugiert, dreimal mit PBS gewaschen und mit 25 µl dreifach konzentriertem Probenpuffer/DTT versetzt. Es folgte eine SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Western Blot-Analyse.

Proteinbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Test ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen, die sehr empfindlich ist (im Bereich Mikrogramm pro Milliliter). Diese Proteinmengenbestimmungsmethode wurde 1976 von Marion M. Bradford beschrieben (Bradford, 1976). Die Grundlage dieser Technik ist eine Bindung der basischen und hydrophoben Seitenketten der Proteine mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 in saurer Lösung. Diese Bindung verursacht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm. Es wurde 1 ml Bradford Reagenz mit 10 µl der Zellysatfraktion versetzt und 10 min bei RT stehen gelassen. Um Farbstabilität zu gewährleisten, wurde diese Lösung innerhalb einer Stunde gegen eine entsprechende Kontrolle bei 595 nm mittels des SmartSpec™ Plus-Spectrophotometers gemessen.

SDS- PAGE/ Western Blot-Analyse

Gleiche Mengen der Zellysatfraktion (ca. 20 µl) werden mit 5 µl Probenpuffer versetzt und als Zellysatfraktionen (enthält aktive und inaktive GTPasen) auf das Gel gegeben. Den Pull Down-Fractionen wurde nach Erwärmen (95°C) und abzentrifugieren der entstandenen jeweiligen Überstandes abgenommen und auf das Gel als Pull Down-Fractionen (nur aktive GTPase) aufgetragen. Anschließend an die SDS-PAGE (15 % Gel) wurde eine wie oben beschriebene Western Blot-Analyse durchgeführt,

3.2.2.5. Messung der Aktivität von Rho-GTPasen mittels GLISA

Der GLISA (GTPase-linked immunosorbent assay) ist eine weitere Methode um Aktivierungsraten von Rho-GTPasen zu untersuchen, die einem ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ähnelt. Es standen bis vor wenigen Wochen nur Rho A- und Rac 1-GLISA zur Verfügung (Cytoskeleton). Folgende GLISA Ansätze wurden nach exakter Anweisung des Herstellers genutzt:

-Rho GLISA Activation Assays Biochem Kit™ (Cytoskeleton Inc., Denver CO, USA)

-Rac GLISA Activation Assays Biochem Kit™ (Cytoskeleton Inc., Denver CO, USA).

Um spezifisch aktivierte GTPase aus einem Zellysat zu gewinnen, nutzt man mit einer für die GTPasen spezifischen Bindedomäne beschichtete Vertiefungen einer 96-Loch-Platte, so dass nur aktive GTPase bindet. Rho A bindet im aktiven Zustand an Rhotekin und aktives Rac 1 bzw. Cdc42 binden beide an PAK.

Endothelzellen wurden bei einem Konfluenzstadium von ca. 70 % in einer 35 mm Petrischale verwendet. Nach Inkubation der Zellen in An- oder Abwesenheit von Toxinen oder Mediatoren wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Danach wurde eiskalter Lysepuffer zugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber lysiert. Durch Zentrifugation für 2 min bei 15000g und 4°C wurde die Lysatfraktion im Überstand gewonnen. 10 µl dieses Überstandes wurden aufbewahrt, um die Proteinkonzentration zu messen. Der Rest wurde sofort bei -70°C weggefroren. Nach erfolgter Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Zelllysate mit Lysepuffer auf gleiche Proteinkonzentrationen eingestellt. 50 µl dieser Lösungen wurden in die entsprechende Vertiefung des entsprechenden GLISAs gegeben. In einem parallelen Ansatz wurde nicht hydrolysierbares Rac 1 oder Rho A als Positiv- oder Negativkontrolle verwendet. Die Lochplatte wurde bei 400 rpm bei 4°C für 30 min auf einem Schüttler belassen. Während dieser Inkubationszeit bindet aktives Rho A oder Rac 1 an die jeweils in den Vertiefungen befindliche Bindedomäne. Danach wurde zweimal mit Waschpuffer bei RT gewaschen. 200 µl Antigen-Präsentationspuffer wurden anschließend in jede Vertiefung gegeben und dort für 2 min bei RT belassen. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden 50 µl des Rho A- oder Rac 1-Erstantikörpers (1:200 verdünnt in Antikörper-Verdünnungspuffer) in jede Vertiefung gegeben und dies für 45 min bei RT auf einem Mikroplatten-Orbitalschüttler bei 400 rpm belassen. Danach wurde erneut dreimal gewaschen und 50 µl des HRP-gebundenen Zweitantikörpers (1:100 verdünnt) zugegeben. Dieser inkubierte erneute 45 min bei 400 rpm und RT. Anschließend wurde wiederholt dreimal mit Waschpuffer gewaschen und 50 µl der HRP-Detektionslösung für 15 min bei 37°C zugegeben. Die folgende Zugabe von 50 µl HRP-Stopplösung beendete das Entstehen der Chemolumineszenz. Die Wells mussten sofort bei 490 nm mittels eines Mikroplattenspektrometers (Sunrise, Tecan GmbH, Crailsheim Germany) vermessen werden. Die Ergebnisse wurden mittels Microsoft Excel ausgewertet.

3.2.2.6. Messung der cAMP-Konzentration

Die Bestimmung intrazellulärer cAMP-Spiegel erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen cAMP-ELISA (Biomol, Germany), der exakt nach Anweisungen des Herstellers angewendet wurde. HDMEC-Zellen wurden in 35 mm Petrischalen ausgesät und bei Konfluenz mit Mediatoren oder Toxin inkubiert. Nach Inkubation wurde das

Medium abgesaugt und mit PBS kurz gewaschen. Die Zellen wurden durch Zugabe von 200 µl 0,1M HCl für 10 min lysiert. Durch Zugabe der HCl wurde nicht nur Lyse induziert, sondern auch die Aktivität endogener Phosphodiesterasen gehemmt. Die gewonnenen Zelllysate wurden anschließend bei 14000 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. 100 µl des entstandenen Überstandes wurden in die Vertiefungen des cAMP-Assays gegeben, welche mit goat anti-rabbit IgG beschichtet waren. Danach wurden 50 µl einer Lösung eines Alkalischen Phosphatase-cAMP-Konjugates und 50 µl einer anti-cAMP-Antikörperlösung zugegeben. Dies wurde dann für 2h bei RT auf einem Orbitalschüttler (500 rpm) inkubiert. Danach wurde dreimal mit je 200 µl Waschlösung gewaschen und 200 µl des p-NPP Substrates (Lösung von p-Nitrophenolphosphat) zugegeben und für weitere 60 min inkubiert. Darauf wurde die Reaktion mit je 50 µl Stopp-Lösung beendet und sofort mittels eines Mikroplattenspektrometers (Sunrise, Tecan GmbH, Crailsheim) bei 405 nm gemessen. Die gemessene optische Dichte wurde mittels einer Standardkurve in cAMP-Konzentrationen umgerechnet. Die Konzentration der jeweiligen Kontrolle in pmol/l wurde gleich 100 gesetzt und in Relation mit den Konzentrationen der anderen Versuche gesetzt. Die Daten wurden mittels Microsoft Excel ausgewertet.

3.2.2.7. Messung der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration mit FURA-2

Für die Bestimmung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in lebenden Zellen eignen sich bevorzugt fluoreszierende Farbstoffe wie FURA-2, die sich intrazellulär anreichern. FURA-2 (FURA-2-acetoxy-methylester) ist ein Anfang der 80er Jahre aus BAPTA (1,2-bis-Aminophenoxytetraessigsäure) entwickelter Ca²⁺-sensitiver Fluoreszenzfarbstoff mit hoher Spezifität und Fluoreszenzintensität (Grynkiewicz et al., 1985). FURA-2 dringt durch seine Lipophilie leicht durch Zellmembranen. Im Zellinneren wird der Ester abgespalten und FURA-2 somit Ca²⁺-sensitiv. Die Ca²⁺-gebundene Form gibt eine maximale Fluoreszenz bei einer Anregung von 340 nm ab. Ist weniger Ca²⁺ an das Molekül gebunden, sinkt die Fluoreszenzintensität ab, so dass man Verschiebungen der Ca²⁺-Spiegel als direktes Maß der Veränderung der Fluoreszenzintensität messen kann. Die für einen derartigen Versuch benötigten HDMEC wurden auf 24 mm-Deckgläschen ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Vor Beginn der Messung wurden die Zellen mit FURA-2 behandelt indem sie mit FRET-Puffer gründlich gewaschen, mit 2 µM FURA-2-Lösung in FRET-Puffer überschichtet wurden und 40 min bei 37°C im

Brutschrank inkubiert wurden. Danach wurden die Zellen erneut gründlich mit FRET Puffer gewaschen und anschließend bei RT 40 min im Dunkeln inkubiert. Vor Beginn der Messung wurden die Zellen mit FCS-freiem Medium versorgt. Die Markierung mit FURA-2 war für circa 1,5 h stabil. Zur Messung wurden die Zellen in eine Halterung eingespannt und mit 500 µl FRET-Puffer überschichtet. Nach einer Kontrollphase von 1 min erfolgte durch Zugabe von 500 µl toxin- oder mediatorhaltigem-FRET-Puffer eine Ca^{2+} -Antwort in HDMEC. Mittels Microsoft Excel und Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) wurden die dabei erlangten Daten ausgewertet und in Diagrammen zusammengefasst.

3.2.2.8. Permeabilitätsmessung mit Filtersystem

Auf Transwell-Filtern kultivierte Endothelzellen ermöglichen die Messung der Permeabilität als Fluss einer fluoreszierenden Lösung (FITC-Dextran 4 kDa) von einem oberen in ein unteres Kompartiment.

Die Endothelzellen wurden entsprechend ihrer Anforderungen auf semipermeablen Filtern (0,4 µm Porengröße; Falcon, Heidelberg) ausgesät, die sich in einer 6-Loch-Platte befanden. Hatten die Zellen ein konfluentes Stadium erreicht, wurden sie mit Toxinen oder Mediatoren inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und mehrmals vorsichtig mit PBS gewaschen, damit alle Medienreste entfernt wurden, da evtl. verbleibendes Phenolrot aus dem Medium die Fluoreszenzmessung falsch positiv beeinflussen könnte. In das untere Kompartiment wurden danach 1,5 ml Medium ohne Phenolrot gegeben. In das obere Kompartiment wurden 1,35 ml Medium ohne Phenolrot und Toxin bzw. Mediator gefüllt. 150 µl einer 10 mg/ml FITC-Dextran (4 kDa)-Lösung wurden zusätzlich in das obere Kompartiment gegeben. Es erfolgte sofort danach die erste Probenabnahme von 50 µl aus dem oberen Kompartiment. Die entnommenen Proben wurden in eine 96-Loch-Platte überführt. Der Nullwert, also die erste Probennahme, wurde mit 50 µl Medium verdünnt. Die 6-Loch-Platte mit den Filtereinsätzen wurde bei 37°C auf einem horizontalen Schüttler weiter inkubiert. Danach erfolgte in 30 min-Abständen eine Abnahme von 100 µl Probe aus den unteren Kompartimenten in die 96-Loch-Platte. Nach 2 Stunden Probenabnahme wurde die Fluoreszenz der 100 µl Aliquots der 96-Loch-Platte mit dem Victor²-Spectrophotometers bei einer Exzitation von 485 nm und der Emission von 535 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel.

3.2.2.9. Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TER)

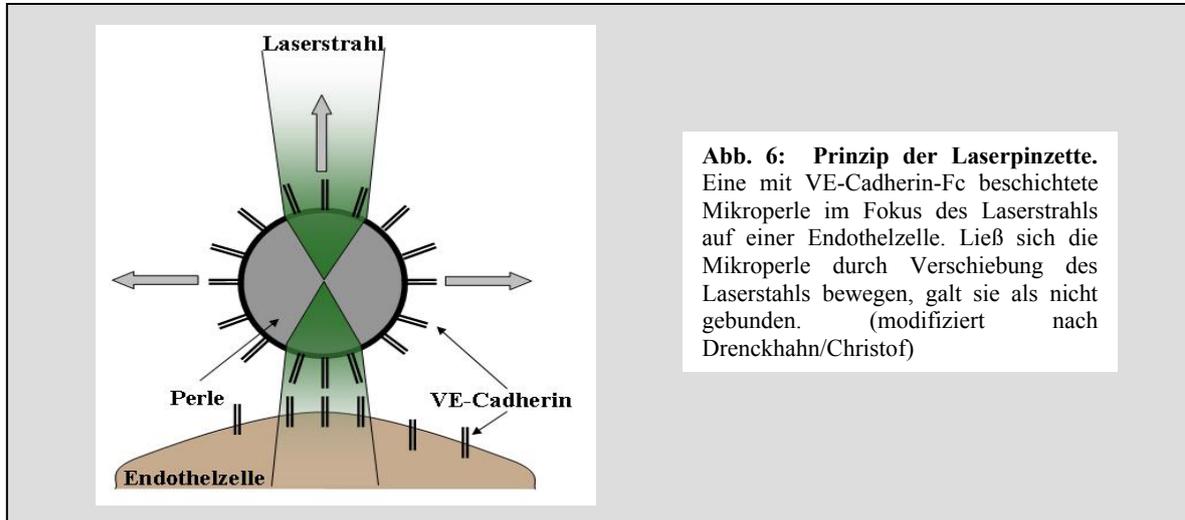
Eine weitere Möglichkeit, Veränderungen der endothelialen Barriere zu bestimmen, ist die Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (transendothelial electrical resistance; TER) (Garcia et al., 2001; Hartmann et al., 2007; Tiruppathi et al., 1992).

Hierfür wurde ECIS 1600R (Applied BioPhysics Inc., USA) genutzt. 40 Elektroden messen parallel innerhalb einer Vertiefung einer ECIS 8-Loch-Platte. Die Fläche eines Wells beträgt $0,15 \text{ cm}^2$. Die einzelnen Elektroden sind mittels der Elektrolyte des auf den Zellen befindlichen Mediums miteinander verbunden. ECIS misst den mit einem angelegten Strom ($1 \mu\text{A}$) assoziierten Spannungsabfall durch das System und bestimmt den elektrischen Widerstand der Zell-überschichteten Elektrode. Voruntersuchungen in unserem Labor ergaben, dass eine Frequenz von 4000 Hz die sensitivsten Ergebnisse bezüglich Veränderungen der TER für Endothelzellen ergab. HDEMCS wurden auf die Elektroden ausgesät und bei Erreichen der Konfluenz nach ca. 10 Tagen für Experimente genutzt. Nach einem Mediumwechsel wurden $200 \mu\text{l}$ Medium in die Vertiefung der Lochplatte gegeben und diese in die Messkammer eingespannt. Nach kurzer Äquilibration von 5-10 min wurden für weitere 5-10 min die Basalwerte der TER ermittelt. Danach wurden weitere $200 \mu\text{l}$ Medium, das wahlweise Toxin oder Mediatoren enthielt, zugegeben. Kontrollen erhielten nur $200 \mu\text{l}$ Medium. Sofort nach Zugabe wurde die Messung fortgeführt. Die Ergebnisse wurden mittels Microsoft Excel ausgewertet.

3.2.2.10. Laserpinzette

Seit den 80er Jahren wird in der physikalischen Grundlagenforschung der Impuls von Photonen (Lichtdruck) zur mechanischen Beeinflussung von kleinen Partikeln eingesetzt (Ashkin et al., 1987). In den Biowissenschaften wird diese Technik bei der Laserpinzette verwendet (Ashkin et al., 1987; Sheetz, 1998). Bei dieser Technik wird ein Infrarotlaserstrahl ($\lambda = 1064 \text{ nm}$) in ein Mikroskopobjektiv gelenkt und von diesem in die Objektebene fokussiert. Mit diesem Laserstrahl ist es möglich, kleine Partikel einzufangen und zu bewegen. Aufgrund ihres elektrischen Dipols wandern diese in einem Lichtintensitätsgradienten immer in Richtung der höchsten Lichtintensität, daher bleiben sie bei Bewegung des Lasers (oder der Unterlage) immer im Fokus, solange sie nicht fest gebunden sind. Mit Hilfe einer Videokamera können die Aktionen auf einem Bildschirm übertragen und beobachtet werden.

Mit der Laserpinzette wurde die Haftung von mit VE-Cadherin beschichteten Mikroperlen auf MyEnd- und MesEnd-Zellen untersucht, nachdem diese mit Toxinen oder Mediatoren behandelt wurden, um herauszufinden, ob Veränderungen der Barrierefunktion durch gesteigert oder geminderte VE-Cadherinhaftung erklärbar sind.



Beschichtung der Protein- A- Mikroperlen

10 µl der mit Protein A beschichteten Polystyren-Mikroperlen-Suspension (2×10^9 Mikroperlen/ml, Durchmesser 2,8 µm) wurden zunächst dreimal mit 100 µl 0,1 M Natriumphosphatlösung (pH 8,1) in einem Eppendorfgefäß gewaschen. In einem Magnethalter für das Eppendorfgefäß sammelten sich die magnetischen Mikroperlen an der Gefäßwand, so dass die Flüssigkeit zwischen den Waschschrritten abgezogen werden konnte. Zum Binden des Proteins an die Perlen wurden diese anschließend in 100 µl 0,5 M Natriumphosphatlösung (pH 8,1) mit 10 µg VE-Cadherin-Fc-Fusionsprotein über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Mikroperlen dreimal mit 0,1 M Natriumphosphatlösung (pH 8,1) gewaschen und anschließend durch dreimaliges Wechseln in 0,1 M Boratpuffer (pH 9) umgepuffert und 45 min in 0,1 M Boratpuffer (pH 8,5) mit 0,54 mg DMP bei RT auf einem Drehrad inkubiert. DMP diente zur Quervernetzung von Protein A mit den Proteinen. Die Mikroperlen wurden zweimal mit 100 µl 0,2 M Ethanolamin (pH 8,0) gewaschen und anschließend noch 2 h bei RT am Drehrad inkubiert, um restliche Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurden die Mikroperlen dreimal für 5 min mit HBSS gewaschen, in 100 µl HBSS aufgenommen und bei 4°C auf dem Drehrad bis zum Gebrauch aufbewahrt. Es wurden keine beschichteten Perlen benutzt, die älter als eine Woche waren. Die Mikroperlen-Konzentration betrug etwa $1,6 \times 10^8$ Mikroperlen/ml.

Messung mit der Laserpinzette

Sterile runde Deckgläser (Durchmesser 24 mm) mit einem konfluenten Endothelzellrasen wurden auf einen Metallobjektträger mit passgenauer Fräsung gelegt, der das Betrachten des Deckglases in Ölimmersion von unten erlaubte, mit Silikon-Paste abgedichtet und mit 200 µl DMEM bedeckt. Zu den Zellen wurden 10 µl mit VE-Cadherin beschichtete Mikroperlen-Suspension gegeben und 30 min gewartet, um das Absinken und die Anhaftung der Mikroperlen auf den Zellen zu ermöglichen. Einzelne Mikroperlen wurden durch Verschieben des Objektträgers in den Fokus des Laserstrahls gebracht. Lose Mikroperlen sprangen in den Laserfokus, feste blieben an ihrem Platz. Die Bindungseigenschaften wurden durch den prozentualen Anteil der Mikroperlen, die sich bei einer bestimmten Laserleistung (42 mW) nicht von der Zelloberfläche bewegen ließen, quantifiziert. Zusätzlich wurden mit Mikroperlen inkubierte Zellen unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt.

3.2.3. Molekularbiologische Methoden

Alle verwendeten thermostabilen Lösungen wurden vor Gebrauch durch Autoklavieren sterilisiert (121°C, 2 bar, 4 h). Thermolabile Lösungen wurden durch Sterilfiltration entkeimt (Sterilfilter Porengröße 0,2 µm). Zur Positivselektion plasmidhaltiger Bakterien wurde den Kulturen Kanamycin (dem Plasmid entsprechend) beigefügt. In dieser Arbeit wurde nur mit konstitutiv aktivem Rac 1 in Form plasmidischer DNA gearbeitet.

3.2.3.1. Transformation von Bakterien mit Plasmiden

Für Transformationen wurden MAX Efficiency DH5αTM Competent Cells (Invitrogen, Carlsbad) verwendet. Diese chemisch kompetenten Zellen wurden bei -80°C gelagert und kurz vor Benutzung auf Eis aufgetaut. Zur Transformation wurden 50 µl Bakterien und 1/5 des Ligationsansatzes gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz 30 sek. zum Hitzeschock auf 42°C erhitzt und danach sofort wieder 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 950 µl SOC-Medium wurden die transformierten Bakterien auf einem Drehrad bei 37°C für eine Stunde bewegt. 200 µl dieser Suspension wurden auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikazusatz

ausplattiert. Die restlichen 800 µl wurden bei 2000 x g 5 min zentrifugiert, das Bakteriensediment in etwa 100 µl Medium resuspendiert und auf einer zweiten Platte ausplattiert. Von über Nacht bei 37°C gewachsenen Klonen wurden am folgenden Tag 5 ml Flüssigkulturen angesetzt.

3.2.3.2. Anzucht von Bakterien in Flüssigkulturen

Flüssigkulturen wurden zum Gewinnen von Plasmid-DNA verwendet. 5 ml LB-Medium mit Antibiotikazusatz wurden in sterile Reagenzgläser gefüllt und mit einzelnen Klonen, die entweder von einer Plattenkultur oder aus einer Glycerinkultur stammten, angeimpft. Die Kulturen wuchsen über Nacht (16-18 h) auf einem Drehrad bei 37°C.

3.2.3.3. Anzucht von Bakterien auf Agarplatten

Der LB-Agar wurde in der Mikrowelle vorsichtig aufgeköcht und anschließend zum Abkühlen ins Wasserbad (50°C) gestellt. Nach dem Abkühlen auf eine Temperatur $\leq 60^\circ\text{C}$ wurde das Antibiotikum zugefügt. Die Agarlösung wurde anschließend in Plastik-Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm gegossen. Nachdem die Platten getrocknet waren, wurden sie kühl gelagert (4°C). Plattenkulturen ermöglichten die Isolation von Einzelkolonien, die zur Animpfung von Flüssigkulturen verwendet wurden. Einzelklone erhielt man entweder aus einer Glycerinkultur durch Ausstreichen mit einer Impföse oder durch Ausstreichen einer Flüssigkultur mit einem Drigalski-Spatel. Nach dem Ausstreichen wurden die Platten bei 37°C für ca. 16 bis 18 h (über Nacht) im Brutschrank inkubiert. Einzelne Kolonien wurden mit einem Zahnstocher bei Bedarf aufgenommen und in einer Flüssigkultur vermehrt. Die Agarplatten wurden mehrere Wochen bei 4°C aufbewahrt, wobei Austrocknung und Kontamination durch den Verschluss der Petrischalen mit Parafilm verhindert wurde.

3.2.3.4. Glycerinkulturen

Zur Lagerung über einen längeren Zeitraum wurden Glycerinkulturen angelegt. Dafür wurde 1 ml Flüssigkultur mit 250 µl 85 % Glycerin gut vermischt und bei -80°C tiefgefroren und gelagert.

3.2.3.5. Isolierung doppelsträngiger Plasmid-DNA

Minipräparationen

Die Plasmid-Minipräparation wurde mit Hilfe eines Reaktionssatzes von Promega nach Anleitung des Herstellers durchgeführt (Wyzard[®] Plus SV Minipräps DNA Purification System; Promega, USA). 2 ml einer 5 ml Übernachtskultur wurden zweimal bei 13000 g 1 min zentrifugiert. Es bildete sich hierbei ein Bakteriensediment am Boden des Röhrchens. Dieser Schritt wurde wiederholt. Das Bakteriensediment wurde mit 250 µl Resuspendierungslösung, die RNase A enthielt, resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl Zellyselösung zugegeben, um die Zellen alkalisch zu lysieren. Das Reaktionsgefäß musste mehrere Male vorsichtig invertiert werden. Dazu wurden 10 µl Alkalische Protease-Lösung zugegeben, vorsichtig invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach erfolgter Zellyse wurden 350 µl Neutralisationslösung zugegeben, 4-mal invertiert und bei 13000 g 10 min zentrifugiert.

900 µl des entstandenen Überstands, der nach Lyse lösliche Zellbestandteile und die gewünschte Plasmid DNA enthielt, wurden auf die Säulen gegeben und 1 min bei RT bei 13000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Säulen wurden danach zunächst mit 750 µl Waschlösung und in einem zweiten Schritt mit 250 µl Waschlösung gewaschen. Nach erfolgtem Waschen wurde noch einmal 1 min bei 13000 g zentrifugiert, bis die Säule trocken war. Im folgenden Schritt wurde die an die Säule gebundene DNA mit sterilem Wasser in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß durch Zentrifugation für 2 min bei 13000 g eluiert. Die DNA wurde bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Die gewonnene DNA konnte für Transfektionen mit Effektene genutzt werden. Eine Transfektion mit Lipofectamin musste mit endotoxinfrei gewonnener DNA durchgeführt werden.

Maxipräparationen

Die endotoxinfreie DNA-Gewinnung erfolgt mit einer kommerziell erhältlichen Maxipräparation (NucleoBond[®] PC 500 EF, Macherey und Nagel) nach Angaben des Herstellers. Die transformierten Bakterien wurden der Glyzerinkultur entnommen und zunächst in einer Startkultur (5 ml LB Medium + 7 µl/ml Kanamycin + 10 µl Glyzerinkultur) eine Nacht im Reagenzglas bei 37°C unter Bewegung angeimpft. Am Tag danach wurde diese Startkultur in 300 ml LB Medium mit 7 µl/ml Kanamycin in einem Schikanekolben gegeben und erneut über Nacht bei 37°C unter Bewegung kultiviert. Die so gewonnene Bakteriensuspension musste am Tag 3 bei 6000 g, 4°C für 15 min

zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen. Das erhaltene Pellet wurde nun einer Zellyse unterzogen, indem mit 12 ml S1-EF Puffer (enthält 100 µg/ml RNase) resuspendiert wurde, 12 ml S2-EF Puffer zugegeben und dies ca. achtmal invertiert wurde. Um die Zellyse abzuschließen, wurden 12 ml vorgekühlter S3-EF Puffer zugegeben, die Mischung durch Invertieren vermengt und 5 min auf Eis stehen gelassen. Währenddessen konnte die Säule Nucleo-Bond-AX500 mit 5 ml Puffer S2-EF equilibriert werden. Das auf Eis stehende Lysat wurde im nächsten Schritt über einen Filter geklärt. Der Durchfluss wurde dann auf die zuvor equilibrierte Säule gegeben. In diesem Schritt kam es zur Bindung des im Durchfluss enthaltenen Plasmid an die Säule. Nach erfolgter Bindung des Plasmids wurde die Säule zunächst mit 2 x 24 ml N3-EF und danach mit 2 x 12 ml N4-EF Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte durch N5-EF Puffer. Das Eluat wurde mittels 11 ml Isopropanol bei RT präzipitiert. Und durch 30 min Zentrifugation bei 12°C fiel das Plasmid als Pellet aus. Nach Abnahme des Isopropanols wurde mit 5 ml 70 % Ethanol das gewonnene Plasmid gewaschen und bei RT für 30 min getrocknet. Im letzten Schritt wurde das so gewonnene Plasmid in 200 µl endotoxinfreiem Wasser gelöst. Aus dieser Lösung wurde der Gehalt bestimmt und ein Kontrollgel angefertigt.

Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration

Um Transfektionen mit der gewonnen DNA reproduzierbar zu machen, musste der Gehalt an DNA photometrisch bestimmt werden. Dazu werden 10 µl der wässrigen DNA-Lösung in 490 µl Ampuwa gegeben und bei 260 nm in einer Quarzküvette gegen einen Lehrwert aus 500 µl Ampuwa vermessen. Die erhaltene optische Dichte muss mit dem Faktor 2500 multipliziert werden, um die Konzentration in ng/ml zu erhalten. Der Faktor 2500 ergibt sich aus der eingesetzten Verdünnung von 1:50 in der Küvette und aus der Tatsache, dass 1 OD bei 260 nm einer Konzentration von 50 ng/ml entspricht.

Kontrollverdau

Ein Kontrollverdau ermöglicht eine Größencharakterisierung entstehender DNA-Bruchstücke in anschließender DNA-Gelelektrophorese durch Einsatz von Restriktionsendonukleasen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Plasmid, welches die Sequenz für konstitutiv aktives Rac 1 enthielt, genutzt. Es wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Kozo Kaibuchi (Nagoya, Japan) zur Verfügung gestellt. Nach erfolgter Mini- oder Maxipräparation wurde ein Kontrollverdau durchgeführt. Dazu wurden 2 µl des

gewonnenen Plasmids mit je 1 μ l der für dieses Plasmid spezifischen Restriktionsendonukleasen BamH1 und Xba1 versetzt, 2 μ l 10-fach Tango-Puffer hinzugegeben und mit Ampuwa auf 20 μ l aufgefüllt. Diese Lösung wurde vorsichtig gemischt und für 3 h im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Während dieser Inkubationszeit schneiden die eingesetzten Restriktionsendonukleasen die DNA in spezifische Bruchstücke. Durch eine anschließende DNA-Gelelektrophorese erfolgte eine Auftrennung dieser Bruchstücke entsprechend ihrer Größe.

DNA-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten (Johnson and Grossman, 1977). Aufgrund der negativen Ladung der Phosphatreste bei alkalischem pH-Wert wandern Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld zur Anode. DNA-Moleküle unterschiedlicher Größe wandern unterschiedlich schnell durch die Agarose. In der vorliegenden Arbeit wurde 0,8 % Agarose verwendet. Durch Auftrennen der DNA im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe kann die gewonnene DNA geprüft werden. Die Agarose wurde durch Aufkochen in 1 x TBE-Puffer gelöst, auf etwa 50°C abgekühlt und in einen Gelschlitten mit Probenkamm gegossen. Nach Erstarren der Agarose wurde der Gelschlitten in die mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und die DNA-Proben (1:6 mit DNA-Probenpuffer versetzt) in die durch den Probenkamm geformten Taschen pipettiert. Durch das im Probenpuffer enthaltene Glycerin kommt es zum Absinken der Proben in die Geltaschen. Außerdem ermöglicht der Probenpuffer durch die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol ein Abschätzen der Wanderungstrecke der DNA-Moleküle während der Elektrophorese. Gleichzeitig mit den DNA-Proben wurde ein DNA-Größenmarker aufgetragen. Die Gelelektrophorese lief bei einer angelegten Spannung von 80–130 V für 30–60 min. Um die Größe in Agarosegelen bei DNA Bestimmungen festzustellen, wurde der Lambda DNA/Eco911 (*Bst*EII) Marker verwendet (Fermentas, St. Leon – Rot).

Durch Ethidiumbromid, dessen Moleküle zwischen den Basenpaaren der DNA interkalieren, wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente sichtbar gemacht. Es absorbiert UV-Licht (302 nm – 366 nm) und emittiert Licht im sichtbaren Bereich (590 nm, rot-orange). Die Intensität des emittierten Lichtes ist proportional zur Menge der in der DNA interkalierten Moleküle. Daher kann man DNA sowohl im Gel sichtbar machen als auch deren Konzentration durch Vergleich mit Banden bekannter Konzentration abschätzen.

Nach der Elektrophorese wurde das Agarosegel für etwa 10 min in einer 0,1 % Ethidiumbromidlösung gefärbt, anschließend auf einem UV-Tisch betrachtet und mit einer Digitalkamera fotografiert.

3.2.3.6. Transfektionsmethoden

Transfektion mit Effektene

Die Transfektion eukaryontischer Zellen erfolgte u.a. mit Effektene nach den Angaben des Herstellers (Effektene® Transfection Reagent, Quigen, Hilden). Bei dieser Form der Liposomentransfektion wird die DNA mit Hilfe von Mizellen durch Verschmelzen mit den Zytoplasmamembranen in die Zellen befördert.

Die Zellen wurden auf Deckgläschen in einer 12-Loch-Platte ausgesät und bei einer Dichte von 70-80 % transfiziert. Pro Vertiefung wurden 600 µg DNA (einer Plasmid-DNA-Minipräparation) eingesetzt. Diese wurden mit 25 µl EC-Puffer versetzt und 3 µl Enhancer dazu pipettiert. Der Ansatz wurde mit gevortext, zentrifugiert und 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden 4 µl Effektene zugegeben, erneut gevortext, zentrifugiert und 10 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde bei den Zellen das Medium entfernt und 500 µl frisches Medium zugegeben. Schließlich wurden 100 µl des Mediums mit 10 % FCS zu dem Transfektionsansatz pipettiert, mit diesem vermischt und auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert, danach das Medium gewechselt und für 24h im Brutschrank belassen. Am folgenden Tag wurden die Zellen für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen fixiert. Zur Selektion enthielten die Vektoren ein EGFP-Gen (Enhanced Green Fluorescent Protein), mit ihm transfizierte Zellen fluoreszieren demnach grün.

Transfektion mit Lipofectamin 2000

Die Transfektion von Endothelzellen kann auch mit einer weiteren Art der liposomalen Transfektion erfolgen. Lipofectamin schleust mit Hilfe von positiv geladenen kationischen Lipiden die Plasmid-DNA in die Zellen ein. Hierzu muss die negativ geladene DNA von den positiv geladenen kationischen Lipiden komplexiert werden. Diese Methode wurde mit Lipofectamin™ 2000 Reagent (Invitrogen) durchgeführt. Es wurde zur Transfektion das von Invitrogen optimierte Medium Opti-MEM® (Invitrogen) verwendet. Das Lipofectamin-Reagenz enthält zwei positiv geladene Komponenten: DOSPA (2,3-

dioeyloxy- N- [2 (sperminecarboxamido) ethyl] –N, N- dimethyl-1-propanaminium trifluoracetat), welches ein polykationisches Lipid darstellt und DOPE (dioleoyl phosphatidylethanolamine), ein Phospholipid. Beide Reagenzien zusammen umhüllen die Plasmid-DNA und ermöglichen über ihre hydrophoben Anteile den Durchtritt durch die Zellmembran. Lipofectamin wurde zusammen mit der Plasmid-DNA (gewonnen aus einer endotoxinfreien Maxipräparation) in einem Verhältnis von 1:2 zu den Zellen gegeben. Hierzu wurden 50 µl Opti-MEM[®] mit 800 µg Plasmid- DNA versetzt. 2,4 µl Lipofectamin 2000 Reagenz wurden mit Opti-MEM[®] ad 50 µl aufgefüllt, vorsichtig gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden Plasmid-DNA-Lösung und Lipofectamin-Lösung zusammengegeben. In einer weiteren 20-minütigen Inkubation bei RT konnten sich die benötigten Liposomen bilden. Die so entstandene Liposomensuspension wurde auf die 24 h zuvor 1:1 auf 12 mm-Deckgläschen ausgesäten Endothelzellen gegeben. Die Endothelzellen mussten vor der Transfektion 24 h ohne Antibiotikazuätze gehalten werden, so dass sie bei Aussat am Tag zuvor in ihrem jeweils benötigten Medium ohne Antibiotika kultiviert wurden. Vor Beginn der Transfektion war es wichtig sicherzustellen, dass die Zellen eine ca. 95 % ige Konfluenz erreicht hatten. Vor Zugabe der Liposomensuspension wurde das Medium der Zellen ebenfalls auf Opti-MEM[®] umgestellt. Das Transfektionsreagenz zusammen mit der DNA wurde dann für 24 h auf den Zellen im Brutschrank belassen. Nach erfolgter Transfektion wurde das Medium der Zellen auf ihr entsprechendes Medium ohne Antibiotika umgestellt und die Zellen für weitere 24 h wachsen gelassen, um danach für Immunfluoreszenzmikroskopie prozessiert zu werden.

Transfektion mit Elektroporation

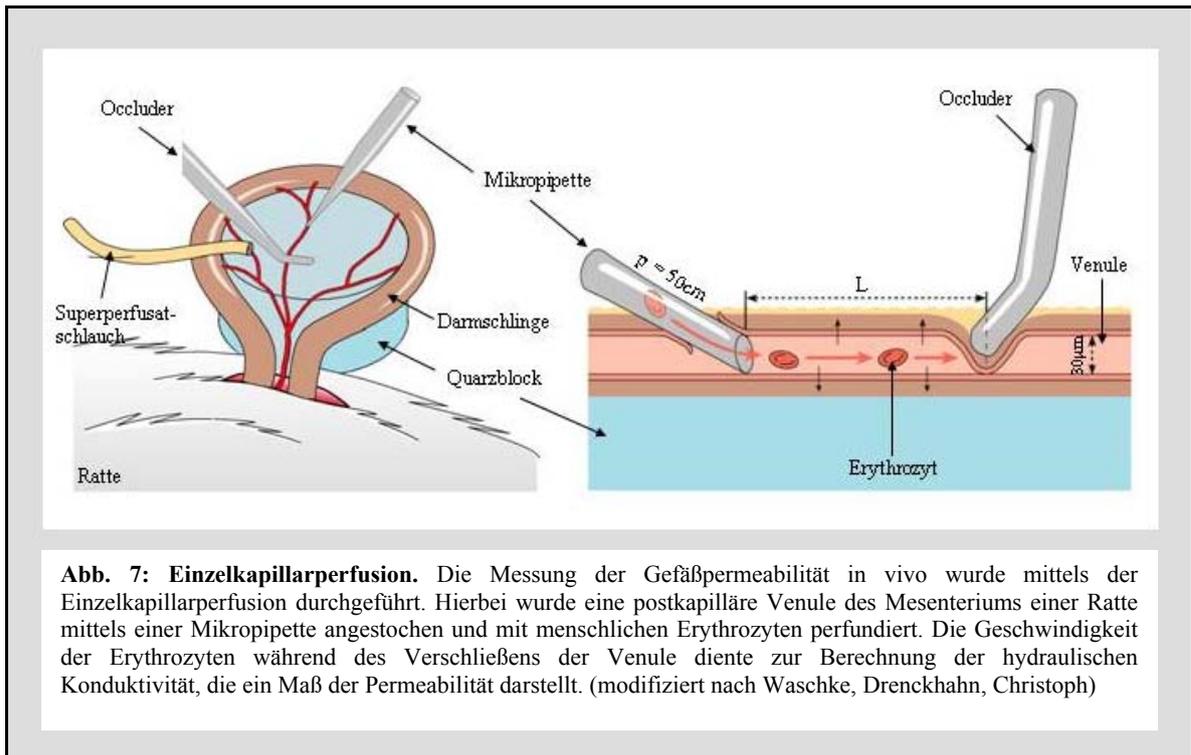
Für besonders schwer zu transfizierende Zellen wie HDMEC nutzten wir eine dritte Transfektionsmethode. Die Nucleofactor[™]-Technologie (Basic Nucleofactor[®]Kit for Primary Endothelial Cells; Amaxa Biosystems) kombiniert die elektrischen Parameter der Elektroporation mit den optimierten Pufferlösungen, die den Transport der DNA direkt in den Zellkern ermöglichen. HDEMCS wurden unmittelbar vor der Transfektion abgelöst. Für eine erfolgreiche Transfektion wurden 5×10^5 Zellen benötigt. Anschließend wurde die entsprechende Menge Zellsuspension für 10 min bei 900 g zentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation und Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 100 µl Basic Nucleofactor Solution aufgenommen und 3 µg endotoxinfreie Plamid-DNA zugegeben.

Die entstandene Zellsuspension konnte nun in die Elektroporationsküvette (Amaxa) überführt werden und mittels NucleofactorII (Amaxa) Programm M003 elektroporiert werden. Die so transfizierten Zellen wurden in einer sterilen Einmalpasteurpipette aufgenommen und je nach Versuchsbedingungen auf Deckgläschen ausgesät und 24 h bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Deckgläschen mit PFA fixiert und für Immunfluoreszenzmikroskopie weiter behandelt.

3.2.4. Einzelkapillarperfusion postkapillärer Venulen *in vivo*

Die Einzelkapillarperfusion postkapillärer Venulen bei Ratten *in vivo* ist eine sehr genaue Methode, um die Permeabilität von mikrovaskulären Venulen zu messen. Sie wurde von Prof. Eugen Landis 1932 etabliert (Krogh et al., 1932) und von Prof. Fitz-Roy Curry an Ratten weiterentwickelt (Michel and Curry, 1999).

Wista Ratten (350-600g) wurden mit 65 mg/kg Pentobarbital narkotisiert. Danach wurde durch mediane Inzision das Abdomen der Ratte geöffnet und das Mesenterium vorsichtig auf einem Quarzblock ausgebreitet. Mittels eines Lichtmikroskops konnten die Gefäße innerhalb des Mesenteriums gesucht werden. Nach Auffinden von Gefäßen mit einer Breite von ungefähr 30 µm und entsprechender Länge ohne Seitenäste wurde es mittels einer Glaskapillare fixiert. Durch Superperfusion mit Ringer-Lösung (37°C) wurde das Mesenterium feucht gehalten. Eine fein geschliffene Kanüle entsprechender Größe wurde mit einer Ringer-Lösung, die 10% bovines Serumalbumin (BSA) enthielt und mit menschlichen Erythrozyten versetzt war, befüllt. Mit dieser Kanüle wurde das Gefäß angestochen und nach erfolgreichem Anstechen nur mit den in der Kanüle und dem Reservoir befindlichen menschlichen Erythrozyten perfundiert. Der Perfusionsdruck betrug in der Regel 50 cm H₂O. Zusätzlich wurde der Perfusions-Lösung Toxine oder Mediatoren zugefügt.



Mittels eines Occluders wurde das Gefäß in einem Abstand von 10 min (erste 20 min alle 5 min) am untersten möglichen Ende durch Druck verschlossen und die strömenden Erythrozyten auf Videoband aufgenommen. Es wurden jeweils drei Verschlüsse durchgeführt. Anhand der Geschwindigkeit der Erythrozyten innerhalb des geblockten Gefäßabschnittes konnte mittels der modifizierten Starling-Formel die hydraulische Konduktivität errechnet werden, welche ein direktes Maß für die Permeabilität des Gefäßes darstellt.

$$L_p = \frac{J_v}{S \Delta P}$$

Die hydraulische Konduktivität berechnet sich aus der Filtration (Volumen/Zeit) pro Oberflächeneinheit pro Einheit hydrostatischer Druckdifferenz.

4. Ergebnisse

4.1. Regulation der Endothelbarriere durch Rho-GTPasen in verschiedenen Endothelien

4.1.1. Aktivierung der Rho-GTPasen durch CNF-1 in verschiedenen Endothelzellen

Um die Aktivitätszustände der Rho-GTPasen nach Applikation bakterieller Toxine zu messen, wurden Pull Down-Assays und GLISA-Messungen durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich die Gesamtmenge an Rho A, Rac 1 und Cdc42 durch die Behandlung der Zellen mit bakteriellen Toxinen nicht signifikant ändert (Abb. 8 A).

CNF γ (Cytotoxic necrotizing factor γ) aktivierte nach 6 h Inkubation in allen Zelltypen, d.h. MesEnd, PSEC und HDMEC, ausschließlich Rho A und nicht Rac 1 oder Cdc42. In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass dies auch in MyEnd der Fall ist (Doktorarbeit Sabrina Burger). Andererseits kam es bei 3-stündiger Behandlung der verschiedenen Endothelzellen mit CNF-1 (Cytotoxic necrotizing factor 1) zu Unterschieden in den einzelnen Endothelien. In MyEnd-Zellen zeigten frühere Befunde, dass durch CNF-1-Behandlung Rac 1 und Cdc42 aktiviert werden. Dagegen zeigte sich in MesEnd, PSECs und HDMECs, dass durch CNF-1-Gabe zusätzlich eine Aktivierung von Rho A auftritt, d.h. CNF-1-Behandlung führt in diesen Zellarten zu einer simultanen Aktivierung von Rac 1, Rho A und Cdc42 (Abb. 8 A).

Des Weiteren konnten wir diese Befunde der Aktivierungszustände der Rho-GTPasen Rho A und Rac 1 in HDMECs durch GLISA bestätigen. Auch in diesen Experimenten (Abb. 8 B) resultierte CNF γ -Behandlung (6 h) in einer spezifischen Aktivierung von Rho A auf $203 \pm 22\%$ des Kontrollniveaus ($n = 5$) während CNF-1-Behandlung (3 h) zu einer simultanen Aktivierung von Rho A ($144 \pm 14\%$; $n = 5$) und Rac 1 ($231 \pm 59\%$; $n = 5$) führte.

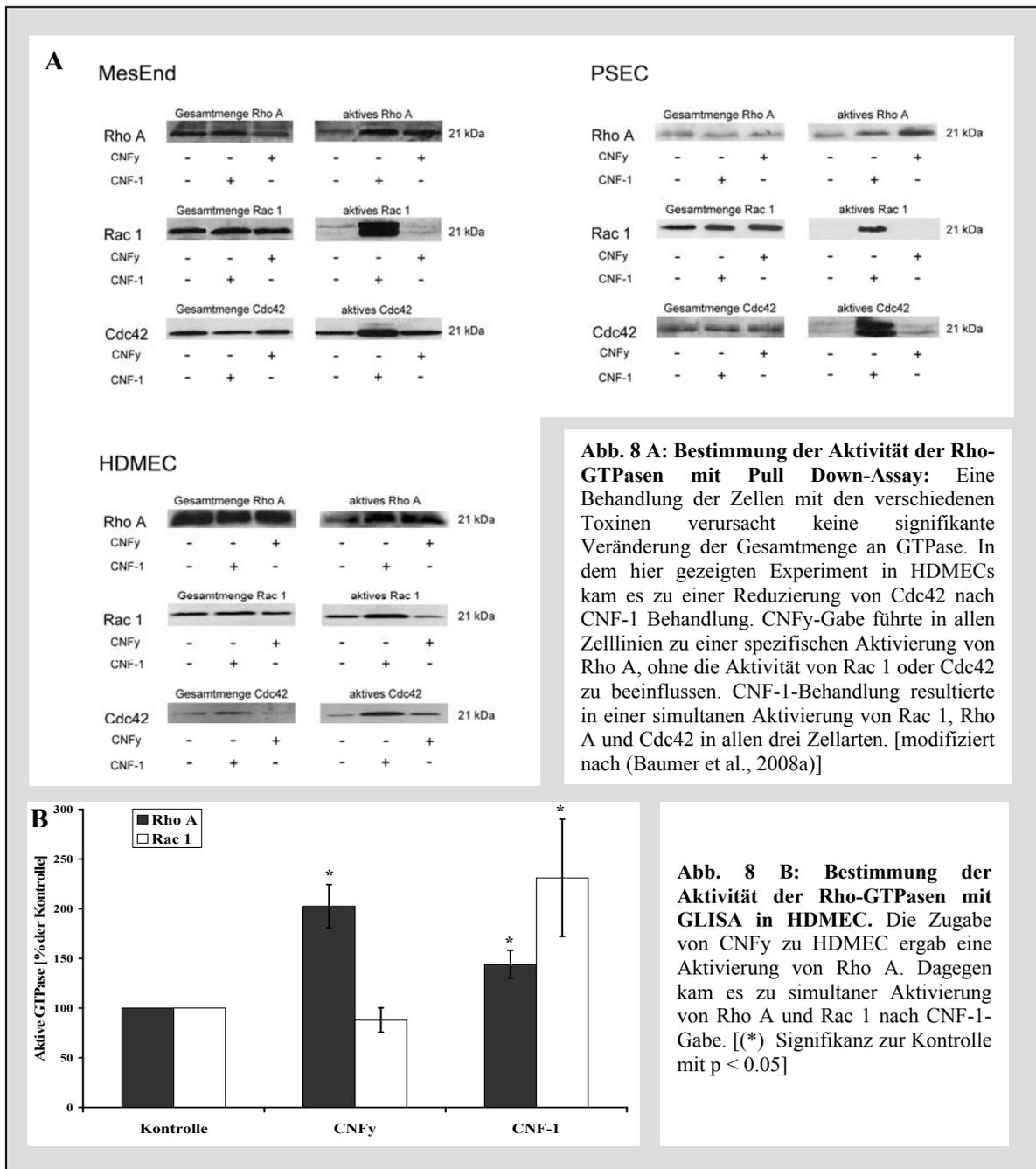


Abb. 8 A: Bestimmung der Aktivität der Rho-GTPasen mit Pull Down-Assay: Eine Behandlung der Zellen mit den verschiedenen Toxinen verursacht keine signifikante Veränderung der Gesamtmenge an GTPase. In dem hier gezeigten Experiment in HDMECs kam es zu einer Reduzierung von Cdc42 nach CNF-1 Behandlung. CNFy-Gabe führte in allen Zelllinien zu einer spezifischen Aktivierung von Rho A, ohne die Aktivität von Rac 1 oder Cdc42 zu beeinflussen. CNF-1-Behandlung resultierte in einer simultanen Aktivierung von Rac 1, Rho A und Cdc42 in allen drei Zellarten. [modifiziert nach (Baumer et al., 2008a)]

Abb. 8 B: Bestimmung der Aktivität der Rho-GTPasen mit GLISA in HDMEC. Die Zugabe von CNFy zu HDMEC ergab eine Aktivierung von Rho A. Dagegen kam es zu simultaner Aktivierung von Rho A und Rac 1 nach CNF-1-Gabe. [(*) Signifikanz zur Kontrolle mit $p < 0.05$]

4.1.2. Einfluss der Rho-GTPasen auf Adhärensjunktionen und Aktinzytoskelett

Da durch Analysen der GTPase-Aktivität in den einzelnen Zellarten Unterschiede aufgetreten waren, wurden im Anschluss immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt, um morphologische Unterschiede bei unterschiedlicher GTPase-Aktivität zu ermitteln.

Zunächst wurden die Effekte von Rho-GTPasen auf endotheliale Adhärensjunktionen und das Aktinzytoskelett der Zelle untersucht. Unsere Arbeitsgruppe untersuchte zuvor die Effekte der Rho-GTPasen auf MyEnd-Zellen (Doktorarbeit Sabrina Burger). MyEnd-Zellen waren den mesenterialen Endothelzellen (MesEnd) sehr ähnlich. So zeigten die MesEnd-Kontrollen in der Aktinfärbung Stressfasern, die das ganze Zytoplasma durchzogen, wohingegen PSEC-Zellen nur einzelne Stressfaserbündel und HDMECs nur wenige Stressfasern aufweisen (Abb. 9 A-C: a). VE-Cadherin war in allen Zelltypen unter Kontrollbedingungen als kontinuierliches Band entlang der Zellgrenzen detektierbar (Abb. 9 A-C: b).

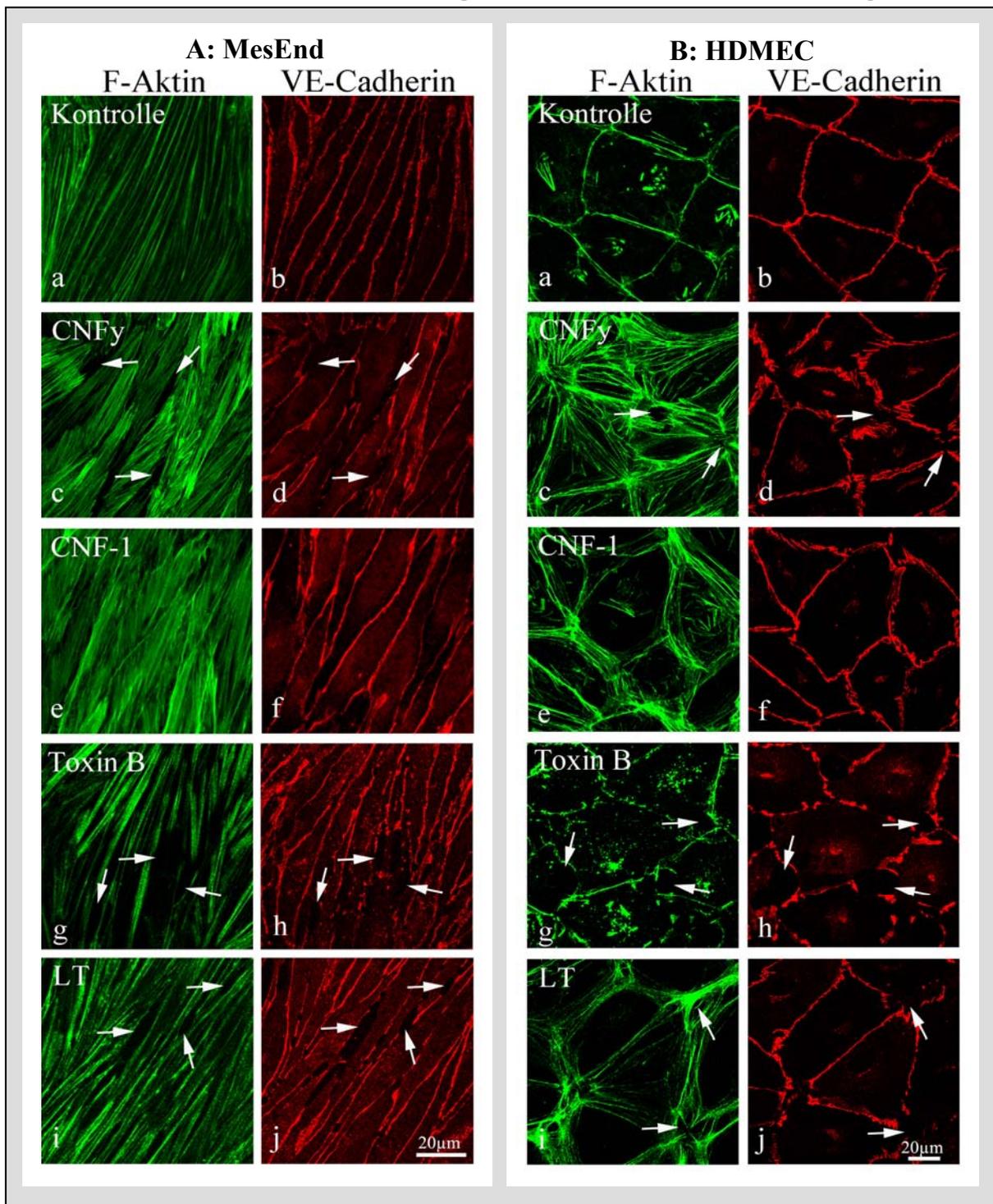
Die Behandlung mit CNFy (6 h), d.h. die Aktivierung von Rho A, führte in allen untersuchten Zellarten zu einer starken Vermehrung von Stressfaserbündeln (Abb. 9 A-C: c). Diese ging in MesEnd, HDMECs und PSECs mit einer Fragmentierung der VE-Cadherin-Färbung (Pfeile in Abb. 9 A-C: c-d) und einer interzellulären Lückenbildung einher.

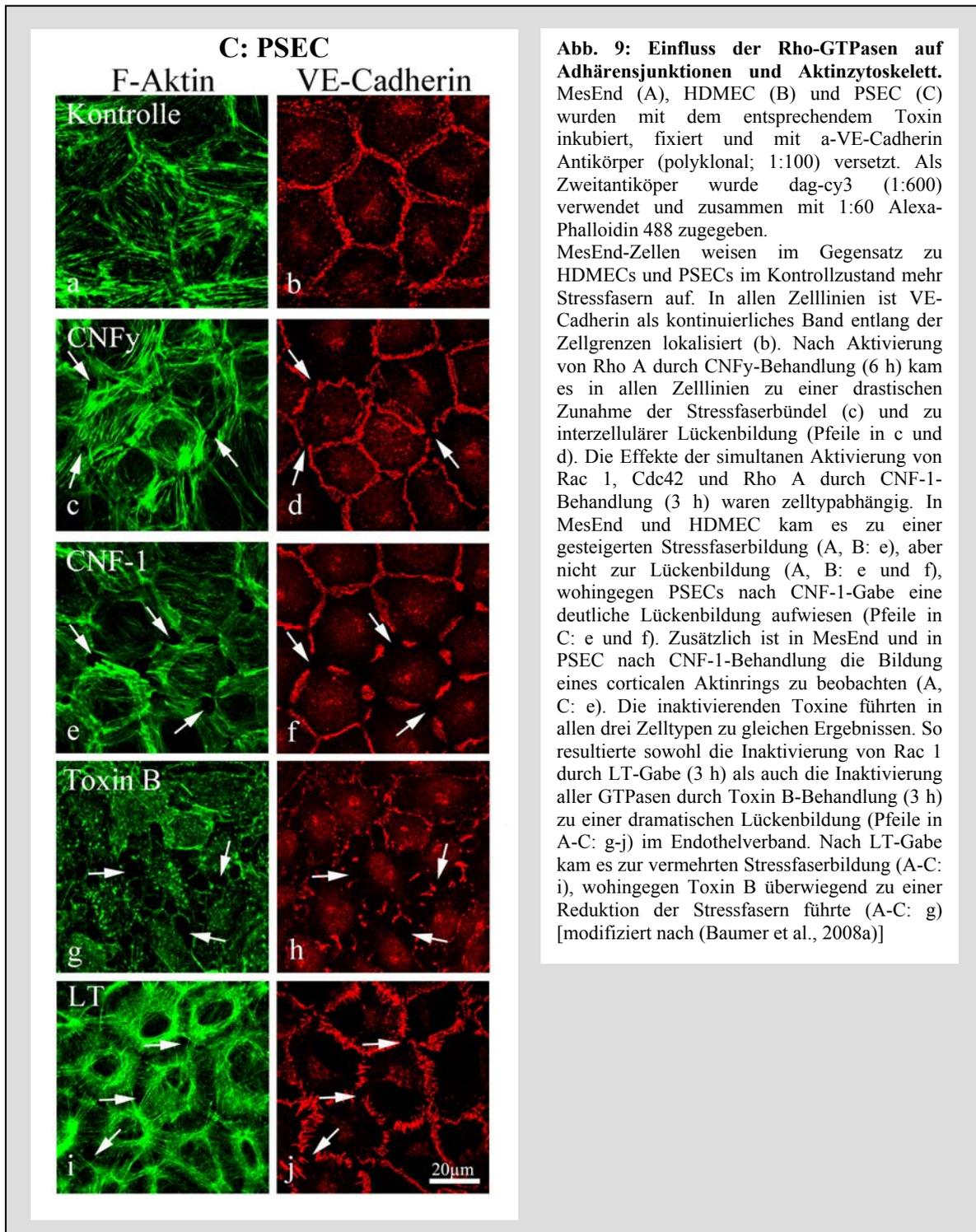
Die simultane Aktivierung aller drei Rho-GTPasen durch Behandlung mit CNF-1 (3 h) zeigte in MesEnd-Zellen und HDMECs gesteigerter Stressfaserbildung (Abb. 9 A und B: e), was wahrscheinlich auf die Rho A-Aktivierung zurückzuführen war. Allerdings kam es zu keinen Veränderungen der VE-Cadherin-Verteilung (Abb. 9 A und B: f). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die durch die Rac 1-Aktivierung in MyEnd-Zellen (nicht gezeigt) aufgetretene Bildung eines verstärkten corticalen Aktinrings in MesEnd-Zellen deutlich geringer zu finden war (Abb. 9 A: e). HDMEC-Zellen wiesen unter gleichen Bedingungen keine Verstärkung des corticalen Aktinbandes auf. Die einzige von uns benutzte makrovaskuläre Endothelzellart (PSEC) zeigte durch die gleichzeitige Aktivierung aller drei Rho-GTPasen nach CNF-1-Gabe (3 h) vermehrte Stressfaserbündel und einen gesteigerten corticalen Aktinring (Abb. 9 C: e). Im Gegensatz zu den mikrovaskulären Endothelzellen konnte hier eine interzellulärer Lückenbildung beobachtet werden (Pfeile in Abb. 9 C: f).

In allen drei benutzten Endothelzelltypen führte die Inaktivierung der drei Rho-GTPasen durch Toxin B-Behandlung (3h) zur Fragmentierung der VE-Cadherin-Färbung und damit verbundener Lückenbildung (Pfeile in Abb. 9 A-C: g und h). Außerdem resultiert eine Toxin B-Behandlung in den primären Zellen (HDMEC und PSEC) in einer Reduktion der Stressfasern (Abb. 9 B und C: g). Dahingegen kam es in MesEnd-Zellen zu keiner signifikanten Reduktion der Stressfaserverteilung (Abb. 9 C: g).

Ähnlich den Effekten von Toxin B führte auch die alleinige Rac 1-Inaktivierung durch Gabe von LT (3 h) zu einer dramatischen interzellulären Lückenbildung (Pfeile in Abb. 9 A-C: i-j). Zudem zeigte sich in allen Endothelzellen eine gesteigerte Stressfaserbildung nach Inaktivierung von Rac 1 durch LT (Abb. 9 A-C: i).

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Aktivierung von Rho A durch CNFy-Gabe (6 h) zu einer Lückenbildung führt, was einen Unterschied zu früheren Befunden in MyEnd-Zellen darstellt (Tab.9). Ebenso führte die Aktivierung von Rho A parallel zur Aktivierung von Rac 1 und Cdc42 durch CNF-1-Behandlung nur in PSECs zu einer Lückenbildung.





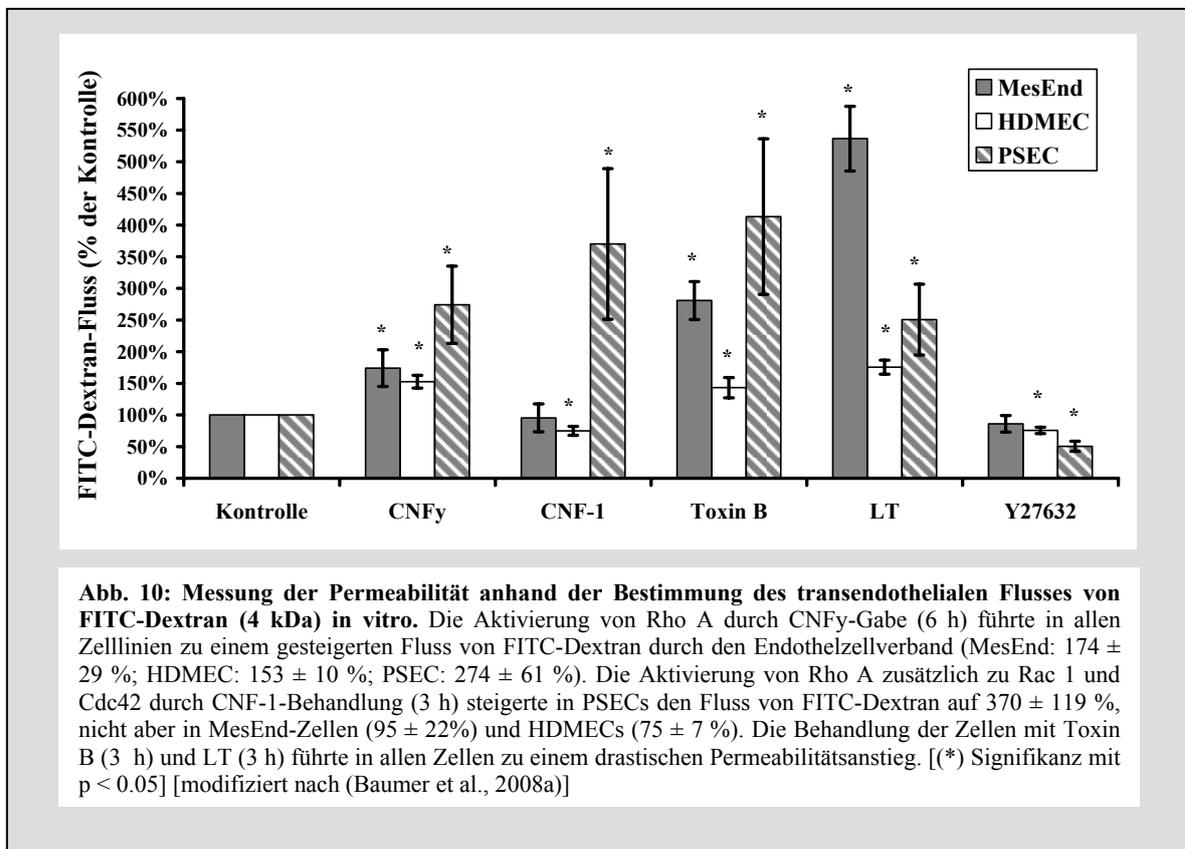
4.1.3. Einfluss der Rho-GTPasen auf die Barrierefunktion *in vitro* und *in vivo*

Um die Barrierefunktion von Endothelzellen *in vitro* zu bestimmen, bedienten wir uns zunächst zweier verschiedener Methoden. Zum einen wurde die Permeabilität als Fluss von

FITC-Dextran (4 kDa) durch einen Zellrasen der entsprechenden Zellen in Transwell-Filtern gemessen. So konnten wir die Veränderungen der Barrierefunktion nach Behandlung mit Toxinen, d.h. nach Aktivierung oder Inaktivierung der Rho-GTPasen, messen (Abb. 10).

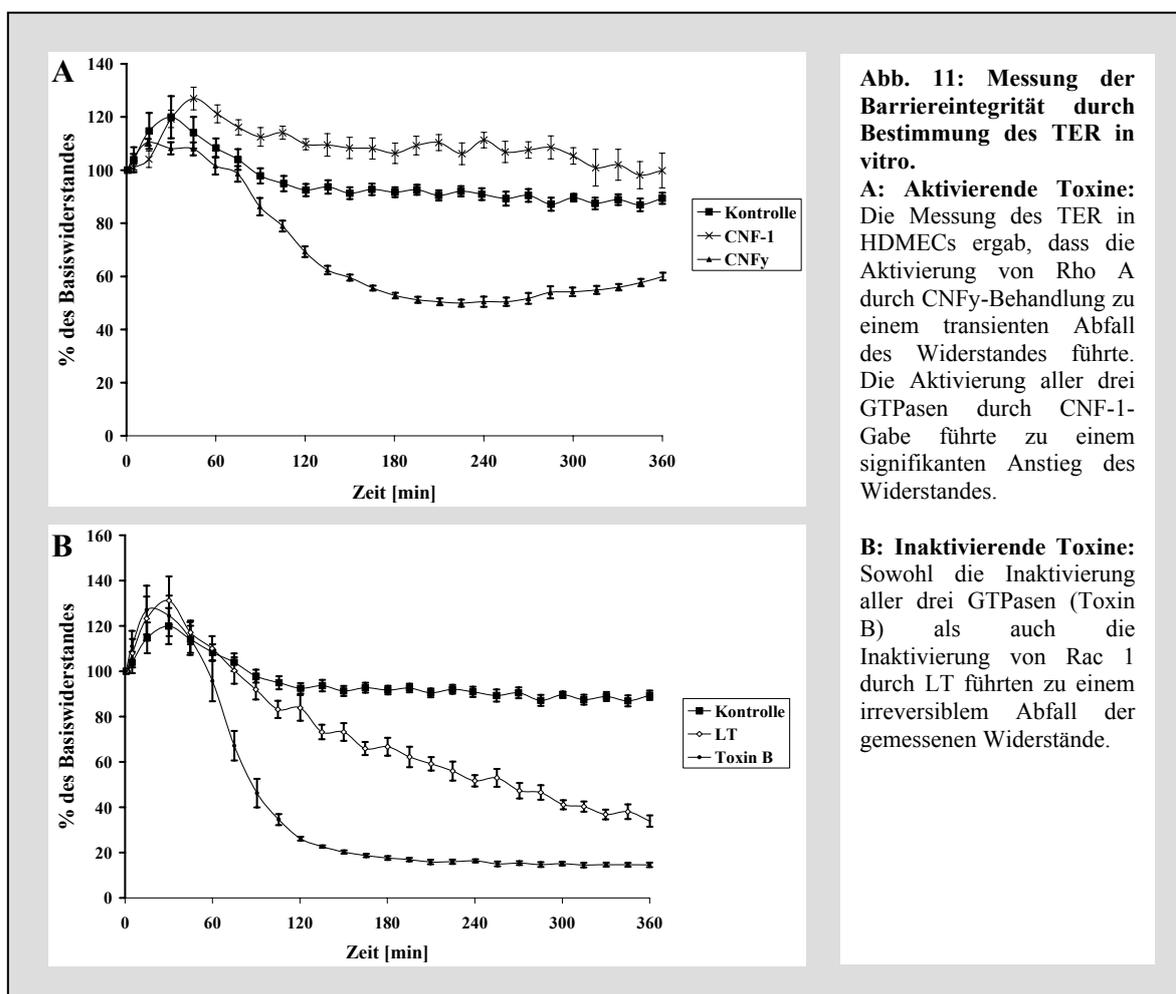
Nach Aktivierung von Rho A durch CNF γ -Behandlung (6 h) wurde festgestellt, dass in MesEnd, HDMEC und PSEC der FITC-Dextran-Fluss gesteigert war (174 ± 29 %, $n = 8$; 153 ± 10 %, $n = 10$; und 274 ± 61 %, $n = 10$). Nach Aktivierung von Rac 1, Cdc42 und Rho A durch CNF-1-Gabe (3 h) zeigten die beiden mikrovaskulären Endotheltypen MesEnd und HDMEC einen unveränderten (95 ± 22 % der Kontrollen, $n = 7$) oder sogar verringerten (75 ± 7 %, $n = 10$) FITC-Dextran-Fluss. Dies zeigte, dass in HDMEC-Zellen die Barrierefunktion trotz simultaner Rho A-Aktivierung gesteigert wurde. PSECs reagierten mit einem Anstieg des FITC-Dextran-Flusses auf 370 ± 119 % des Kontrollniveaus ($n = 10$).

Die Inaktivierung aller drei GTPasen durch Toxin B-Behandlung (3 h) führte in allen untersuchten Endothelien zum Barrierezusammenbruch. Dies zeigte sich durch einen Anstieg des FITC-Dextran-Flusses auf 280 ± 30 % ($n = 16$) in MesEnd, 143 ± 16 % ($n = 8$) in HDMEC und 413 ± 123 % ($n = 12$) in PSEC.



In HDMECs wurde zusätzlich der TER gemessen (Abb. 11). Die Aktivierung von Rho A durch CNFy-Gabe in HDMEC führte nach 4 h zu einer Abnahme des TER auf $55 \pm 1 \%$ der Kontrollwerte. Die Aktivierung von Rac 1, Cdc42 und Rho A durch CNF-1-Behandlung führte in HDMECs zu einer gesteigerten Barrierefunktion, erkennbar an einem signifikanten Anstieg des TER auf $115 \pm 5 \%$ der Kontrolle.

Die Inaktivierung von Rho A, Rac 1 und Cdc42 durch Toxin B sowie von Rac 1 alleine durch LT führte analog zu den Transwellmessungen zu einem Anstieg der Permeabilität in HDMECs. Die normalisierten Werte nach 3 h lagen bei $73 \pm 4 \%$ (LT) und $20 \pm 1 \%$ (Toxin B). Bei Toxin B-Behandlung zeigte sich im Laufe der Messungen über weitere 3 h ein weiteres Absinken des TER auf $41 \pm 3 \%$ des Ausgangswertes.



Die Messung der hydraulischen Konduktivität erlaubt eine Permeabilitätsmessung in vivo. In allen Versuchen mit Toxin B (n=5) und CNFy (n=3) kam es in den perfundierten Gefäßen kam es zu einem Zusammenbruch der Barrierefunktion.

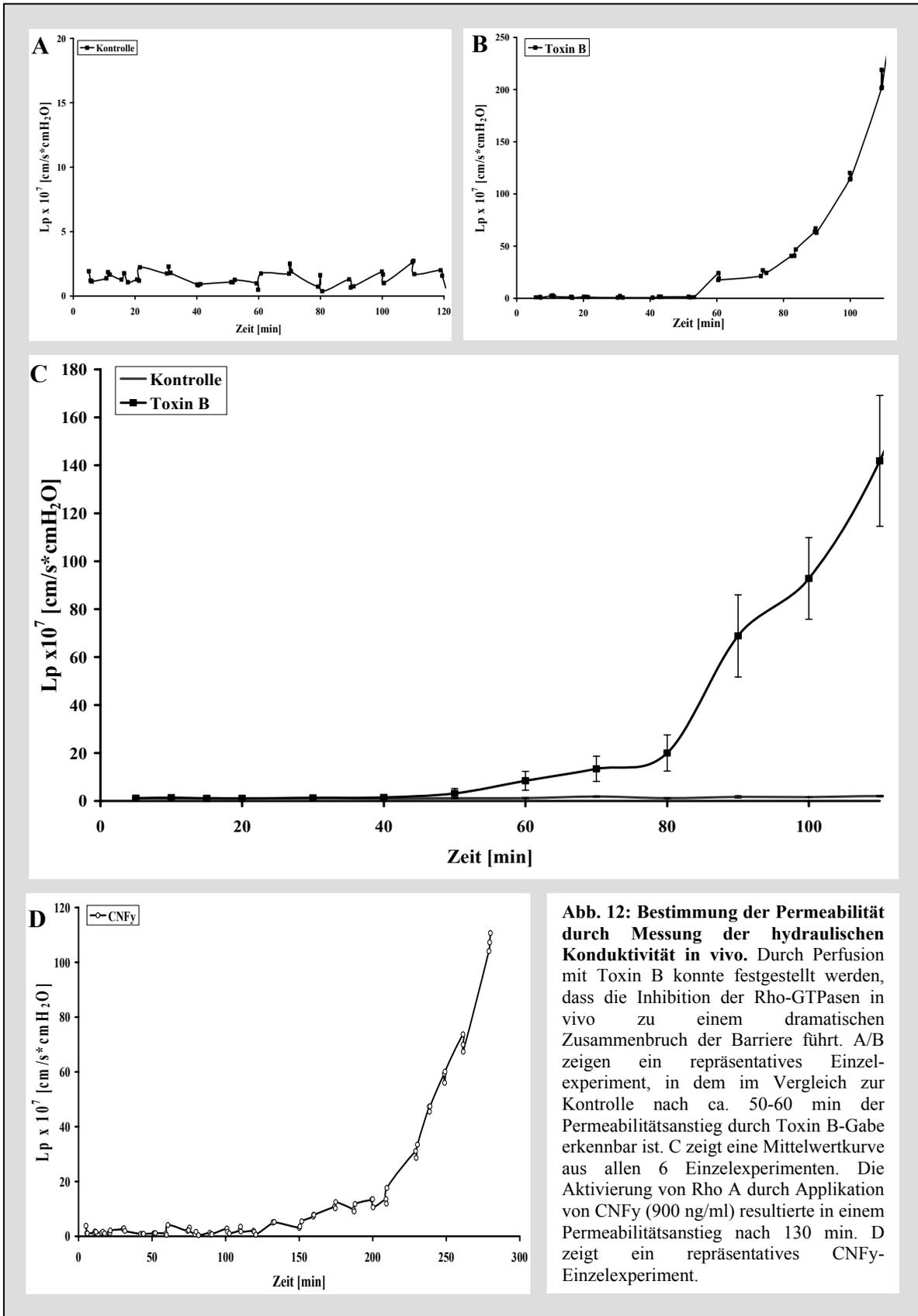


Abb. 12: Bestimmung der Permeabilität durch Messung der hydraulischen Konduktivität in vivo. Durch Perfusion mit Toxin B konnte festgestellt werden, dass die Inhibition der Rho-GTPasen in vivo zu einem dramatischen Zusammenbruch der Barriere führt. A/B zeigen ein repräsentatives Einzelexperiment, in dem im Vergleich zur Kontrolle nach ca. 50-60 min der Permeabilitätsanstieg durch Toxin B-Gabe erkennbar ist. C zeigt eine Mittelwertkurve aus allen 6 Einzelexperimenten. Die Aktivierung von Rho A durch Applikation von CNFy (900 ng/ml) resultierte in einem Permeabilitätsanstieg nach 130 min. D zeigt ein repräsentatives CNFy-Einzelexperiment.

Der Lp lag in den ersten 40 min bei ca. $2 \times 10^7 \pm 0,5 \text{ cm/s*cmH}_2\text{O}$. Verglichen mit Kontrollen zeigte sich ein Anstieg auf $9 \times 10^7 \pm 4 \text{ cm/s*cmH}_2\text{O}$ nach 60 min, auf $44 \times 10^7 \pm 18 \text{ cm/s*cmH}_2\text{O}$ nach 90 min und auf $182 \times 10^7 \pm 80 \text{ cm/s*cmH}_2\text{O}$ nach 120 min, was einem totalen Zusammenbruch der Barriere entspricht. Die Kontrollen zeigten zu keinem Zeitpunkt einen Lp von mehr als $3 \text{ cm/s*cmH}_2\text{O}$ überschritten.

Die Aktivierung von Rho A durch CNFy-Gabe resultierte in den perfundierten Gefäßen in einem Zusammenbruch der Endothelbarriere beginnend nach 130 min. So lag der ermittelte Lp (n = 2) bei $8 \times 10^7 \pm 3 \text{ cm/s*cmH}_2\text{O}$ nach 130 min, bei $27 \times 10^7 \pm 13 \text{ cm/s*cmH}_2\text{O}$ nach 210 min und bei $44 \times 10^7 \pm 2 \text{ cm/s*cmH}_2\text{O}$ nach 240 min.

4.1.4. Rolle der Rho-Kinase in der Regulation der Endothelbarriere

Da es in den hier untersuchten Endothelzelllinien zu einer signifikanten Koaktivierung von Rac 1, Cdc42 und Rho A durch CNF-1-Behandlung kam und die Effekte der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen und der Permeabilitätsmessungen der verschiedenen Endothelien unterschiedlich ausfiel, wurden Kombinationsexperimente mit einem Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 durchgeführt. Wir testeten, ob durch Zugabe von Y27632 die Lückenbildung in PSEC-Zellen nach Gabe von CNF-1 verhindert werden kann. So wurden alle CNF-1- und CNFy-Experimente erneut in Kombination mit Y27632 durchgeführt, diesmal u.a. auch in MyEnd-Zellen (Abb. 13).

Inkubation der Zellen mit Y27632 (1 h) alleine reduzierte den FITC-Dextran-Fluss signifikant unter Kontrollniveau in MyEnd ($41 \pm 9 \%$, n = 6) und PSECs ($51 \pm 8 \%$, n = 10), etwas weniger ausgeprägt in HDMEC ($76 \pm 5 \%$, n = 6), aber nicht in MesEnd-Zellen ($86 \pm 13 \%$, n = 7) (Abb. 10).

Eine Kombination aus CNFy-Behandlung (6 h) und Y27632-Vorbehandlung (1 h) reduzierte den FITC-Dextran-Fluss in MyEnd-Zellen (n = 6), MesEnd-Zellen (n = 6) und in HDMEC (n = 9) um $\sim 50 \%$ und in PSECs (n = 10) um $\sim 80 \%$ verglichen zu den CNFy-Werten. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass ein Teil des durch Rho A-Aktivierung induzierten Permeabilitätsanstiegs über den Rho-Kinase-Signalweg vermittelt wurde.

In MyEnd-Zellen (n = 6) und in HDMEC (n = 8), in denen ein durch CNF-1-Gabe (3 h) reduzierter FITC-Dextran-Fluss ermittelt wurde, konnte diese Barrierestabilisierung durch die Inhibition der Rho-Kinase durch Y27632-Vorbehandlung (1 h) nicht weiter gesteigert werden. Im Gegensatz dazu konnte Y27632-Vorbehandlung (1 h) in Kombination mit

CNF-1-Gabe (3 h) in MesEnd-Zellen (n = 6) und in PSECs (n = 10) den FITC-Dextran-Fluss um ~ 80 % senken.

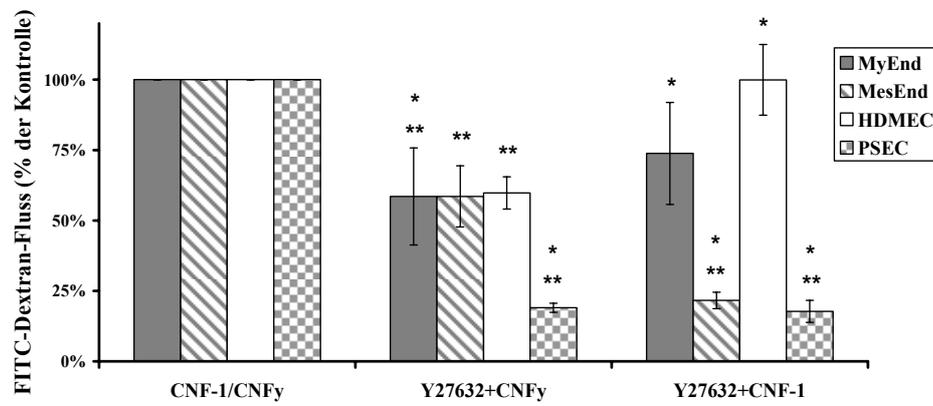


Abb. 13: Messung der Permeabilität durch Bestimmung des transendothelialen Flusses von FITC-Dextran (4 kDa) in vitro. Y27632-Vorbehandlung (1 h) mit CNFy-Gabe (6 h) führte in allen Endothelzelltypen zu einer Stabilisierung der Barriere verglichen mit CNFy alleine (MyEnd $59 \pm 17\%$, MesEnd $59 \pm 11\%$, HDMEC $60 \pm 6\%$, PSEC $19 \pm 2\%$). Die Kombination von Y27632-Vorbehandlung (1 h) und CNF-1-Gabe (3 h) zeigte in MyEnd ($74 \pm 18\%$) und in HDMEC ($100 \pm 13\%$) keine weitere Barrieresteigerung verglichen mit Experimenten, in denen CNF-1 alleine verwendet wurde. Allerdings war in MesEnd ($22 \pm 3\%$) und in PSECs ($18 \pm 4\%$) der FITC-Dextran-Fluss verglichen mit dem jeweiligen CNF-1-Werten reduziert und die Barriere im Vergleich zu Kontrollen stabilisiert. [(*)Signifikanz mit $p < 0.05$ gegen die Kontrolle; (**) Signifikanz gegen CNFy oder CNF-1] [modifiziert nach (Baumer et al., 2008a)]

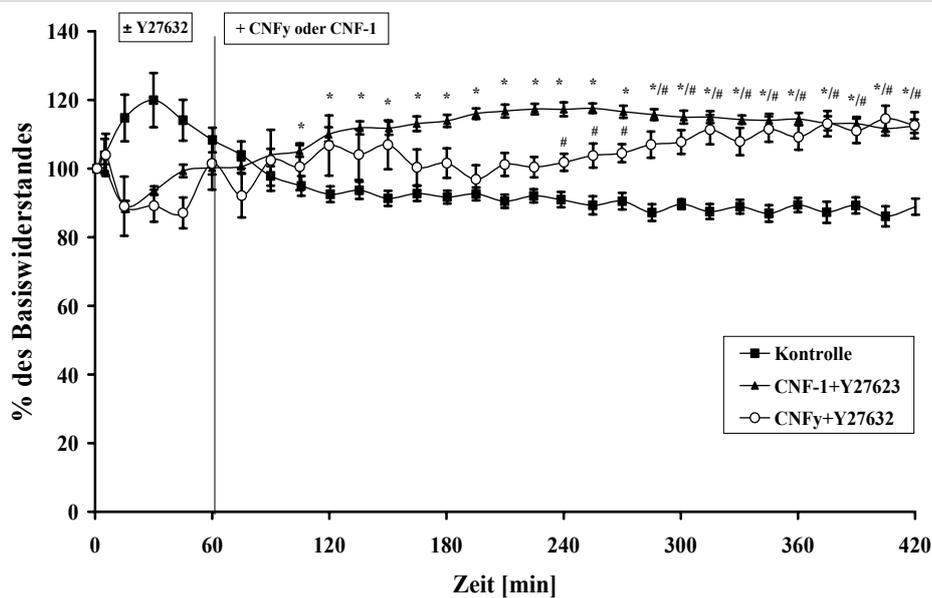


Abb. 14: Messung der Barriereintegrität durch Bestimmung des TER in vitro. Die Vorbehandlung von HDMECs mit Y27632 (1 h) ergab keine zur Kontrolle signifikanten Änderungen. Aktivierung aller drei GTPasen durch Zugabe von CNF-1 zu Y27632 vorbehandelten HDMEC resultierte in zur Kontrolle signifikant erhöhten Widerständen 45 min nach CNF-1-Zugabe ($110 \pm 2\%$ der Kontrolle). Die Zugabe von CNFy (Rho A-Aktivierung) zu Y27632 vorinkubierten HDMEC ergab signifikant zur Kontrolle gesteigerte Widerstandswerte nach 240 min mit $111 \pm 3\%$ der Kontrolle. [(*) Signifikanz gegen CNF-1+Y27632 zu Kontrolle, (#) Signifikanz CNFy+Y278632 zur Kontrolle mit $p < 0.05$]

Im Folgenden wurde durch Kombination von Y27632-Vorbehandlung (1 h) nach CNF-1- (3 h) oder CNFy-Zugabe (6 h) mit Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht, welche morphologischen Veränderungen der Adhärenskontakte und des Aktinzytoskeletts nach Aktivierung der Rho-GTPasen durch die Rho-Kinase vermittelt werden. In allen Zelllinien führte Y27632 in Kombination mit CNFy oder CNF-1 zu einer Reduktion der Stressfasern im Vergleich zu Experimenten mit CNFy oder CNF-1 alleine (Abb. 15 vgl. mit Abb. 9). Des Weiteren konnte die in MesEnd, HDMEC und PSEC durch CNFy vermittelte Lückenbildung verhindert werden, ebenso die Lückenbildung in PSEC nach CNF-1-Behandlung.

4.1.5. Einfluss der Rho-GTPasen auf die Regulation der VE-Cadherin-vermittelten Adhäsion

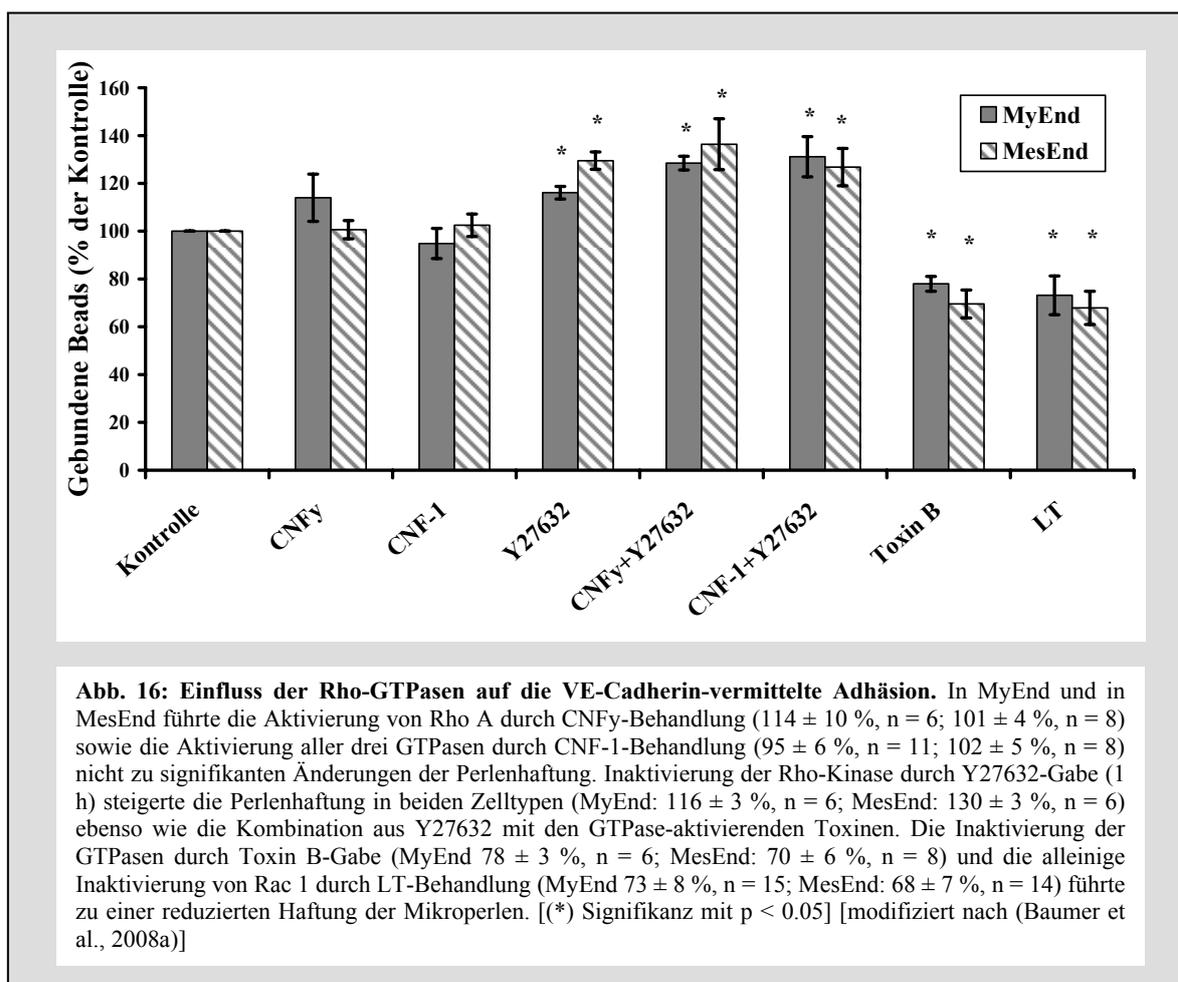
Schließlich untersuchten wir die Effekte der Rho-GTPasen auf die Funktion Adhärensjunktionen, indem wir Veränderungen der VE-Cadherin-vermittelten Adhäsion mit der Laserpinzetten-Technik gemessen haben (Abb. 16). Hierbei wurden mit VE-Cadherin beschichtete Mikroperlen auf die Oberfläche von MyEnd- und MesEnd-Zellen gegeben. Wie schon früher gezeigt wurde, kommt es durch das Absetzen der VE-Cadherin beschichteten Perlen auf der Oberfläche von MyEnd-Zellen zur Bildung von artifiziellen Adhärensjunktionen zwischen Zelle und Perle mit einer Rekrutierung von VE-Cadherin, β -Catenin und F-Aktin an die Zell-Zell-Kontakte (Baumgartner et al., 2003). Die Anzahl der gebundenen Perlen, die anschließend nicht durch einen Laserstrahl verschoben werden konnten, galt als Maß für die VE-Cadherin-Haftung. In früheren Studien wurde herausgefunden, dass eingeschränkte Barrierefunktion *in vivo* und *in vitro* mit eingeschränkter VE-Cadherin-Haftung einhergeht (Waschke et al., 2004a; Waschke et al., 2004b; Waschke et al., 2004c). Da die hier verwendeten Perlen mit murinem VE-Cadherin beschichtet waren, konnten keine Messungen mit HDMECs und PSECs durchgeführt werden.

In MesEnd-Zellen konnte wie in früheren Ergebnissen in MyEnd-Zellen (Doktorarbeit Sabrina Burger) keine durch CNFy- (6 h) und CNF-1-Behandlung (3 h) hervorgerufene signifikante Änderung der Anzahl gebundener Perlen festgestellt werden ($101 \pm 4 \%$, $n = 8$, bzw. $102 \pm 5 \%$, $n = 8$), so dass weder die Aktivierung von Rho A durch CNFy-Gabe (6 h) noch die simultane Aktivierung aller drei GTPasen durch CNF-1-Behandlung (3 h) zu

einer Änderung der VE-Cadherin-vermittelten Haftung führten. Y27632-Behandlung alleine oder in Kombination mit CNF γ - oder CNF-1-Gabe führte zu einer auf 116-136 % der Kontrolle gesteigerten Haftung (n = 6 für MyEnd, n = 7 für MesEnd), was andeutete, dass die Rho-Kinase bereits unter Kontrollbedingungen einen negativen Effekt auf die VE-Cadherin-vermittelte Adhäsion in beiden Zelllinien besitzt.

Die Inhibition aller drei GTPasen durch Toxin B-Behandlung (3 h) reduzierte die Zahl der gebundenen Perlen in MesEnd-Zellen auf 70 ± 6 % (n = 8) und 78 ± 3 % (n = 6) in MyEnd-Zellen (Doktorarbeit Sabrina Burger). Die Inhibition von Rac 1 alleine durch LT-Gabe (3 h) war ähnlich effektiv wie Toxin B-Behandlung (MyEnd 73 ± 8 %, n = 14 Doktorarbeit Sabrina Burger; MesEnd 68 ± 7 %, n = 11).

Zusammenfassend kann man sagen, dass diese Daten einen kausalen Zusammenhang zwischen Rac 1-Inaktivierung, Lückenbildung und VE-Cadherin-Haftung andeuten und sich somit die Möglichkeit ergibt, dass der Verlust der VE-Cadherin-Haftung ursächlich für den durch Rac 1-Inhibition verursachten Barrierezusammenbruch sein könnte.



4.2. Die Rolle von Rac 1 in der durch cAMP vermittelten Stabilisierung der Endothelbarriere

4.2.1. Stabilisiert die Endothelbarriere durch cAMP

Im Folgenden sollte in HDMEC-Zellen untersucht werden, ob die bekannten protektiven Effekte von cAMP über die GTPase Rac 1 vermittelt werden. Zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentrationen wurde eine Kombination des Adenylatzyklase-Aktivators Forskolin (F; 5 μ M) und des Phosphodiesterase 4-Inhibitors Rolipram (R; 10 μ m) verwendet. Es ist bekannt, dass cAMP-Anstieg die Barriere sowohl über PKA-abhängige Mechanismen als auch über den Epac/Rap 1-Signalweg stärkt (Adamson et al., 1998; Adamson et al., 2008; Birukova et al., 2008; Cullere et al., 2005; Fukuhara et al., 2005; Kooistra et al., 2005). Durch Verwendung von O-Me-cAMP, das dosisabhängig selektiv den Epac/Rap 1-Signalweg aktiviert, konnte die Bedeutung PKA-unabhängiger Mechanismen charakterisiert werden. Zunächst wurde sichergestellt, dass die hier verwendete Dosis von 200 μ M O-Me-cAMP eine selektive Aktivierung des Epac/Rap 1-Signalwegs ermöglicht. Es ist bekannt, dass es nach cAMP-Steigerung über eine Aktivierung von PKA zu einer Phosphorylierung VASP an Serin¹⁵⁷ kommt und diese Phosphorylierung zu einem veränderten Laufverhalten in der SDS-PAGE führt (Halbrugge et al., 1990). In Western Blot-Analysen mit Detektion von VASP und P-VASP (p-S157-VASP) konnte festgestellt werden (Abb. 17), dass unter Kontrollbedingungen VASP als Einzelbande bei 46 kDa detektiert wurde, während kein Nachweis von P-S157-VASP möglich war. Nach F/R-Behandlung (1 h) kam es zu einer partiellen Verschiebung dieser Bande auf 50 kDa, was eine Phosphorylierung von VASP an Serin¹⁵⁷ (Halbrugge et al., 1990) andeutet. Dies konnte mit dem Nachweis von P-S157-VASP bestätigt werden. Im Gegensatz dazu konnte weder nach O-Me-cAMP-Gabe (1 h) noch nach CNF-1-Behandlung (3 h) eine derartige Phosphorylierung detektiert werden, so dass VASP unter diesen Bedingungen nicht PKA-abhängig phosphoryliert wurde.

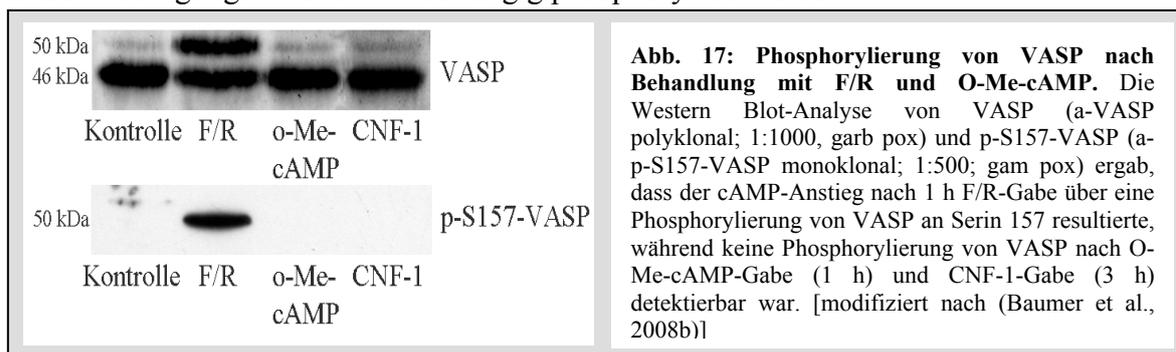
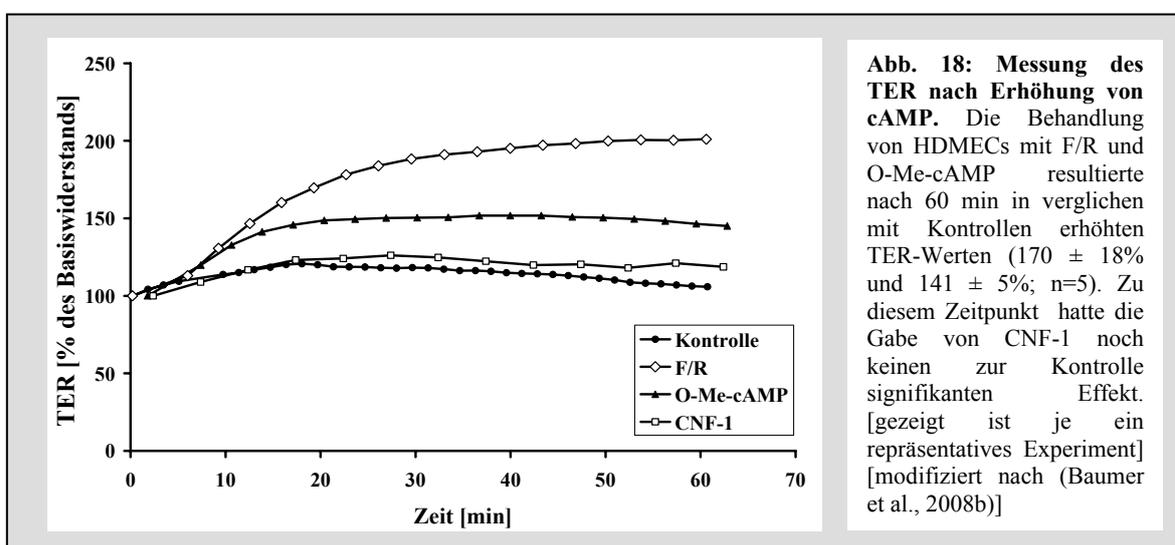


Abb. 17: Phosphorylierung von VASP nach Behandlung mit F/R und O-Me-cAMP. Die Western Blot-Analyse von VASP (a-VASP polyklonal; 1:1000, garb pox) und p-S157-VASP (a-p-S157-VASP monoklonal; 1:500; gam pox) ergab, dass der cAMP-Anstieg nach 1 h F/R-Gabe über eine Phosphorylierung von VASP an Serin 157 resultierte, während keine Phosphorylierung von VASP nach O-Me-cAMP-Gabe (1 h) und CNF-1-Gabe (3 h) detektierbar war. [modifiziert nach (Baumer et al., 2008b)]

In ersten Untersuchungen wurde ermittelt, ob es durch F/R und O-Me-cAMP (1 h) unter diesen Bedingungen auch in HDMECs zu einer gesteigerten Barrierefunktion kommt. Messungen des TER mittels ECIS 1600 ergaben, dass der mittlere Basiswiderstand unter Kontrollbedingungen bei $27 \pm 1 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n = 30$) lag. Beide cAMP-steigernde Mediatoren führten innerhalb der ersten 5 min zu einem Anstieg des TER und erreichten nach 60 min einen Maximalwert, während CNF-1 als Positivkontrolle einer Rac 1-Aktivierung innerhalb der ersten 60 min keinen signifikanten Effekt hatte (Abb. 18). Zu diesem Zeitpunkt war durch F/R- und O-Me-cAMP-Gabe der TER auf $170 \pm 18\%$ und $141 \pm 5\%$ des Kontrollniveaus angestiegen. Nach 120 min, die notwendig waren, um durch CNF-1-Gabe in HDMECs Rac 1, Cdc42 und Rho A zu aktivieren, führte auch CNF-1-Behandlung zu gesteigerten TER-Werten ($121 \pm 4\%$ der Kontrolle, $n = 5$, nicht gezeigt).

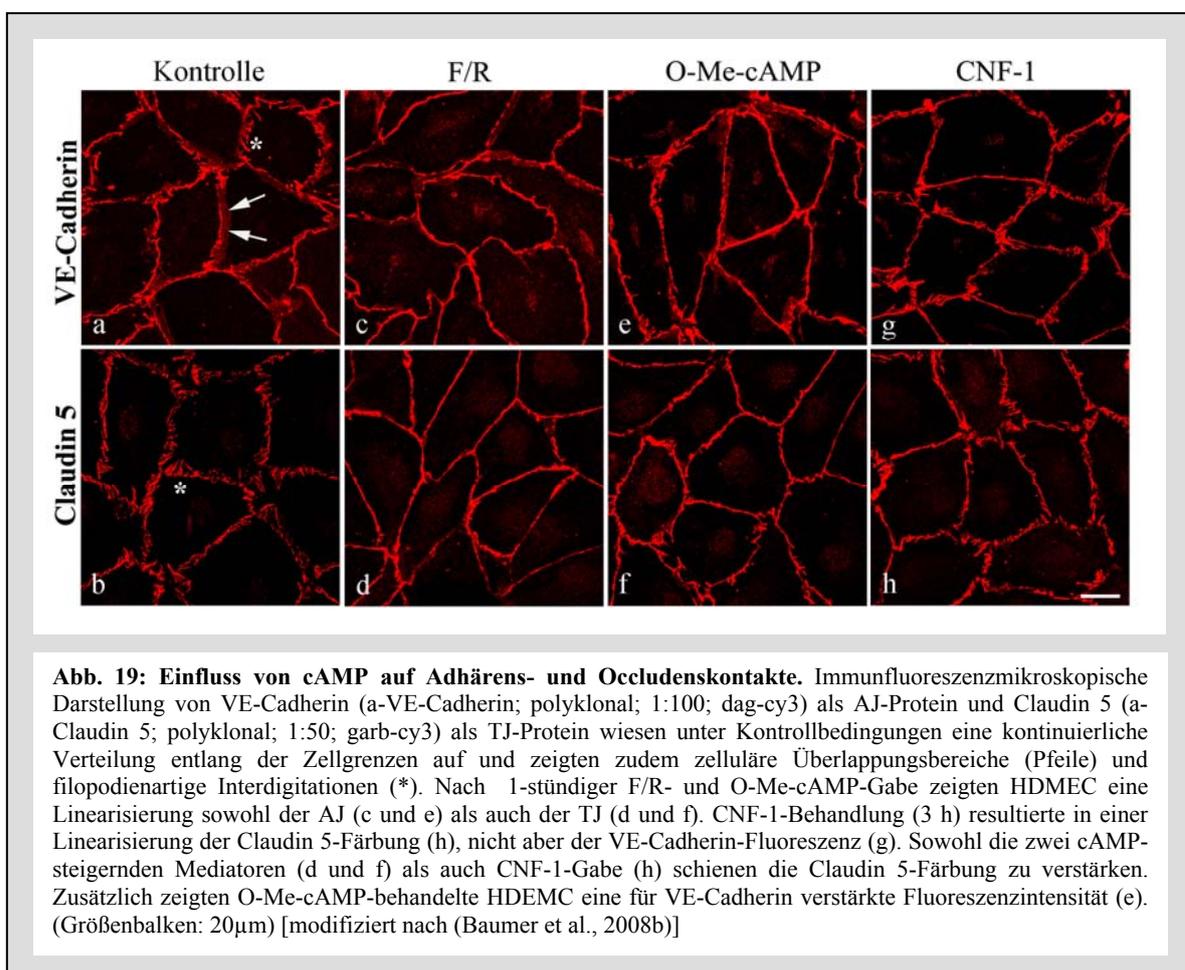


4.2.2. Einfluss von cAMP auf Adhärens- und Occludenskontakte

Um herauszufinden, ob die barriestabilisierenden Effekte nach F/R- und O-Me-cAMP-Gabe (1 h) möglicherweise durch eine Reorganisation von endothelialen Junctionen vermittelt werden, wie in anderen Studien gezeigt wurde (Cullere et al., 2005; Fukuhara et al., 2005; Kooistra et al., 2005), wurden Adhärens- und Occludensjunctionen mit Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht.

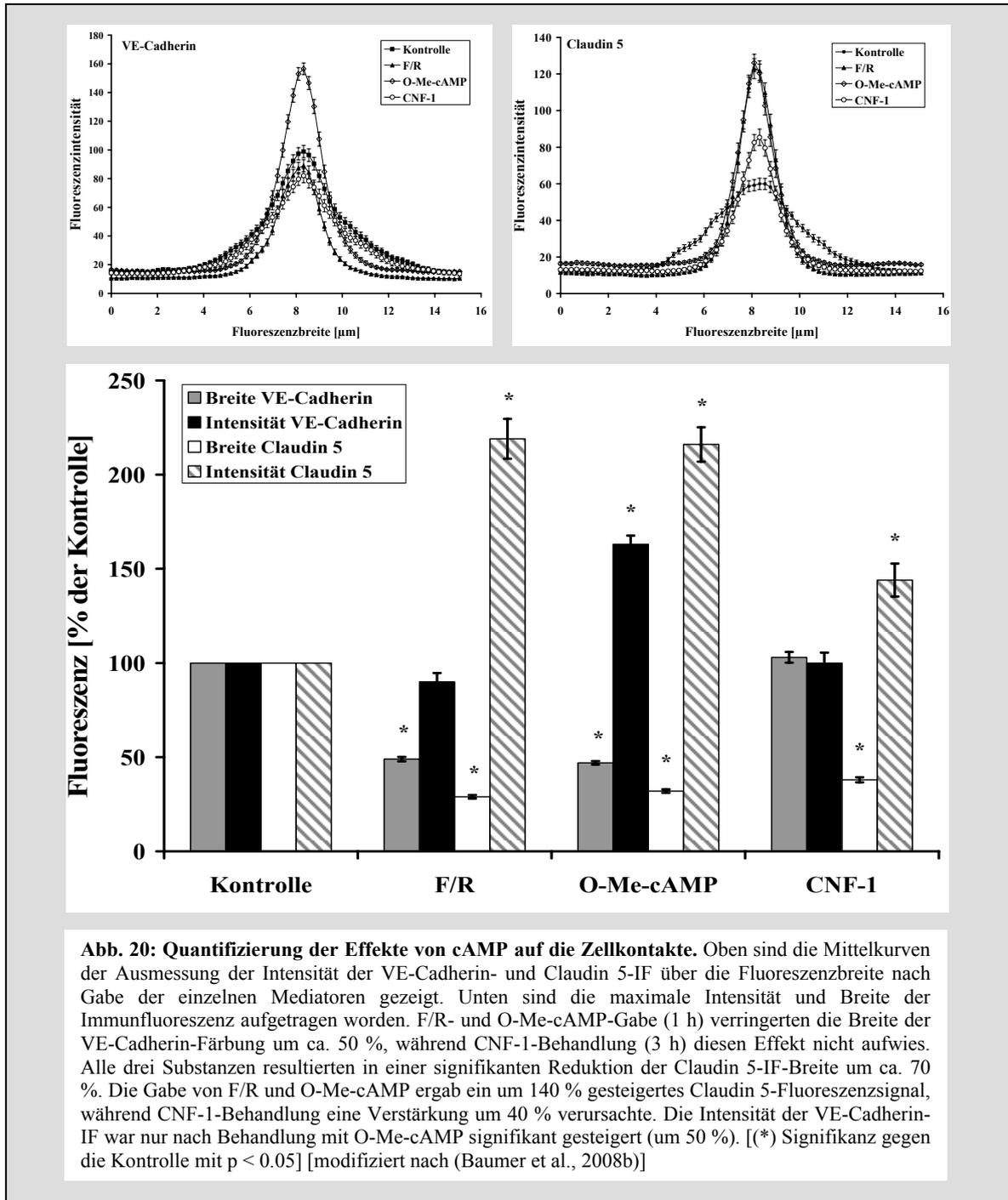
In Kontrollen zeigte sich eine kontinuierliche VE-Cadherin- und Claudin 5-Verteilung entlang der Zellgrenzen, welche an manchen Stellen filopodienartige Interdigitationen (*) und teilweise zelluläre Überlappungsbereiche aufwiesen (Pfeile in Abb. 19: a und b). Die

Behandlung der Zellen mit F/R (1 h) ergab eine Linearisierung der VE-Cadherin- und Claudin 5-Färbung (Abb. 19 c und d), wobei die Claudin 5-Färbung zudem verstärkt erschien (Abb. 19 d). Ähnliche Effekte konnten bei O-Me-cAMP-behandelten Zellen (1 h) festgestellt werden (Abb. 19 e und f). Außerdem schien in diesen Zellen die Immunfluoreszenz für VE-Cadherin verstärkt zu sein (Abb. 19 e). Die Behandlung der Zellen mit CNF-1 (2 h) als Positivkontrolle für eine Rac 1-Aktivierung zeigte eine partielle Linearisierung der VE-Cadherin- und der Claudin 5-Färbung, zudem erschien analog zu den cAMP-steigernden Mediatoren die Claudin 5-Immunfluoreszenz verstärkt zu sein (Abb. 19 g und h).



Um diese Effekte zu quantifizieren, wurden die Breite und die Intensität der VE-Cadherin- und der Claudin 5-Färbungen gemessen (Abb. 20). Sowohl F/R-Gabe als auch O-Me-cAMP-Behandlung (jeweils 1 h) reduzierten signifikant die Breite der VE-Cadherin-Färbung auf ca. 50 % des Kontrollniveaus ($49 \pm 2\%$ und $47 \pm 1\%$), wohingegen durch CNF-1-Gabe (2 h) keine Veränderung auftrat. O-Me-cAMP-Gabe steigerte zudem die Intensität der VE-Cadherin-Färbung auf $176 \pm 42\%$, während CNF-1- und F/R-

Behandlung hier keinen Einfluss hatten. Parallel zeigte sich durch F/R-, O-Me-cAMP- und CNF-1-Behandlung eine Reduktion der Breite des Immunfluoreszenzsignals auf $29 \pm 1\%$, $32 \pm 1\%$ und $38 \pm 1\%$ im Sinne einer Linearisierung der Occludensjunctionen.

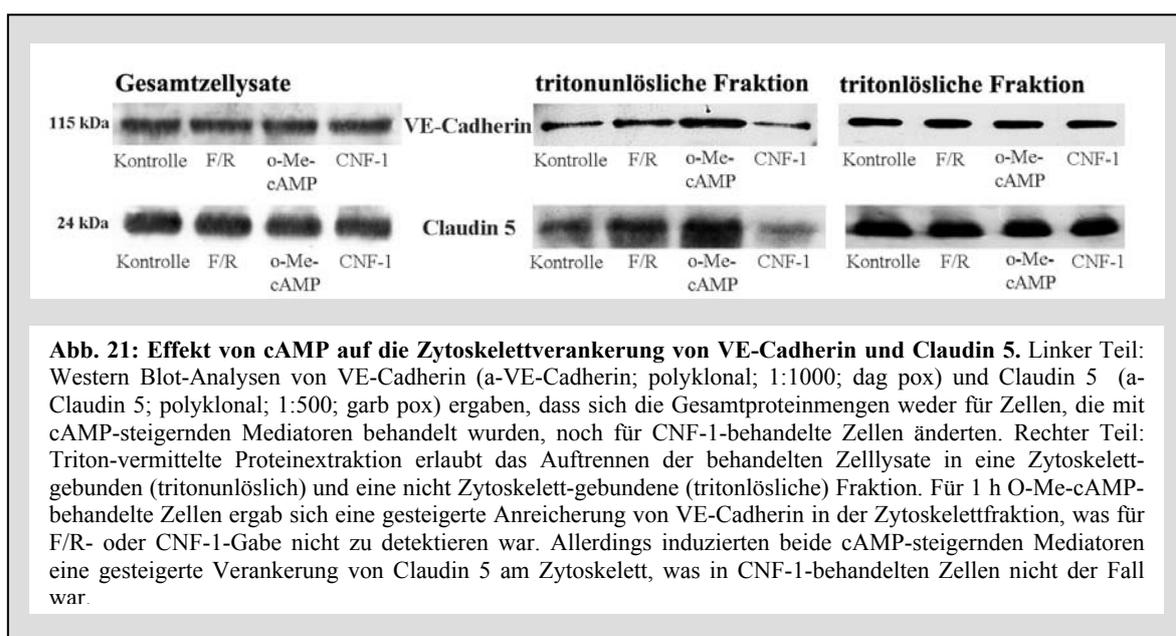


Zusätzlich konnte ermittelt werden, dass F/R- und O-Me-cAMP-Gaben (1 h) die Intensität der Claudin 5-Fluoreszenz signifikant zur Kontrolle steigerten ($219 \pm 11\%$ und $216 \pm 10\%$). Die Behandlung der HDMEC mit CNF-1 (2 h) resultierte in einer zur Kontrolle signifikant erhöhten Claudin 5-Fluoreszenzintensität, die allerdings deutlich unter den

Befunden der cAMP-steigernden Mediatoren lag ($144 \pm 9 \%$). Für die Intensität der VE-Cadherin-Immunfluoreszenz konnte lediglich für O-Me-cAMP-behandelte Zellen eine Zunahme um ca. 60 % detektiert werden, während die F/R- und die CNF-1-behandelten Zellen keinen zur Kontrolle signifikanten Unterschied ergaben ($90 \pm 5 \%$ und $100 \pm 5 \%$).

In Western Blot-Analysen zeigte sich, dass sich die Gesamtmenge an VE-Cadherin und Claudin 5 unter den verschiedenen Bedingungen nicht änderte (Abb. 21 linker Teil), so dass derartige beobachteten Effekte nicht mit Änderungen der totalen Proteinmenge erklärt werden können. Um zu untersuchen, ob cAMP die Zytoskelettverankerung dieser Proteine reguliert, wurde eine Triton-Proteinextraktionsassay vorgenommen (Abb. 21 rechter Teil). Dadurch kommt es zu einer Zelllysatauftrennung in eine tritonlösliche Fraktion, die nicht Zytoskelett-gebundene Bestandteile enthält, und eine tritonunlösliche Fraktion, die das Zytoskelett und daran gebundenen Proteine beinhaltet.

Hier zeigte sich, dass nach Behandlung mit O-Me-cAMP (1 h) selektiv der Gehalt von VE-Cadherin in der Zytoskelett-gebundenen Fraktion zunahm, während dies nach F/R-Gabe (1 h) nicht der Fall war. Im Unterschied dazu wurde Claudin 5 in dieser Fraktion sowohl nach Behandlung mit O-Me-cAMP als auch nach Behandlung mit F/R angereichert. Es war somit vermehrt Claudin 5 nach Behandlung mit beiden cAMP-steigernden Mediatoren an das Zytoskelett gebunden, wohingegen VE-Cadherin nur nach O-Me-cAMP-Gabe vermehrt zytoskelettal gebunden vorlag.



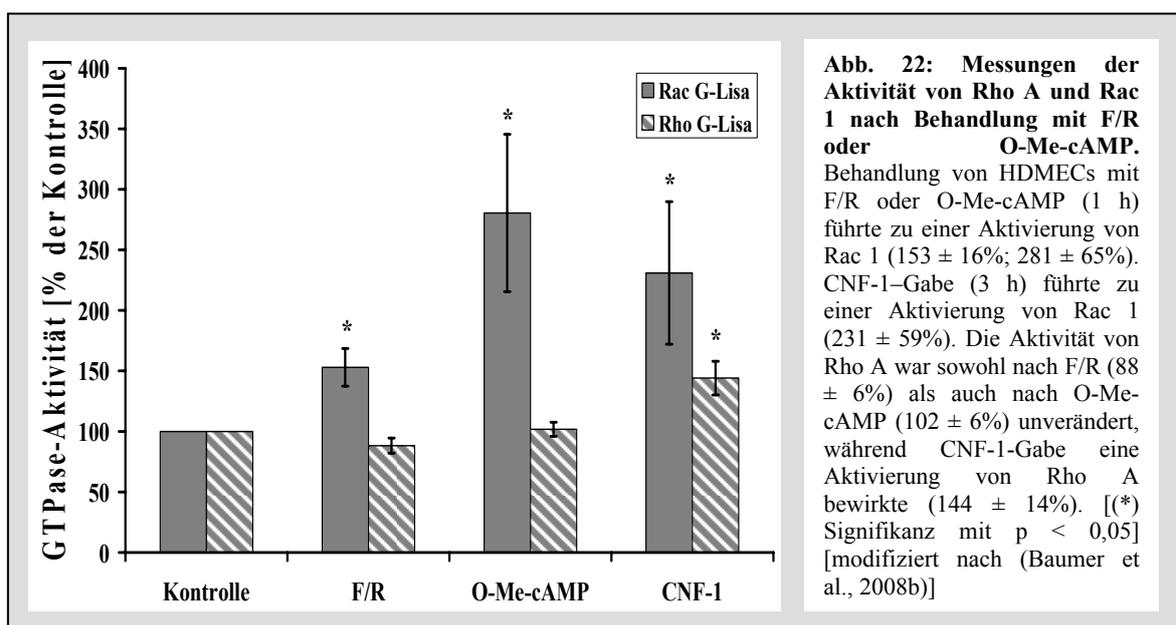
Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Stabilisierung der Endothelbarriere durch cAMP mit einer Reorganisation der Adhärens- und Occludensjunctionen einhergeht.

4.2.3. Einfluss von cAMP auf die Aktivität von Rac 1 und Rho A

Es wurde mit Rho A- und Rac 1-GLISA untersucht, ob cAMP die Aktivität dieser Rho-GTPasen reguliert (Abb. 22). Die Gabe von F/R (1 h) aktivierte Rac 1 auf $153 \pm 16\%$ des Kontrollniveaus und hatte keinen signifikanten Effekt auf die Aktivität von Rho A ($88 \pm 6\%$). Ähnlich dazu wiesen die mit O-Me-cAMP (1 h) behandelten HDMEC eine gesteigerte Rac 1-Aktivität von $281 \pm 65\%$ des Kontrollniveaus und eine unveränderte Rho A-Aktivität auf ($102 \pm 6\%$).

Behandlung von HDMEC mit CNF-1 (2 h) führte zu einer Aktivierung von Rac 1 auf $231 \pm 59\%$ und einer Aktivierung von Rho A auf $144 \pm 14\%$.

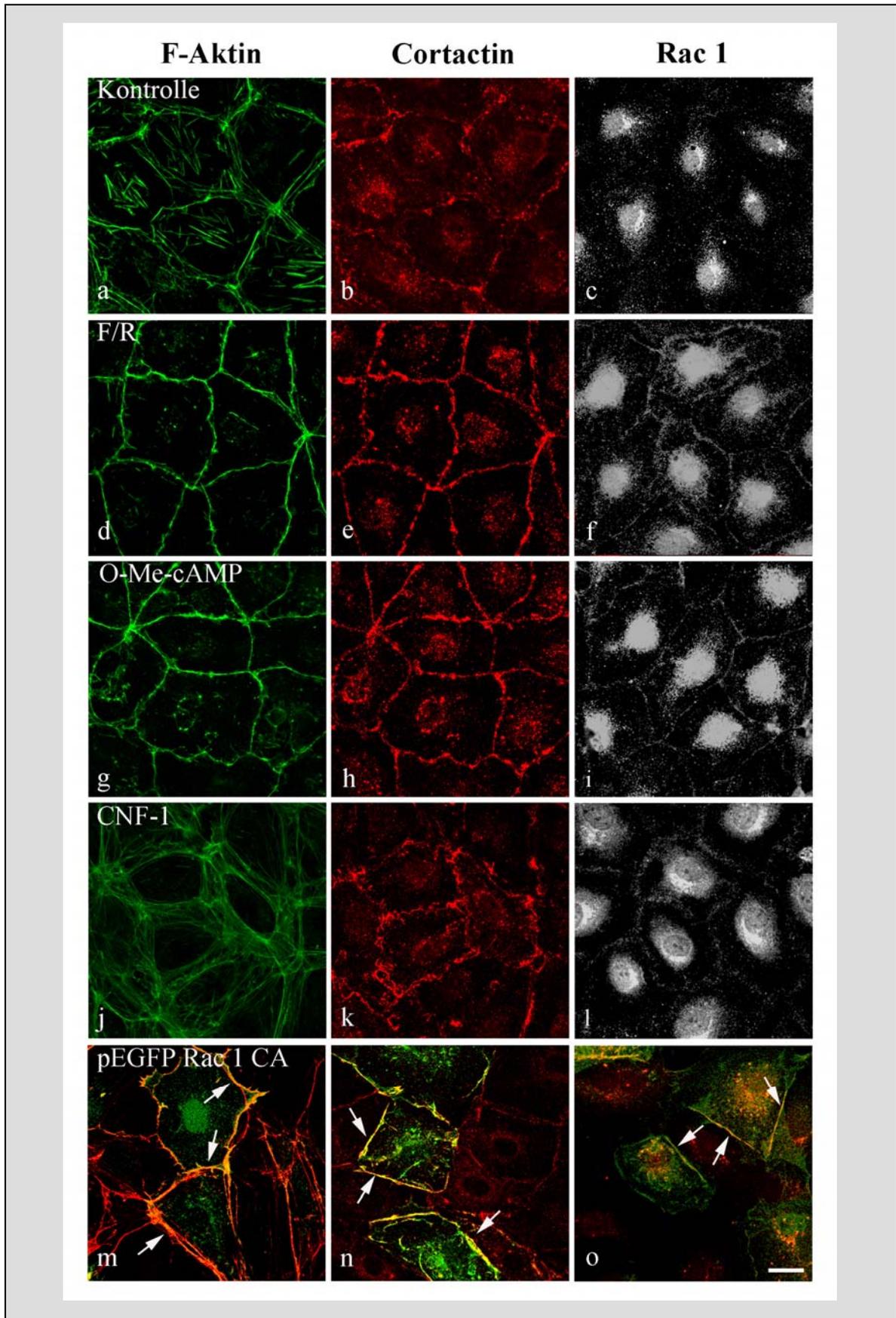
Diese Daten deuten an, dass ein barriestabilisierender Effekt durch cAMP auch durch eine Rac 1-Aktivierung vermittelt werden könnte. Da gesteigerte cAMP-Spiegel keinen Einfluss auf die Rho A-Aktivität ausübten, ist es unwahrscheinlich, dass cAMP die Barriereigenschaften direkt über Rho A reguliert.



Um herauszufinden, ob die durch cAMP-vermittelte Rac 1-Aktivierung ausreichend ist, um typische Rac 1-abhängige zytoskelettale Veränderungen und Reorganisationen assoziierter Proteine hervorzurufen, wurden die Effekte von F/R- und O-Me-cAMP-Behandlung (1 h) auf die Lokalisation des Rac 1-Effektors Cortactin und die Morphologie des Zytoskeletts untersucht (Abb. 23).

Es wurde beobachtet, dass in den Kontrollen wenige Stressfasern vorhanden waren, Cortactin sowohl im Zytoplasma als auch partiell an den Zellmembranen lokalisiert war und Rac 1 vor allem perinuklear zu finden war (Abb. 23 a, b, c). F/R-Gabe (Abb. 23 d, e) und O-Me-cAMP-Gabe (Abb. 23 g, h) führten zu einer Reduzierung von Stressfasern, zur Bildung eines verstärkten corticalen Aktinbandes und zur Rekrutierung von Cortactin an die Junctionen (Abb. 23 e, h). Wurde CNF-1 (2 h) genutzt, um Rac 1 direkt zu aktivieren, war die Lokalisation von Cortactin entlang der Zellmembranen ungleichmäßig (Abb. 23 k) und es kam zu einer gesteigerten Stressfaserbildung (Abb. 23 j), welche durch die simultane Aktivierung von Rho A zu erklären ist. F/R-, O-Me-cAMP- und CNF-1-Gabe verursachten eine partielle Rac 1-Translokation zu den Zellmembranen (Abb. 23 f, i, l). Um die Effekte einer Rac 1-Aktivierung noch genauer zu untersuchen, wurden HDMECs mit konstitutiv aktivem Rac 1 (pEGFP-Rac 1-CA) transfiziert. Transfizierte Zellen (grün leuchtend) zeigten eine deutliche Lokalisation von pEGFP-Rac 1-CA entlang der Junctionen (Pfeile in Abb. 23 m-o) und einen verstärkten corticalen Aktinring (Pfeile in Abb. 23 m), weniger Stressfasern und eine gesteigerte junctionale Färbung von Cortactin (Pfeile in Abb. 23 n) verglichen mit daneben liegenden untransfizierten Zellen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die durch cAMP hervorgerufenen zytoskelettalen Veränderungen wahrscheinlich durch eine Rac 1-Aktivierung vermittelt werden.

Abb. 23: Vergleich der Effekte von cAMP und Rac 1-Aktivierung auf das Aktinzytoskelett. Färbungen von F-Aktin (Alexa-Phalloidin 488 1:60 [grün]; TRITC-Phalloidin 1:60 [rot]), von Cortactin (a-Cortactin; monoklonal; 1:100; Alexa 568 gekoppelt) und Rac 1 (a-Rac 1; monoklonal; 1:100; gancycy3) lassen cAMP- und CNF-1-vermittelte Veränderungen des Zytoskeletts und der Lokalisation dieser Proteine erkennen. Die Kontrollen wiesen wenige Stressfasern (a), geringe Cortactin-Färbung (b) und keine membranständige Färbung von Rac 1 (c) auf. Durch Behandlung mit F/R oder O-Me-cAMP für 1 h kommt es zur Ausbildung eines corticalen Aktinrings und zu einer Verringerung der Stressfasern (d, g). Ebenso wird aktives Rac 1 (f, i) und dessen nachgeschalteter Effektor Cortactin (e, h) an die Membran verlagert. Die Aktivierung von Rac 1 durch CNF-1-Behandlung (3 h) führt zu gesteigertem corticalen Aktin und gesteigerter Stressfaserbildung (j). Die corticale Verlagerung von Rac 1 und Cortactin ist ebenso nachweisbar (k, l). pEGFP-Rac 1-CA transfizierte HDMEC (grün) zeigen die Bildung eines corticalen Aktinrings (rot in m) und eine membranständige Lokalisation von aktivem Rac 1 (Pfeile in m-o) sowie von Cortactin (Pfeile in n). [Größenbalken: 20 µm] [modifiziert nach (Baumer et al., 2008b)]

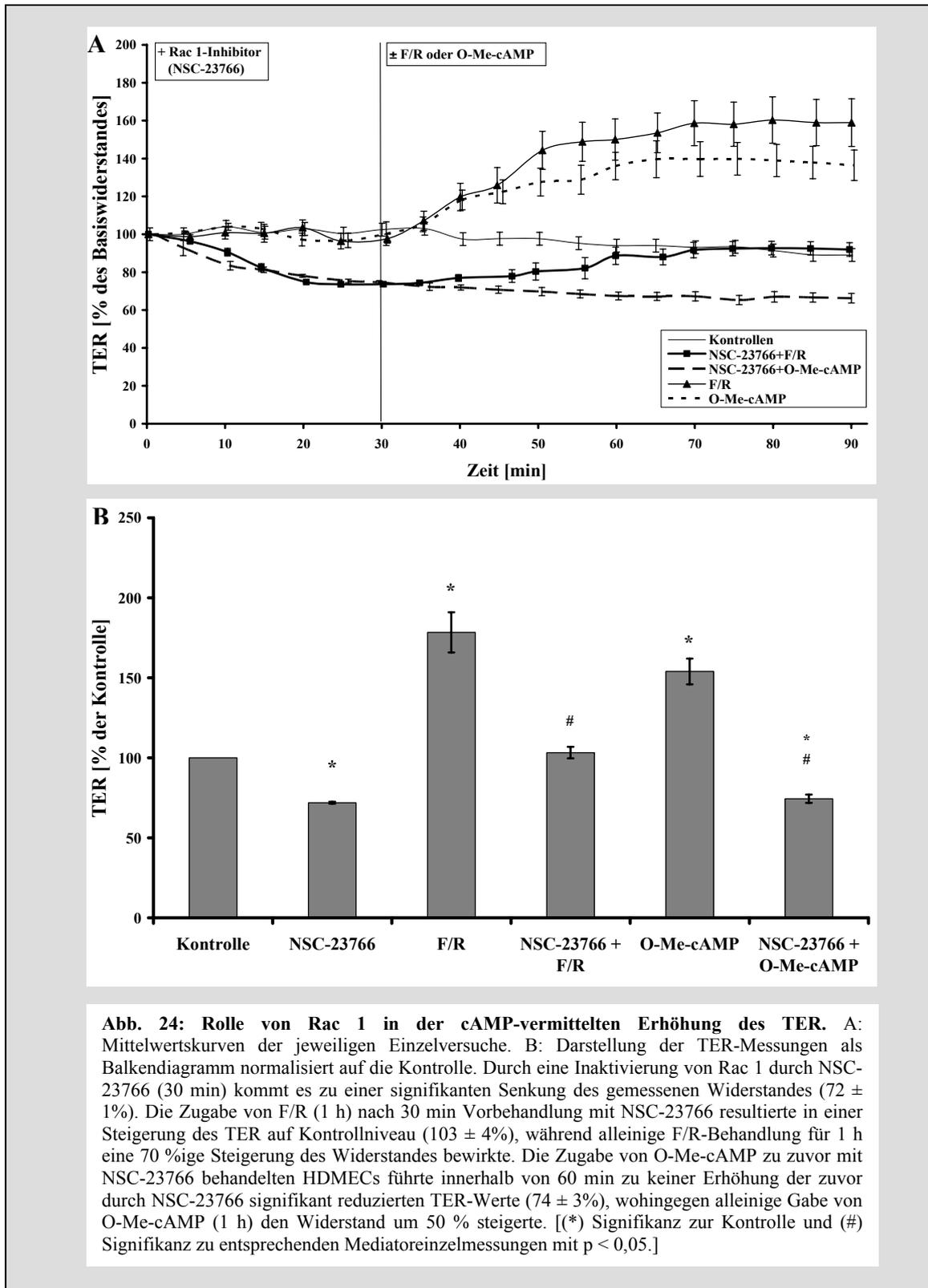


4.2.4. Rolle von Rac 1 in der cAMP-vermittelten Stabilisierung der Endothelbarriere

Der Rac 1-Inhibitor NSC-23766 hemmt die GDP/GTP-Austausch-Aktivität durch die Hemmung der Interaktion von Rac 1 mit den Rac 1-spezifischen GEFs Trio und Tiam 1 (Gao et al., 2004). Da dieser Mediator keine Effekte auf die Rho A- und Cdc42-Aktivität aufweist, können spezifische Effekte einer Rac 1-Inhibition und deren Rolle in der cAMP-vermittelten Endothelbarrierestabilisierung untersucht werden.

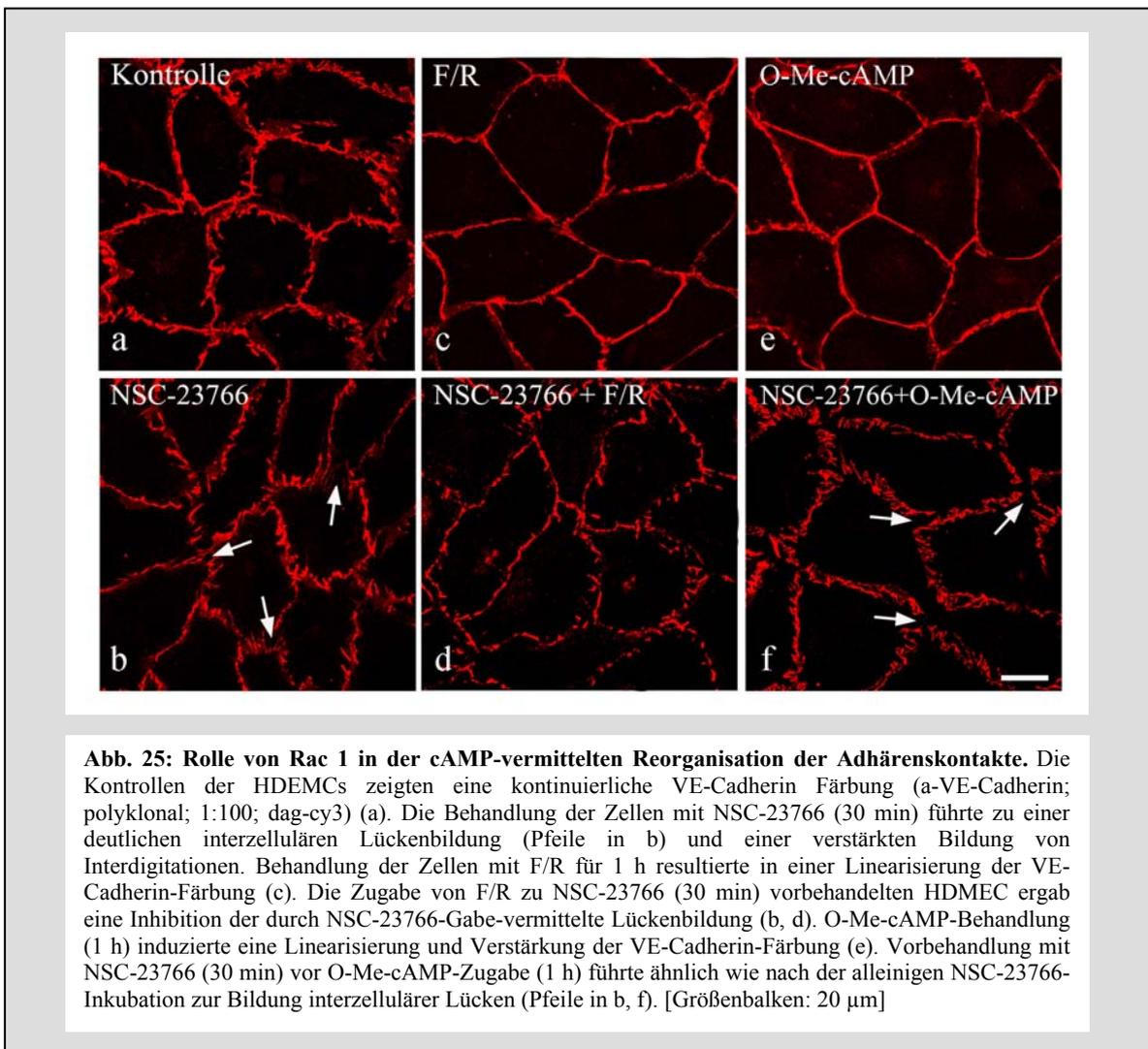
Zunächst wurde durch TER-Messungen (Abb. 24) untersucht, ob die basale Barrierefunktion durch den Einsatz des Rac 1-Inhibitors NSC-23766 (30 min) vermindert wird und ob unter diesen Bedingungen F/R- und O-Me-cAMP-Zugabe (1 h) weiterhin barriereprotektive Effekte vermittelt. 30 min nach Zugabe des Rac 1-Inhibitors kam es zu einer signifikanten Schwächung der Endothelbarriere mit einem Absinken des TER auf $72 \pm 1\%$ ($n=5$) des Ausgangswertes. Nach Zugabe von F/R zur Steigerung der cAMP-Spiegel kam es zu einer Steigerung des TER auf das Kontrollniveau ($103 \pm 4\%$ der Kontrolle; $n=5$). Eine Zugabe von O-Me-cAMP nach Behandlung mit dem Rac 1-Inhibitor resultierte in weiterhin signifikant erniedrigten TER-Werten ($74 \pm 3\%$ der Kontrolle; $n=5$). Im Gegensatz dazu zeigten Versuche mit F/R oder O-Me-cAMP in Abwesenheit des Rac 1-Inhibitors signifikant erhöhte TER-Werte (F/R: $178 \pm 12\%$ der Kontrolle, $n=7$; O-Me-cAMP: $154 \pm 8\%$ der Kontrolle, $n=7$).

Zusammenfassend deuten diese Daten an, dass eine Inaktivierung von Rac 1 zu einer geschwächten Endothelbarriere führt. cAMP scheint seine barriereprotektiven Effekte zum Teil über Rac 1-Aktivierung zu vermitteln.



Im Folgenden wurde untersucht, ob Veränderungen des TER mit Veränderungen in der VE-Cadherin-Verteilung einhergehen. Abbildung 25 zeigt in der Kontrolle eine gleichmäßige Verteilung der VE-Cadherin-Färbung entlang der Zellgrenzen (Abb. 25 a).

Durch Inkubation der HDMECs mit dem Rac 1-Inhibitor NSC-23766 (30 min) kam es zu einer deutlich sichtbaren Fragmentierung der VE-Cadherin-Färbung und zu einer interzellulären Lückenbildung (Abb. 25 b). F/R und O-Me-cAMP-Behandlung (1 h) bewirkten wie oben beschrieben eine Linearisierung der VE-Cadherin-Färbung (c und e). Eine Kombination mit F/R-Gabe (d) konnte im Gegensatz zu O-Me-cAMP-Gabe (f) die durch NSC-23766-Vorbehandlung verursachte Lückenbildung verhindern. Allerdings ist die stricte Linearisierung der Adhärensjunktionen, die bei alleiniger F/R-Behandlung auftritt, nicht mehr so deutlich ausgeprägt.



4.3. Die Rolle von cAMP und Rho-GTPasen bei dem Thrombin-vermittelten Zusammenbruch der Endothelbarriere

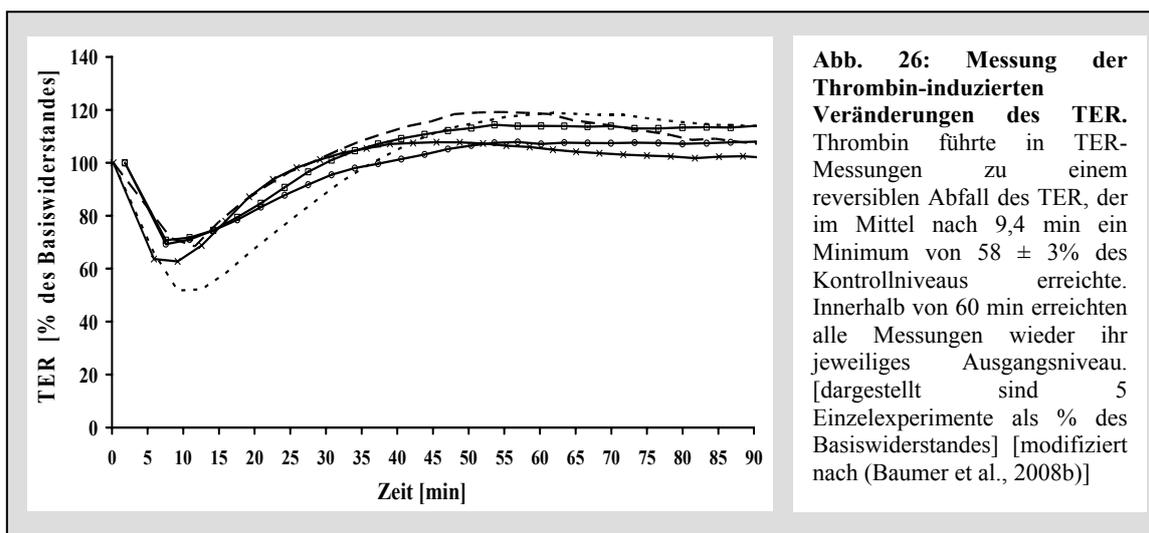
Da Rac 1 und cAMP unter Ruhebedingungen eine wesentliche Rolle in der Aufrechterhaltung der Endothelbarriere spielen und auch schon in vielen früheren Studien diskutiert wurde, dass Rho-GTPasen auch bei dem durch Entzündungsmediatoren verursachten Barrierezusammenbruch beteiligt sind (Mehta and Malik, 2006; Vandenbroucke et al., 2008; Wojciak-Stothard and Ridley, 2002), wurde im letzten Teil dieser Arbeit die Beteiligung von Rac 1 und cAMP bei der Entzündungsreaktion untersucht

Es wurden verschiedenste Entzündungsmediatoren wie PAF (platelet activating factor), Bradykinin, Histamin und Thrombin in allen uns zur Verfügung stehenden Endothelien mit und ohne Serumentzug getestet. Es konnten allerdings nur für Thrombin in PSECs und in HDMECs sicher reproduzierbare Befunde für die Wirksamkeit gefunden werden, so dass alle weiteren Studien mit Thrombin in HDMECs durchgeführt wurden. Es sollte in diesem Zusammenhang besonders untersucht werden, ob tatsächlich einer Aktivierung von Rho A der größte Stellenwert für den Thrombin-induzierten Barrierezusammenbruch zukommt.

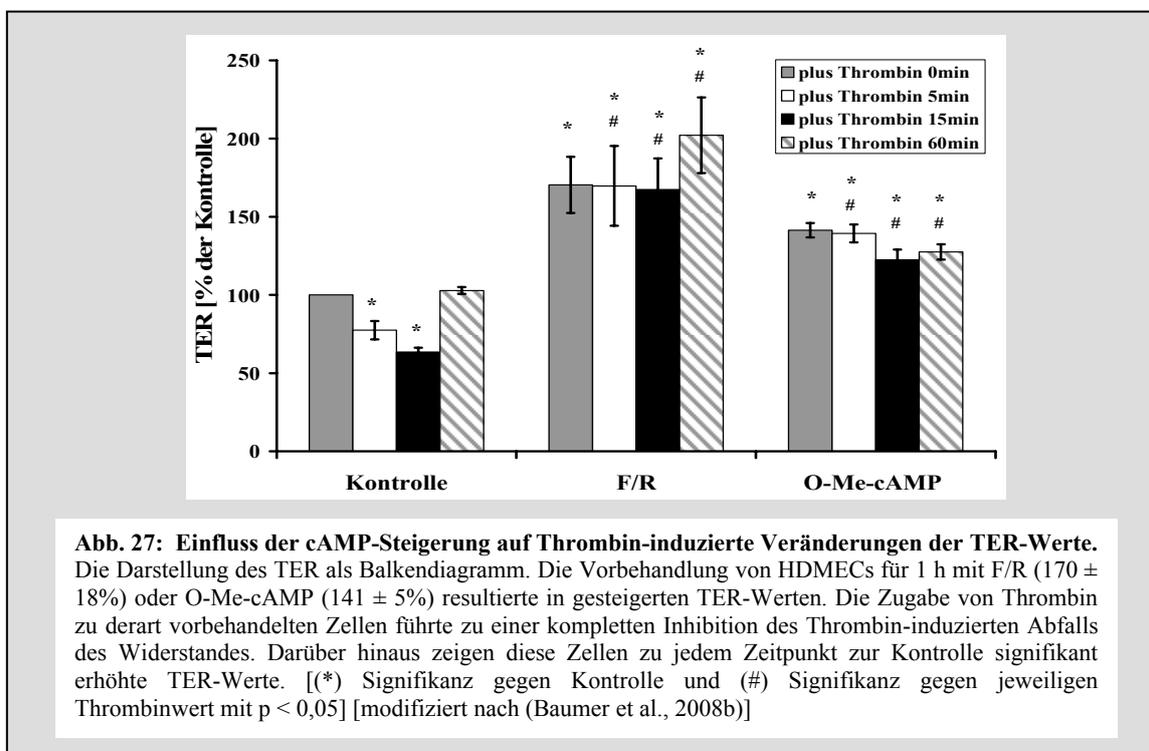
4.3.1. Effekte von cAMP auf den Thrombin-induzierten Barrierezusammenbruch

Um herauszufinden, welche Rolle die durch gesteigertes cAMP hervorgerufene Rac 1-Aktivierung unter Bedingungen einer gestörten Barrierefunktion durch einen physiologischen Mediator hat, wurden die Effekte von Thrombin mit oder ohne Zugabe von F/R und O-Me-cAMP (1 h) untersucht.

Zunächst wurde der Einfluss von Thrombin auf die Barriere eines Zellrasens von HDMEC mit TER-Messungen untersucht. Vor Zugabe von Thrombin lag der mittlere TER bei $35 \pm 2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (n=15). Behandlung mit Thrombin führte zu einem reversiblen Abfall des TER (Abb. 26). Diese Abbildung zeigt die Graphen fünf verschiedener Einzelexperimente. Innerhalb von 5 min lag eine signifikante Reduktion des TER vor, der im Mittel 9,4 min nach Zugabe von Thrombin ein Minimum von $58 \pm 3\%$ des Kontrollniveaus erreichte (n=5). Innerhalb von 60 min erreichte der TER wieder das Ausgangsniveau.

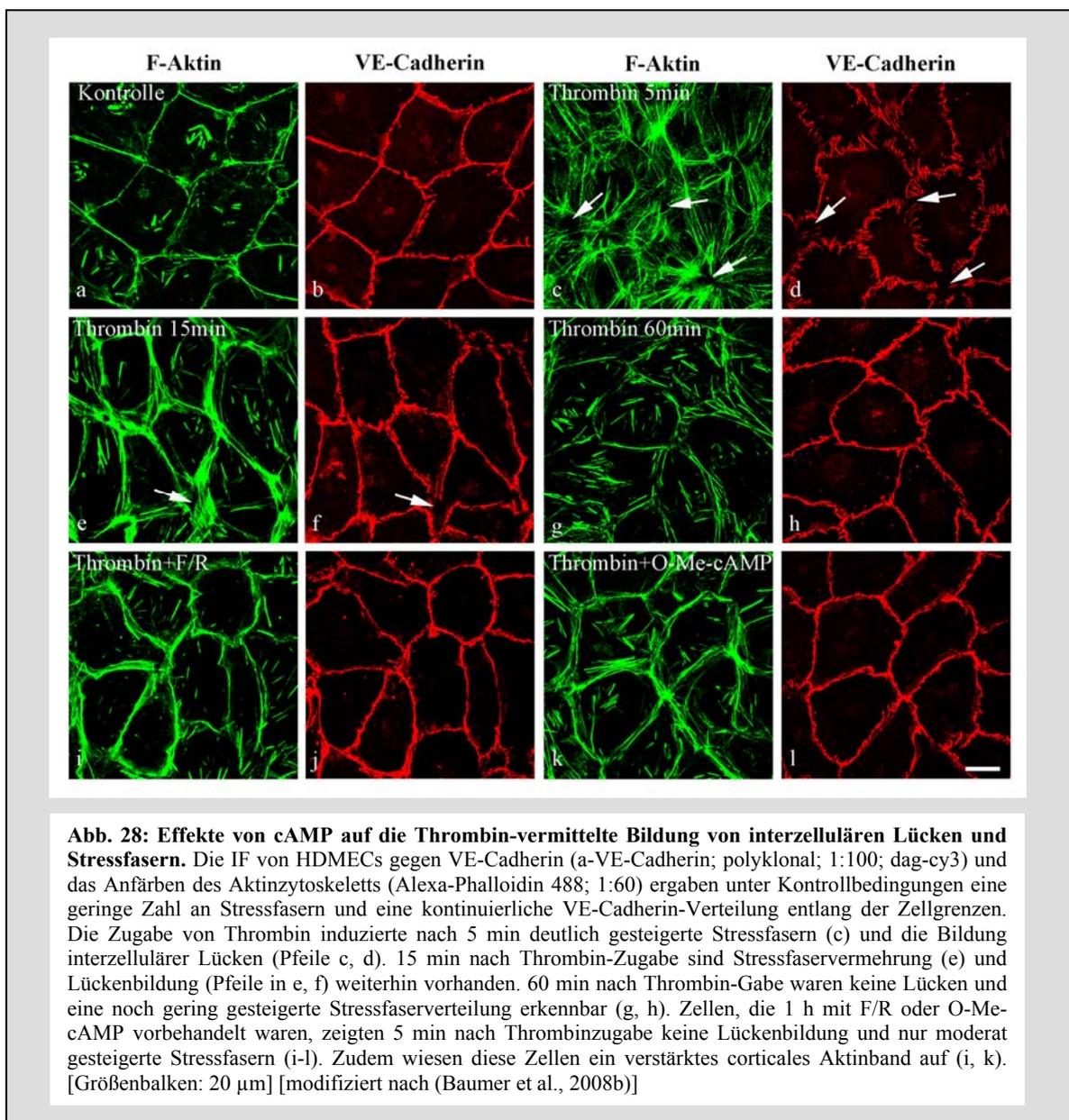


Es ist bekannt, dass gesteigerte cAMP-Konzentrationen Thrombin-induzierte Endothelbarriereschwächung blockieren können (Garcia et al., 1995; Patterson et al., 2000), deshalb wurden Kombinationsexperimente mit F/R- oder O-Me-cAMP-Vorbehandlung (1 h) durchgeführt (Abb. 27). Die Vorbehandlung der Endothelzellen für 1 h mit F/R oder mit O-Me-cAMP ergab, dass zu keinem Zeitpunkt ein signifikantes Absinken des TER unter das Ausgangsniveau nach Thrombin-Zugabe stattfand und somit der Thrombin-vermittelte Abfall des TER komplett inhibiert war.



Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von F-Aktin und VE-Cadherin in HDMECs zeigten, dass die Effekte von Thrombin auf die Endothelbarrierefunktion mit der

Bildung interzellulärer Lücken einhergingen (Abb. 28). Verglichen mit der Kontrolle (Abb. 28 a und b) waren 5 und 15 min nach Thrombinzugabe vermehrte Stressfaserbildung, Fragmentierungen in der VE-Cadherin-Färbung und interzelluläre Lücken (Pfeile) nachweisbar (Abb. 28 c-f). Nach 60 min Thrombin-Behandlung waren keine Lücken mehr zu finden während die Stressfasern verglichen mit den Kontrollen noch immer leicht vermehrt waren (Abb. 28 g und h). Die Vorbehandlung der HDMECs mit F/R oder O-Me-cAMP (1 h) inhibierte die durch Thrombinzugabe-induzierte Lückenbildung komplett (Abb. 28 i-l). Des Weiteren wiesen derartig vorinkubierte Zellen trotz Thrombinzugabe eine verminderte Stressfaserverteilung und die Bildung eines corticalen Aktinrings auf (Abb. 28 i und k).



4.3.2. Mechanismen des Thrombin-induzierten Zusammenbruchs der Endothelbarriere

Im Folgenden sollten die Mechanismen des Thrombin-induzierten Zusammenbruchs der Endothelbarriere untersucht werden. Thrombin induziert wie viele andere Entzündungsmediatoren einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, der als ursächlich für viele weitere sich anschließende Signalkaskaden angesehen wird (Bogatcheva et al., 2002). Um sicherzustellen, dass das genutzte Thrombin auch in diesen Zellen wie andere Entzündungsmediatoren einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg verursacht, wurde dies mittels FURA-2 Messungen überprüft.

Durch die Bindung von Ca^{2+} verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Ca^{2+} -bindenden Fluoreszenzfarbstoffes FURA-2. Bei steigendem intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel steigt die bei 340 nm gemessene Fluoreszenzintensität an. Die Zugabe von Thrombin ergab einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} innerhalb von 40 ± 10 % sec auf 135 ± 9 % ($n=8$) des Ausgangsniveaus (Abb. 29). Die gestiegene intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration sank wieder ab und erreichte 3 min nach Thrombinzugabe zu ihrem Ausgangswert nicht mehr signifikante Werte. Um sicherzustellen, dass der hier gemessene Anstieg der Fluoreszenzintensität durch Ca^{2+} hervorgerufen worden ist, wurde in einem zweiten Versuch die durch Thrombin-verursachte Freisetzung von Ca^{2+} durch den Ca^{2+} -Chelator BAPTA geblockt. Eine 30-minütige Vorbehandlung mit $20 \mu\text{M}$ BAPTA war in der Lage, den Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} komplett zu verhindern (Abb. 29).

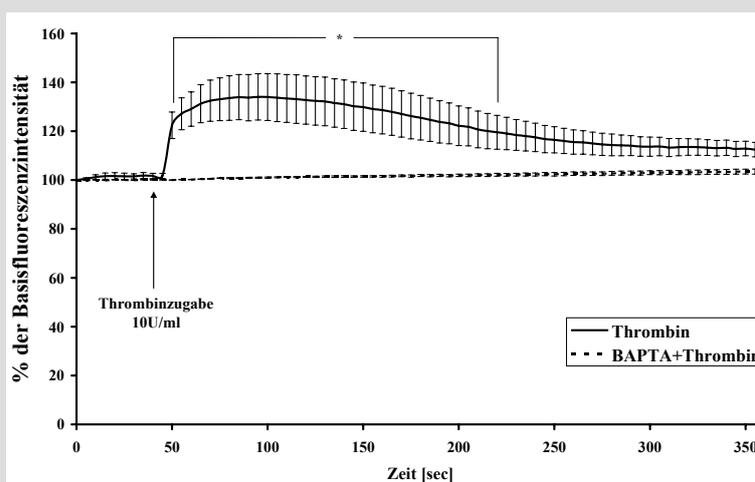
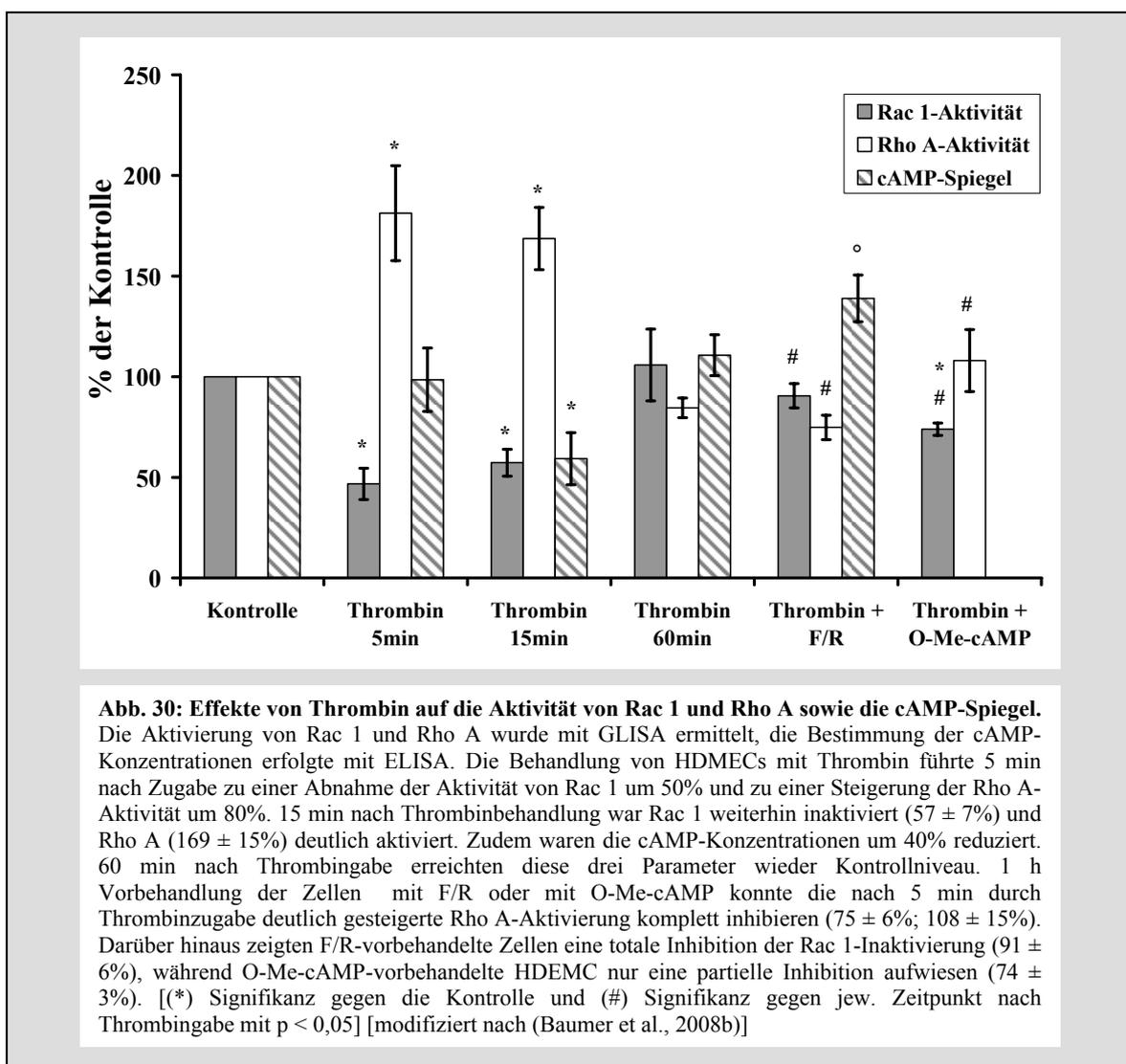


Abb. 29: Effekte von Thrombin auf den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel. Nach Zugabe von Thrombin kam es innerhalb von 40 sec zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität um ca. 30 % durch Bindung von freigesetztem intrazellulärem Ca^{2+} an FURA-2. Durchschnittlich 3 min nach Zugabe von Thrombin wurden zum Ausgangsniveau nicht mehr signifikante Fluoreszenzintensität ermittelt. 30 min Vorinkubation der HEMC mit BAPTA, einem Chelator für Ca^{2+} , verhindert die Bindung des durch Thrombin-Zugabe freigesetzten Ca^{2+} an FURA-2. [*] Bereich der Signifikanz gegen Basisfluoreszenz mit $p < 0,05$]

Der Thrombin-induzierte Endothelbarrierezusammenbruch wird in viele Veröffentlichungen mit Veränderungen der Aktivität von Rho-GTPasen in Verbindung gebracht. So weiß man, dass Thrombin zu einer deutlichen Aktivierung von Rho A führt (Essler et al., 1998; Vouret-Craviari et al., 1998). Bezüglich Rac 1 gibt es unterschiedliche Befunde. Manche Studien fanden eine Rac 1-Inaktivierung (Birukova et al., 2007a; Vouret-Craviari et al., 2002), andere aber nicht (Qiao et al., 2003). Aus diesem Grund wurden im Folgenden Veränderungen der Aktivität von Rho A und Rac 1 gemessen. Da F/R und O-Me-cAMP den durch Thrombin vermittelten Barrierezusammenbruch verhinderten, wurde auch der cAMP-Spiegel untersucht (Abb. 30).



GLISA-Messungen der Rac 1-Aktivität ergaben, dass 5 min nach Thrombinzugabe, d.h. als die Barriereigenschaften reduziert waren, die Rac 1-Aktivität auf 47 ± 8 % des Kontrollniveaus reduziert war, während zu diesem Zeitpunkt Rho A mit 181 ± 15 % signifikant aktiviert war. Allerdings ergaben sich 5 min nach Thrombinzugabe keine

signifikanten Veränderungen der gesamten zellulären cAMP-Spiegel. 15 min nach Zugabe von Thrombin war die Aktivität von Rac 1 noch immer signifikant reduziert ($57 \pm 7 \%$) und Rho A weiterhin aktiviert ($169 \pm 15 \%$). Außerdem war zu diesem Zeitpunkt auch der cAMP-Spiegel deutlich reduziert ($59 \pm 13 \%$ der Kontrolle). Nach 60 min Thrombin-Behandlung lagen sowohl die Aktivitäten der Rho-GTPasen als auch die cAMP-Spiegel wieder auf Ausgangsniveau. Durch Vorinkubation mit F/R (1 h) konnte der Abfall der cAMP-Konzentration ($138 \pm 12 \%$), die Inaktivierung von Rac 1 ($91 \pm 6 \%$) und auch die Aktivierung von Rho A ($75 \pm 6 \%$) komplett verhindert werden. O-Me-cAMP-Vorinkubation (1 h) blockierte die Rac 1-Inaktivierung nur partiell ($74 \pm 3 \%$), dahingegen die Rho A-Aktivierung vollständig ($108 \pm 15 \%$).

Es kann zusammenfassend festgestellt werden, dass der Thrombin-induzierte Barrierezusammenbruch mit einer Reduktion von cAMP sowie Inaktivierung von Rac 1 und Aktivierung von Rho A einhergeht. Da sowohl der Barrierezusammenbruch als auch die veränderten Aktivitäten der Rho-GTPasen durch cAMP verhindert wurden, ist der Abfall von cAMP als der grundlegende Mechanismus anzusehen.

Die Rolle von Rac 1 und Rho A soll im Folgenden untersucht werden. Dazu wurde zunächst die Rho-Kinase mit Y27632 inhibiert. TER-Messungen zeigten nach Vorinkubation der Zellen mit Y27632 (1 h) keinen Thrombin-induzierten Abfall des TER (Abb. 31). Dann wurden Kombinationen des Rac 1-Inhibitors NSC-23766 (30 min) mit F/R oder O-Me-cAMP (je 1 h) vor der Zugabe von Thrombin verwendet, um die Rolle von Rac 1 in dieser Signalkaskade zu klären. Wie oben beschrieben, führte die basale Rac 1-Inhibition durch NSC-23766 (30 min) zu einem Sinken des TER, der durch Zugabe von O-Me-cAMP nicht zu hemmen war. Dagegen war die Applikation von F/R zumindest teilweise effektiv, den TER-Abfall zu verhindern. Dennoch war F/R nicht in der Lage, den Thrombin-induzierten TER-Abfall zu verhindern. Der Abfall des TER ($66 \pm 6\%$ bei 8,5 min; n=5) war nicht signifikant verschieden von Experimenten, in denen nur Thrombin gegeben wurde. Im Unterschied zu Zellen, die nur mit Thrombin behandelt wurden, erreichten mit NSC-23766 und F/R vorbehandelte HDMEC jedoch wieder schneller das Kontrollniveau (17 min $90 \pm 3\%$ der Kontrolle vs. 46 min $92 \pm 7 \%$ der Kontrolle). Bei Kombination von NSC-23766 mit O-Me-cAMP induzierte Thrombin keinen weiteren signifikanten Abfall des TER, der unter diesen Bedingungen zu jedem Zeitpunkt signifikant zur Kontrolle erniedrigt war.

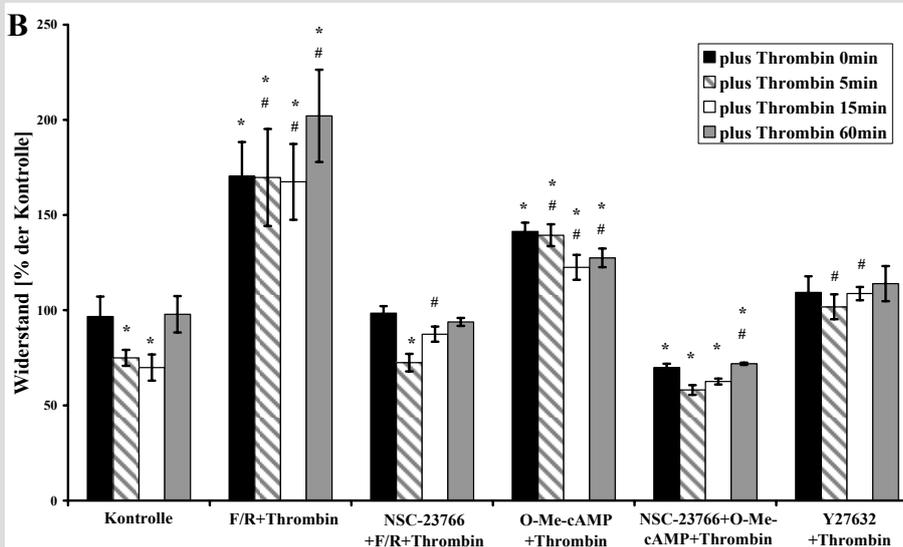
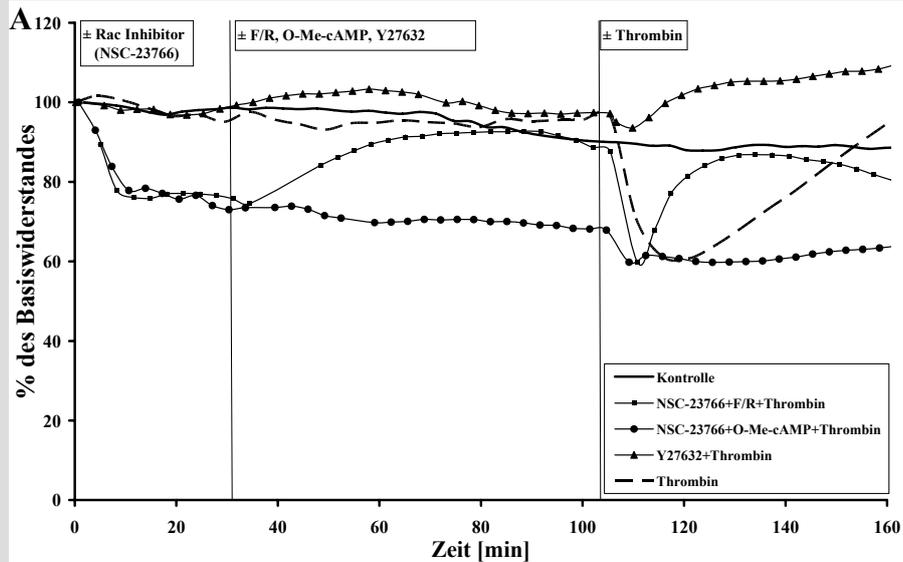


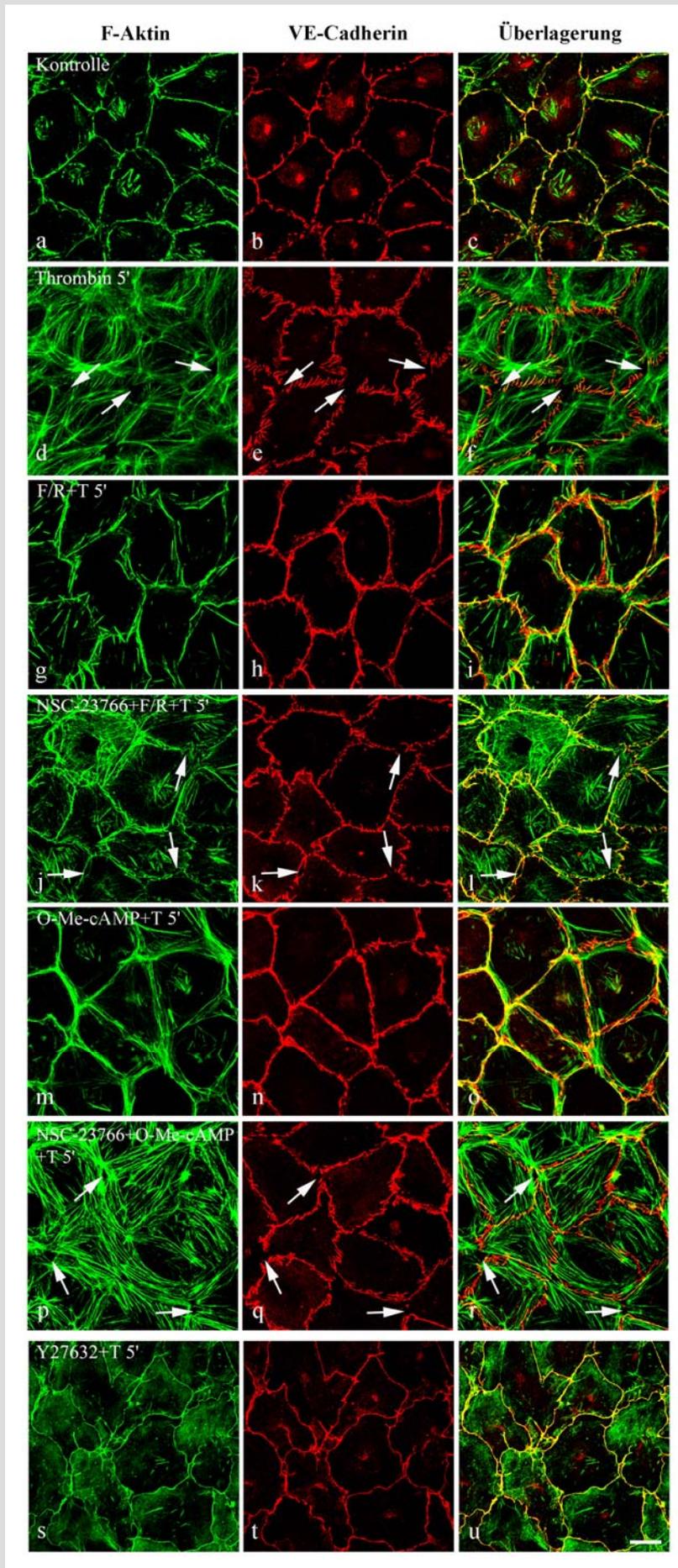
Abb. 31: Rolle von Rac 1 und Rho A in der durch cAMP-vermittelten Hemmung des Thrombin-induzierten Zusammenbruchs der Endothelbarriere. **Abb. A** zeigt ein jeweils repräsentatives Experiment. **Abb. B:** Auswertung aller TER-Einzelmessungen und Darstellung als Balkendiagramm. Mit Thrombin behandelte HDMEC zeigten den typischen reversiblen Verlauf der Widerstandswerte. Vorbehandlung der Zellen für 1 h mit F/R zeigte gesteigerte Ausgangswerte. Die Zugabe von Thrombin löste in diesen Zellen keine signifikanten TER-Veränderungen aus. Allerdings zeigten im Vergleich dazu mit NSC-23766 vorbehandelte HDMEC keine gesteigerten TER-Werte nach Inkubation mit F/R ($98 \pm 4\%$). Die Zugabe von Thrombin resultierte in diesen Zellen in einem Abfall des TER nach 5 min ($72 \pm 5\%$), der signifikant schneller als nach alleiniger Thrombingabe zum Ausgangsniveau nicht signifikante Werte erreichte ($90 \pm 3\%$). Die Vorbehandlung von HDMEC mit O-Me-cAMP für 1 h führte zu gesteigerten Widerständen, die auch durch Thrombinzugabe keiner signifikanten Veränderung unterlagen. Allerdings zeigten zuvor mit NSC-23766-behandelte Zellen eine basal erniedrigten Widerstand ($70 \pm 2\%$), der durch Zugabe von Thrombin nicht signifikant verändert wurde (5 min: $58 \pm 3\%$). Derartig behandelte Zellen zeigten auch keinen Erholungseffekt der TER-Werte. Mit Y27632 für 1 h vorbehandelte HDMEC zeigten basal keine veränderten Widerstände ($109 \pm 8\%$). Thrombinzugabe konnte in diesen Zellen keine Veränderungen des TER hervorrufen. [(*) Signifikanz zu den Kontrollen, (#) Signifikanz zu jew. Zeitpunkt nach Thrombinzugabe mit $p < 0,05$]

Anschließend wurden die Effekte der Rho-Kinase- und der Rac 1-Inhibition auf die durch Thrombin-induzierte Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und der Adhärensjunktionen mit Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht (Abb. 32).

Die Kontrolle zeigte wenige Stressfasern und eine kontinuierliche Verteilung der VE-Cadherin-Färbung entlang der Zellgrenzen (Abb. 32 a-c). Es kam durch alleinige Behandlung der Zellen mit Thrombin zur vermehrten Ausbildung von Stressfasern (Abb. 32 d) und zu interzellulärer Lückenbildung (Pfeile in Abb. 32 d-f). Wie oben beschrieben können F/R- und O-Me-cAMP-Vorbehandlung (1 h) die Effekte von Thrombin verhindern (Abb. 32 g-i, m-o). Eine vorherige Hemmung der Rac 1-Aktivierung durch NSC-23766 (30 min) verhinderte die protektiven Effekte von F/R (Abb. 32 j-l) und O-Me-cAMP (Abb. 32 p-r).

Die Inhibition der Rho-Kinase durch Y27632 (1 h) in der Kombination mit Thrombin führte zu einer Hemmung der für Thrombin-Behandlung typischen Stressfaser Vermehrung und Lückenbildung (Abb. 32 s-u), so dass Y27632-Gabe anscheinend in der Lage ist, alle Thrombin-induzierten Effekte zu verhindern.

Abb. 32: Rolle von Rac 1 und Rho A in der cAMP-vermittelten Hemmung der Thrombin-induzierten Lücken- und Stressfaserbildung. Die Kontrollen (a-c) zeigten wenige Stressfasern (Alexa-Phalloidin 488 1:60) und eine kontinuierliche die Zelle umfassende VE-Cadherin-Färbung (a-VE-Cadherin; polyklonal; 1:100; dag-cy3). Die Zugabe von Thrombin zeigte 5 min nach Zugabe eine deutlich gesteigerte Stressfaserbildung (d) und die Bildung interzellulärer Lücken (Pfeile in d-f). HDMEC, die mit cAMP-steigernden Mediatoren 1 h vorinkubiert wurden, zeigten 5 min nach Thrombinzugabe weder Thrombin-induzierte Stressfaser Vermehrung (g, m) noch eine Bildung interzellulärer Lücken (h, n). Im Gegensatz dazu wiesen HDMEC, die zuvor 30 min mit NSC-23766 behandelt wurden, nach Zugabe von F/R oder O-Me-cAMP für 1h und Thrombin für 5 min deutlich vermehrte Stressfaserbildung (j, p) und eindeutige interzelluläre Lücken auf (Pfeile in j-l, p-r). HDMEC, die mit Y27632 für 1 h vorbehandelt wurden, wiesen keine Thrombin-induzierte gestiegenen Stressfaserbildung (s) und Lückenbildung (t) auf. [Größenbalken: 20 µm]



5. Diskussion

5.1. Effekte der Rho-GTPasen in der Regulation der Endothelbarriere sind zelltypabhängig

Die Studien dieser Arbeit zeigen, dass Rho-GTPasen in unterschiedlichen Endothelzellen verschiedene Effekte auf die Endothelbarriere ausüben.

5.1.1. Schwächung der Endothelbarrierefunktion durch Rho A

Die Aktivierung von Rho A durch CNFy-Behandlung verursachte eine Fragmentierung der VE-Cadherin-Färbung, eine gesteigerte Stressfaserbildung, die Bildung interzellulärer Lücken und eine gesteigerte Permeabilität in PSECs, was frühere Studien makrovaskulärer Endothelzellen ebenfalls zeigten (Carbajal and Schaeffer, 1999; Vouret-Craviari et al., 2002; Wojciak-Stothard et al., 2001; Wojciak-Stothard et al., 2005). Ähnliche Effekte wurden in MesEnd-Zellen und in HDMECs in vitro und ebenso in intakten mesenterialen postkapillären Venulen in vivo gefunden. Im Gegensatz dazu wurde in kultivierten MyEnd-Zellen durch Rho A-Aktivierung keine Permeabilitätssteigerung festgestellt, was im Einklang mit früheren Studien in MyEnd-Zellen steht (Doktorarbeit Sabrina Burger). Es kann ausgeschlossen werden, dass CNFy in MyEnd-Zellen Rho A möglicherweise nicht effektiv aktivierte, da Pull Down-Assays in allen verwendeten Endothelzellen eine deutliche Aktivierung von Rho A nach CNFy-Behandlung ergaben. Ebenso war auch in MyEnd-Zellen unter diesen Bedingungen die Stressfaserbildung drastisch gesteigert. Die Hemmung der Rho-Kinase stärkte die Endothelbarrierefunktion in MyEnd und in HDMEC, so dass geschlussfolgert werden kann, dass Rho A unter Ruhebedingungen die Endothelbarrierefunktion in diesen Zelltypen negativ reguliert.

Diese Ergebnisse zeigen jedoch, dass Rho A-Aktivierung nicht immer mit einer Schwächung der Endothelbarriere einhergeht. In zukünftigen Studien wäre zu ermitteln, ob Rho A-Aktivierung auch in den Endothelzellen verschiedener Gefäßbetten in vivo unterschiedliche Effekte hervorruft.

5.1.2. Rac 1 und Cdc42 verstärken im mikrovaskulären Endothel die Barrierefunktion

Die Aktivierung von Rac 1 und Cdc42 durch CNF-1-Gabe verstärkte die Endothelbarriere in MyEnd-Zellen. Ähnlich verhielt es sich in HDMECs, obwohl in diesen Zellen durch CNF-1-Behandlung nicht nur Rac 1 und Cdc42, sondern auch Rho A aktiviert wird. In MesEnd-Zellen inhibierte die Aktivierung von Rac 1 und Cdc42 die barriere destabilisierenden Effekte der gleichzeitigen Rho A-Aktivierung nach CNF-1-Gabe. Im Unterschied dazu kam es in PSEC-Zellen nach CNF-1-Behandlung zu einer gesteigerten Permeabilität, d.h. in diesen makrovaskulären Endothelzellen war die Aktivierung von Rac 1 und Cdc42 durch CNF-1 nicht in der Lage, die Effekte einer simultan auftretenden Rho A-Aktivierung auszubalancieren. Durch Kombinationsexperimente von CNF-1 mit dem Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 konnte gezeigt werden, dass CNF-1 durch Rho A-Aktivierung und nicht durch Aktivierung von Rac 1 und Cdc42 zur Erhöhung der Permeabilität führte.

Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass Aktivierung von Rac 1 und Cdc42 protektiv für die Barriereintegrität in mikrovaskulären Endothelzellen sind, was frühere Befunde unserer Arbeitsgruppe in vivo bestätigen (Waschke et al., 2006). In diesen Arbeiten war die Aktivierung von Rac 1 und Cdc42 durch CNF-1 in der Lage, barriere destabilisierende Effekte des Entzündungsmediators PAF (platelet-activating factor) zu vermindern. Darüber hinaus ist für physiologische Mediatoren wie Sphingosin-1-Phosphat (S-1-P) bekannt, was von aktivierten Plättchen freigesetzt wird, dass ein barriestabilisierender Effekt über Rac 1-Signalwege vermittelt wird (Lee et al., 2006). Gegensätzlich dazu scheint gemäß der vorliegenden Arbeit der protektive Effekt von Rac 1 und Cdc42 im makrovaskulären Endothel weniger stark ausgeprägt zu sein. In der Literatur finden sich zu den Effekten einer Rac 1-Aktivierung im Endothel gegenläufige Ergebnisse. So wurde publiziert, dass die Expression von konstitutiv aktivem Rac 1 einen protektiven Effekt in PSEC zeigte (Wojciak-Stothard et al., 2005). Vorher zeigte unter anderem die gleiche Arbeitsgruppe für makrovaskuläre Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVECs), dass eine Rac 1-Aktivierung negative Effekte auf die Endothelbarriere hatte (van Wetering et al., 2002; Wojciak-Stothard et al., 2001). Andererseits zeigt eine Arbeit an HUVECs, dass die Aktivierung der Rho-GTPasen durch CNF-1 nicht wie in unseren makrovaskulären Endothelzellen (PSEC) zu einem Barrierezusammenbruch führte, sondern einen

protektiven Effekt hatte, da sogar ein Thrombin-induzierter Barrierezusammenbruch verhindert werden konnte (Vouret-Craviari et al., 1998).

5.1.3. Mögliche Mechanismen der kleinen GTPasen in der Regulation der Endothelbarrierefunktion

Eines der Ziele für die Zukunft wird es sein, herauszufinden, durch welche Mechanismen Rho-GTPasen die Barrierefunktion des Endothels regulieren. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass gestörte Endothelbarrierefunktion mit der Bildung interzellulärer Lücken einherging, was die Hypothese stärkt, dass Rho-GTPasen in die Regulation der parazellulären Permeabilität mehr involviert sind als in die transzelluläre Permeabilitätsregulation (Mehta and Malik, 2006; Michel and Curry, 1999). Die hier erbrachten Ergebnisse geben weitere Einblicke in die Wichtigkeit der Stressfaserformation, der Verstärkung eines corticalen Aktinbandes und der VE-Cadherin-vermittelten Adhäsion in der Regulation der Endothelbarriere.

Einerseits war eine starke Vermehrung der Stressfasern in allen Zelltypen als Antwort auf Rho A-Aktivierung gefunden worden. Andererseits kam es nur bei drei unserer Zellarten (PSEC, MesEnd, HDMEC) unter diesen Bedingungen zur Lückenbildung, nicht aber in MyEnd-Zellen. Weiterhin führte die Behandlung in HDMECs und PSECs mit Toxin B zu einer Verminderung der Stressfasern, aber dennoch zu einer deutlichen Lückenformation. Diese Befunde legen nahe, dass interzelluläre Lückenbildung und gesteigerte Permeabilität nicht mit gesteigerter Stressfaserbildung einhergehen, wie zu erwarten wäre, wenn Myosin-abhängige Kontraktion der einer Lückenbildung zugrunde liegende Mechanismus wäre (Tab.9). Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten in MyEnd-Zellen, dass interzelluläre Lücken an Stellen mit fragmentiertem peripherem Aktinring zu finden waren. Darüber hinaus ging eine verstärkte Endothelbarriere nach Rac 1-Aktivierung mit einem gestärkten peripherem Aktinring und einer Rekrutierung von aktinbindenden Proteinen wie Cortactin und VASP einher (Waschke et al., 2005; Waschke et al., 2006). Aus diesen Daten kann geschlussfolgert werden, dass es eine positive Korrelation zwischen einer Verstärkung des corticalen Aktinrings und einer gesteigerten Barrierefunktion gibt, und dass Rac 1 und Cdc42 die Barrierefunktion durch Regulation des Aktinzytoskeletts v.a. durch Regulation des junctional gebundenen Aktins vermitteln. Auch Daten dieser aktuellen Studie stärken diese Hypothese, denn ein verstärktes corticales Aktin wurde in

MesEnd-Zellen gefunden, bei denen eine Aktivierung von Rac 1 und Cdc42 eine Rho A-vermittelte interzelluläre Lückenbildung und den damit korrelierenden Permeabilitätsanstieg ausbalancierten. Allerdings stärkte in HDMECs eine Aktivierung von Rac 1 und Cdc42 die Barrierefunktion ohne eine Verstärkung des peripheren Aktinrings. Zudem war die Bildung eines corticalen Aktinrings in PSEC nach Rac 1- und Cdc42-Aktivierung nicht ausreichend, die durch parallele Rho A-Aktivierung vermittelte Barriere destabilisierung zu verhindern. Damit ist die Bedeutung des perijunktionalen Aktinrings für die Regulation der Endothelbarriere nicht abschließend zu klären.

Da in all diesen Experimenten zu erkennen war, dass interzelluläre Lückenbildung mit einer Fragmentierung der VE-Cadherin-Lokalisation einherging, stellt sich die Frage, inwieweit Rho-GTPasen die VE-Cadherin-vermittelte Adhäsion und die Morphologie von Adhärensjunktionen regulieren. Entsprechend der Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass eine Schwächung der Endothelbarriere durch Rac 1-Inaktivierung stets mit einer Schwächung der VE-Cadherin-vermittelten Adhäsion verbunden war (Waschke et al., 2004a; Waschke et al., 2004b; Waschke et al., 2004c). Jedoch waren weder die Effekte der Aktivierung von Rho A durch CNF γ -Behandlung noch von Rac 1 durch CNF-1-Gabe in MyEnd und MesEnd mit Änderungen in der VE-Cadherin-vermittelten Adhäsion assoziiert. Andererseits führte die Hemmung der Rho-Kinase durch Y27632 zu einer Steigerung der VE-Cadherin-vermittelten Adhäsion, wie Laserpinzettenexperimente ergaben, was eine negative Regulation der Adhärensjunktionen durch Rho A andeutet. Diese Daten zeigen somit auch die Möglichkeit auf, dass VE-Cadherin-vermittelte Adhäsion nicht junktionaler VE-Cadherin-Moleküle auf der Zelloberfläche nicht notwendigerweise die Bedingungen in Adhärensjunktionen zwischen zwei Endothelzellen widerspiegeln müssen.

Des Weiteren kann Rac 1 die Bindung von IQGAP an β -Catenin unterbinden, so dass β -Catenin vermehrt frei vorliegt und mit Cadherinen Adhärensjunktionen ausbilden kann (Vandenbroucke et al., 2008). Cdc42 scheint vor allem einen Einfluss auf die Bindungswahrscheinlichkeit von α -Catenin an den β -Catenin/Cadherin-Komplex zu haben, so dass vermehrt aktives Cdc42 z.B. nach CNF-1-Behandlung neben den Rac 1-vermittelten Effekten eine zusätzlich barriestabilisierenden Effekt über eine verstärkte Catenin/Cadherin-Interaktion ausüben könnte und somit auch bei inflammatorischen Prozessen nach Thrombin-Gabe die Rekonstitution der AJ erleichtern könnte (Broman et

al., 2006; Broman et al., 2007). Das gerade der Phosphorylierungsstatus der Junctionsproteine, v.a. von VE-Cadherin und von den Cateninen für die Aufrechterhaltung der Endothelbarrierefunktion essentiell ist, zeigen Studien der Arbeitsgruppe um Lampugnani (Lampugnani et al., 1997; Lampugnani and Dejana, 1997). Für AJ konnte eine Rac 1-abhängige Tiam 1-Regulation der Endothelbarriere ermittelt werden. So wurde von einer membranständigen Assoziation von Tiam 1 und E-Cadherin in Epithelzellen berichtet. Durch Einsatz von Tiam 1-siRNA reduzierte sich die E-Cadherin-Färbung (Malliri et al., 2004).

Es ist zu betonen, dass die Signalwege zwischen Cadherinen und Rho-GTPasen bidirektional abzulaufen scheinen. Über eine lokale Aktivierung der PI-3-Kinase durch Cadherin-Bindung kommt es zur Freilegung einer PH-Domäne, welche die Bindedomäne für GEFs darstellt. So könnte eine z.B. durch Tiam 1- oder Vav-2-vermittelte Aktivierung von Rac 1 vermittelt werden. Ebenso kann es zur Aktivierung von Rac 1 nach verstärkter Cadherin-vermittelter Adhäsion über PI-3-Kinase-unabhängige Mechanismen wie durch p120-Catenin kommen (Erez et al., 2005).

Ebenso besteht auch die Möglichkeit der Regulation der Occludenskontakte durch Rho-GTPasen (Persidsky et al., 2006). So ist bekannt, dass der Phosphorylierungsstatus von Occludin, der möglicherweise die TJ-Permeabilität beeinflusst, durch Rho-GTPasen-abhängige Signalwege kontrolliert wird (Förster, 2008). So zeigten Studien, dass es durch Aktivierung der Rho-Kinase zu einer Phosphorylierung von Claudin 5 an Tyrosin 207 und von Occludin an Tyrosin 382 und Serin 507 in Endothelzellen der Blut-Hirnschranke kommt (Yamamoto et al., 2008). Des Weiteren konnte eine Studie zum Rac 1-GEF Tiam 1 zeigen, dass Zellen, die kein Tiam 1 besitzen, eine gestörte TJ-Bildung und somit eine gestörte Endothelbarrierefunktion aufwiesen (Mertens et al., 2005).

			MyEnd	MesEnd	HDMEC	PSEC	
			+ Y27632	+ Y27632	+ Y27632	+ Y27632	
Aktivierung	RhoA (CNFy)	Stressfasern Lücken FD-Fluss VE-Cad. Adh.	↑ - ~ ~	↓ - ↓ ↑	↑ + ↑ ~	~ - ~ ↑	↑ + ↑ n.t.
	Rac 1/Cdc42 (CNF-1)	Stressfasern Lücken FD-Fluss VE-Cad. Adh.	↓ - ↓ ~	↓ - ↓ ↑	Koaktivierung von Rho A		
	RhoA/Rac 1/Cdc42 (CNF-1)	Stressfasern Lücken FD-Fluss VE-Cad. Adh.	keine Koaktivierung		↑ - ~ ~	~ - ↓ ↑	↑ - ↓ n.t.
Inaktivierung	RhoA/Rac 1/Cdc42 (Toxin B)	Stressfasern Lücken FD-Fluss VE-Cad. Adh.	↓ + ↑ ↓	↓ + ↑ ↓	↓ + ↑ n.t.	↓ + ↑ n.t.	
	Rac 1 (LT)	Stressfasern Lücken FD-Fluss VE-Cad. Adh.	~ + ↑ ↓	↓ + ↑ ↓	↑ + ↑ n.t.	↓ + ↑ n.t.	
	Rho-Kinase (Y27632)	Stressfasern Lücken FD-Fluss VE-Cad. Adh.	↓ - ↓ ↑	↓ - ↓ ↑	~ - ↓ ↑	↓ - ↓ n.t.	

Tab.9: Übersichtsdarstellung der Befunde aus vier verschiedenen Zelllinien. Lücken- und Stressfaserbildung wurde den Immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen entnommen, Permeabilität wurde als FITC-Dextran-Fluss gemessen und die VE-Cadherin-vermittelte Adhäsion wurde mit Laserpinzette ermittelt. [↑Anstieg; ↓ Abfall; ~ unverändert; + vorhanden; - nicht vorhanden; n.t. not tested] → hellgrau umrandete Daten wurden von Sabrina Burger im Rahmen ihrer Doktorarbeit erbracht. [modifiziert nach (Baumer et al., 2008a)]

5.2. Rac 1 ist an den barrirestabilisierenden Effekten von cAMP beteiligt

Im zweiten Teil dieser Dissertation sollte gezeigt werden, welche Rolle cAMP und Rac 1 in der Regulation der Endothelbarriere haben. Die Daten zeigen, dass cAMP unter Bedingungen, in denen es die Barriere stabilisiert und eine Umorganisation von Adhärens- und Occludensjunctionen auslöst, eine Aktivierung von Rac 1 im mikrovaskulärem Endothel verursacht und Rac 1-typische Effekte auf das Aktin-Zytoskelett ausübt.

5.2.1. cAMP-vermittelte Barrierestabilisierung geht mit einer Umorganisation von Adhärens- und Occludensjunctionen einher

Es ist schon sehr lange bekannt, dass cAMP sowohl die Permeabilität unter Ruhebedingungen als auch bei der Entzündung *in vivo* und *in vitro* vermindern kann (Adamson et al., 1998; Adamson et al., 2002; Adamson et al., 2003; Adamson et al., 2008; Lorenowicz et al., 2007; Michel and Curry, 1999; Nishikawa et al., 1984; Schlegel et al., 2007; Stelzner et al., 1989). Auch in dieser Studie wurde bestätigt, dass cAMP im mikrovaskulären Endothel zu einer Stabilisierung der Endothelbarrierefunktion, gemessen als einen signifikanten Anstieg des TER, führte. Diese gesteigerten Barriereigenschaften gingen mit einer Verstärkung des corticalen Aktinbandes, einer Linearisierung von Adhärens- und Occludensjunctionen einher. Diese Ergebnisse unterstützen damit andere *in vitro*-Studien aus der Literatur (Cullere et al., 2005; Fukuhara et al., 2005; Knox and Brown, 2002; Kooistra et al., 2005). Allerdings ist noch immer nicht klar, in welcher Weise Adhärens- und Occludensjunctionen moduliert werden, damit gesteigerte cAMP-Spiegel ihre Effekte vermitteln können. Möglicherweise kommt es zu einer Reduktion der interzellulären Überlappungsbereiche und zu einer Verminderung von interzellulären Interdigitationen, so dass die Junctionsproteine vermehrt direkt an der Verbindung zwischen den Zellen angelagert sind. Ebenso steigt die Fluoreszenzintensität von Claudin 5 nach F/R, O-Me-cAMP und CNF-1 und die Intensität von VE-Cadherin nach O-Me-cAMP, so dass eine Zunahme von Adhärens- und Occludensjunctionsproteinen an den Junctionen denkbar wäre. Dieser Befund wird durch die Ergebnisse der Triton-Extraktionsassays unterstützt. Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die totale Gesamtproteinmenge an VE-Cadherin und Claudin 5 nicht verändert war, sondern dass es zu einer deutlichen Umverteilung von Junctionsproteinen gekommen war. So fand sich nach O-Me-cAMP-Behandlung mehr VE-Cadherin in der tritonunlöslichen Fraktion, d.h. es war mehr VE-Cadherin an das Aktinzytoskelett gebunden als unter Kontrollbedingungen. Ebenso konnten derartige Befunde nach Behandlung mit F/R und O-Me-cAMP für Claudin 5 gefunden werden. Durch Umverteilung von mehr Junctionsproteinen in die Zellkontakte zweier Endothelzellen konnte die sinkende Permeabilität und somit die gesteigerte Barrierefunktion mit erklärt werden.

5.2.2. cAMP induziert eine Endothelbarrierefestigung unter anderem durch Regulation der Aktivität der Rho-GTPasen

Es ist durchaus möglich, dass cAMP über Epac/Rap 1 die VE-Cadherin-vermittelte Adhäsion reguliert und somit direkte Effekte auf die Adhärensjunktionen ausübt, was in früheren Studien durch eine Umverteilung von AF6 parallel zu VE-Cadherin Umverteilungen nahegelegt wurde (Cullere et al., 2005; Fukuhara et al., 2005; Kooistra et al., 2005). AF6 und Rap 1 können E-Cadherin-basierte Adhärensjunktionen durch Hemmung der E-Cadherin-Endozytose stärken (Hoshino et al., 2005).

Rho-GTPasen sind lange bekannte Regulatoren des Aktinzytoskeletts und somit auch der Zelladhäsion (Bustelo et al., 2007; Jaffe and Hall, 2005). Dabei ist besonders Rac 1 für die Aufrechterhaltung der VE-Cadherin-Bindung notwendig (Waschke et al., 2004a), wohingegen nach den hier vorliegenden Daten Rho A über die Rho-Kinase die VE-Cadherin-Bindung negativ reguliert. Deshalb ist es denkbar, dass ein Teil der barriereprotektiven Effekte von cAMP über Rho-GTPasen vermittelt werden.

Die Rho A-Aktivität wurde sowohl durch F/R-vermittelte cAMP-Steigerung als auch durch O-Me-cAMP-Gabe zumindest unter Kontrollbedingungen nicht beeinflusst. Dies unterstützt frühere Befunde, die ebenso gezeigt haben, dass O-Me-cAMP basal keine Veränderung der Rho A-Aktivität bewirkte (Cullere et al., 2005). Allerdings haben andere Studien in makrovaskulären Endothelzellen gefunden, dass Forskolin auch die basale Rho A-Aktivität vermindert (Birukova et al., 2004b). Grundsätzlich ist eine cAMP-vermittelte Rho A-Inaktivierung möglich, da PKA-Aktivierung eine Serin¹⁸⁸-Phosphorylierung von Rho A verursachen kann, die eine gesteigerte Interaktion mit GAPs zur Folge hat und die Inaktivierung von Rho A mit sich bringt (Ellerbroek et al., 2003; Loirand et al., 2006). Darüber hinaus kann über eine Aktivierung von Rap 1 eine Aktivierung des Rho-GAPs Arap3 erfolgen und somit eine Inaktivierung von Rho A bewirken (Kooistra et al., 2007; Schmidt et al., 2007). In den von uns verwendeten mikrovaskulären HDMEC-Zellen scheint dieser Effekt jedoch unter Ruhebedingungen keine Auswirkung auf die Rho A-Aktivität zu haben, wie unten ausgeführt hemmt die cAMP-Erhöhung aber die Thrombin-vermittelte Rho A-Aktivierung.

Ebenso wurde in dieser Studie die Hypothese untersucht, ob die Aktivität von Rac 1 an der cAMP-vermittelten Barriestabilisierung beteiligt ist, da die Wichtigkeit von Rac 1 für die

Aufrechterhaltung der Endothelbarriereintegrität gut belegt ist (Birukova et al., 2007b; Gopalakrishnan et al., 2002; Waschke et al., 2004a; Waschke et al., 2004b; Waschke et al., 2004c; Waschke et al., 2006; Wojciak-Stothard et al., 2005). Wir haben herausgefunden, dass F/R und O-Me-cAMP zu einer Rac 1-Aktivierung führen, die mit einer direkten Aktivierung durch CNF-1 vergleichbar war.

Darüber hinaus wiesen Zellen nach Erhöhung des cAMP-Spiegels typische zytoskelettale Veränderungen auf, die für eine Rac 1-Aktivierung typisch sind. So führte cAMP-Anstieg zur Bildung eines corticalen Aktinbandes und einer Umverteilung von Rac 1 und seinem Effektor Cortactin an die Zellmembran. Diese Befunde wurden durch Versuche mit konstitutiv aktivem Rac 1 transfizierten HDMEC unterstützt. Es ist möglich, dass die Umverteilung von Cortactin zu einer Barrierestabilisierung beiträgt, da Rac 1 über Cortactin zu einer Barrierestabilisierung führen kann (Jacobson et al., 2006). Dies wurde ebenso von der Arbeitsgruppe um Fukuhara vermutet, denn auch sie beobachteten die Bildung eines corticalen Aktinrings und die Rekrutierung von Cortactin an die Junctionen (Fukuhara et al., 2005).

Es wurde gezeigt, dass die Glykosylierung von Rac 1 durch das bakterielle Toxin LT zu einem Zusammenbruch der Endothelbarriere führt (Waschke et al., 2004a). Ebenso ist publiziert, dass diese Inaktivierung durch Steigerung der cAMP-Spiegel inhibierbar ist (Waschke et al., 2004a; Waschke et al., 2004b; Waschke et al., 2004c). Um die Rolle von Rac 1 in der cAMP-vermittelten Barrierestabilisierung genauer zu untersuchen, wurde in diesen Studien ein Rac 1-Inhibitor (NSC-23766) genutzt, der die Aktivierung von Rac 1 hemmt, indem er die Bindung der Rac 1-spezifischen GEFs Trio und Tiam 1 an die GTPase inhibiert (Gao et al., 2004). Die Inaktivierung von Rac 1 durch NSC-23766 führte zu einer signifikant reduzierten Barrierefunktion, die mit einer deutlichen Lückenbildung einherging. So kann davon ausgegangen werden, dass eine kontinuierliche Aktivierung von Rac 1 durch Trio und Tiam 1 zur Aufrechterhaltung der Barrierefunktion nötig ist.

Des Weiteren wurde untersucht, ob trotz Vorinkubation mit dem Rac 1-Inhibitor F/R und O-Me-cAMP auch weiterhin in der Lage sind, die Barrierestabilisierung zu vermitteln. Dabei wurde gezeigt, dass die positiven Effekte von O-Me-cAMP größtenteils durch Rac 1 vermittelt sein müssen, da die Zugabe von O-Me-cAMP im Gegensatz zur alleinigen O-Me-cAMP-Gabe keine barrierestabilisierenden Eigenschaften mehr zeigte. Der gemessene TER lag weiterhin signifikant unter Kontrollniveau und war begleitet von einer deutlichen Lückenbildung. Ebenso entfiel die Linearisierung und Verstärkung der VE-Cadherin-

Fluoreszenz, was auch für diesen Effekt einen vor allem durch Tiam 1/Rac 1-vermittelten Signalweg vermuten lässt. Zwischenzeitlich konnte eine andere Arbeitsgruppe mit diesem Inhibitor zeigen, dass sowohl die PKA- als auch die Epac/Rap 1-vermittelte Barrierestabilisierung über eine Aktivierung von Rac 1 verläuft und das hierbei die GEFs Trio und Tiam 1 involviert sind (Birukova et al., 2007b). Allerdings zeigte eine andere Arbeit, dass die durch den Epac/Rap 1-Signalweg vermittelte Barrierestabilisierung auch mit einer Veränderung der Mikrotubulidynamik einhergeht, die durch gesteigertes cAMP und Epac, aber Rap 1-unabhängig, vermittelt wird und somit anscheinend keiner Rap 1 – Rac 1-Aktivierung bedarf (Sehrawat et al., 2008).

Im Unterschied zu O-Me-cAMP führte die Zugabe von F/R zu zuvor mit Rac 1-Inhibitor behandelten Zellen zu einem Anstieg des TER auf Kontrollniveau. Dies deutet an, dass der PKA-abhängige Signalweg nicht nur über Rac 1-Aktivierung verläuft oder zumindest Tiam 1 bzw. Trio als GEFs nicht involviert sind. Allerdings war die gefundene Barrierestabilisierung im Vergleich zu Messungen des TER nach F/R ohne Rac 1-Inhibitor immer noch signifikant erniedrigt. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass der cAMP-vermittelte barrierestabilisierende Effekt zumindest teilweise über Rap 1-abhängige Rac 1-Aktivierung vermittelt wird. Es ist möglich, dass PKA verschiedenste weitere barrierestabilisierende Mechanismen vermittelt, die von Rho-GTPasen unabhängig sind. So kann PKA u.a. die MLCK inhibieren und damit die Kontraktion inhibieren (Nishikawa et al., 1984; Yuan, 2002). Darüber hinaus kommt es durch Aktivierung von PKA zu einer Phosphorylierung Aktin-bindender Proteine wie VASP (Blume et al., 2007; Rosenberger et al., 2007) oder Filamin (Hastie et al., 1997), und somit möglicherweise zu einer Regulation der Endothelbarrierefunktion durch Kontrolle der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts. Es ist bekannt, dass das Aktin-Zytoskelett bei der Regulation von Adhärens- und Occludenskontakten eine wesentliche Rolle spielt. So stabilisieren Aktinfilamente die Adhärens- und Occludensjunctionen (Dejana, 2004) und darüber hinaus führt eine gestörte Aktinpolymerisation zu einer gesteigerten mikrovaskuläre Permeabilität in vivo (Waschke et al., 2005). Zusammenfassend kann aus den vorliegenden Daten geschlossen werden, dass die barrierestabilisierende Eigenschaften von cAMP teilweise durch Rac 1-Aktivierung vermittelt werden.

5.2.3. cAMP-vermittelte Barrieresteigerung wird sowohl durch den PKA-abhängigen als auch durch Epac/Rap 1-Signalweg vermittelt

Nachdem berichtet wurde, dass O-Me-cAMP konzentrationsabhängig selektiv den Epac/Rap 1-Signalweg und nicht PKA aktiviert (Christensen et al., 2003), wurde deutlich, dass viele Effekte, die vorher nur PKA zugeschrieben wurden, durchaus auch Epac/Rap 1 vermittelt werden könnten. Aus diesem Grund wurden in dieser Studie neben F/R zur Erhöhung des cAMP-Spiegels als auch O-Me-cAMP zur selektiven Aktivierung des Epac/Rap 1-Weges genutzt. Um sicherzustellen, dass O-Me-cAMP unter den hier verwendeten Bedingungen selektiv Epac/Rap 1-Signalwege aktiviert und nicht PKA, wurde die Tatsache genutzt, dass VASP an Serin 157 von PKA phosphoryliert wird (Halbrugge et al., 1990). Es ergab sich eine Phosphorylierung von VASP lediglich nach F/R-Behandlung. O-Me-cAMP scheint also keine Aktivierung von PKA zu bewirken. Somit ist aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse die Aktivierung von Rac 1 sowohl über Epac/Rap 1 als auch über PKA induzierbar. An dieser Stelle muss allerdings festgestellt werden, dass nicht untersucht wurde, ob unter den in dieser Studie genutzten Bedingungen die F/R-vermittelte cAMP-Steigerung ausreichte, um Epac/Rap 1 zu aktivieren. Die Rap 1-induzierte Aktivierung von Rac 1 scheint durch die spezifischen GEFs Tiam 1 und Vav2 vermittelt zu sein (Birukova et al., 2007a; Kooistra et al., 2007). Da Rac 1 im Gegensatz zu Rho A keine PKA-Phosphorylierungsstelle aufweist, scheint auch PKA indirekt möglicherweise über die GEFs Tiam 1 oder Trio Rac 1 zu aktivieren (Dormond and Ruegg, 2003).

In Zukunft muss herausgefunden werden, wie die beiden cAMP-abhängigen Signalwege die verschiedenen Zellkontakte regulieren. F/R, O-Me-cAMP und CNF-1 hatten ähnliche Einflüsse auf die Intensität der Claudin 5-Färbung und die aufgetretene Linearisierung, was aufzeigt, dass diese Effekte durch Epac/Rap 1 vermittelt sein könnten (Mertens et al., 2005).

Interessanterweise verursachten F/R- und O-Me-cAMP-Gabe, aber nicht CNF-1-Behandlung, eine Linearisierung der Adhärensjunktionen. Somit ist weiterhin unklar, ob dieser Effekt Rac 1-vermittelt oder direkt durch Rap 1 verursacht wird. Des Weiteren stärkte nur O-Me-cAMP, nicht aber F/R die AJ über gesteigerte zytoskelettale Verankerung von VE-Cadherin. Dieser Prozess scheint damit Rap 1 vermittelt zu sein.

5.3. Bedeutung von cAMP, Rac 1 und Rho A bei dem durch Thrombin induzierten Barrierezusammenbruch

5.3.1. Der Thrombin-induzierte Endothelbarrierezusammenbruch erfolgt durch Reduktion von cAMP

Abschließend konnten innerhalb der vorliegenden Arbeit neue Einblicke in die Mechanismen aufgezeigt werden, die im Rahmen des Thrombin-induzierten Endothelbarrierezusammenbruchs involviert sind. Zunächst konnte mit Messungen des TER eindeutig gezeigt werden, dass die von uns verwendeten HDMEC-Zellen auf Thrombin mit einem reversiblen Zusammenbruch der Endothelbarriereintegrität reagieren, der bereits nach 5 min feststellbar war. Für andere Endothelzellen konnte dies ebenfalls gezeigt werden (Birukova et al., 2004c). Ebenso zeigten Permeabilitätsmessungen vieler früherer Studien einen rapiden, aber reversiblen Anstieg der Permeabilität (Cullere et al., 2005; Garcia et al., 1995; Patterson et al., 2000; Tirupathi et al., 1992). Sowohl F/R-Gabe als auch O-Me-cAMP-Behandlung waren in der Lage, den durch Thrombin induzierten Endothelbarrierezusammenbruch komplett zu inhibieren, wie es auch schon früher in ähnlichen Studien ermittelt wurde (Cullere et al., 2005). Diese Befunde legten Nahe, dass Thrombin durch Reduktion von cAMP zum Zusammenbruch der Barriere geführt haben könnte.

Daher wurden innerhalb dieser Untersuchungen auch die cAMP-Spiegel gemessen. Es wurde festgestellt, dass der intrazelluläre cAMP-Spiegel 15 min nach Thrombinzugabe erniedrigt war und nach 60 min wieder das Ausgangsniveau erreicht hatte. Dies ist möglich, da Thrombin über einen Ca^{2+} -Einstrom zu einer Inhibition der Adenylatcyklase 6 und zu somit zu sinkenden cAMP-Spiegeln führen kann (Cioffi et al., 2002). Viele Entzündungsmediatoren verursachen einen derartigen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg, was als ursächlich für verschiedenste intrazelluläre Signalwege angesehen wird (Mehta and Malik, 2006; Sandoval et al., 2001; Vandenbroucke et al., 2008). Da allerdings 5 min nach Thrombingabe, als die Barrierefunktion bereits erniedrigt war, der Gesamt-cAMP-Spiegel der Zelle noch nicht signifikant erniedrigt war, konnte die Rolle von cAMP nicht abschließend geklärt werden. Um diesem Ziel näher zu kommen, wurde die Bedeutung von cAMP bei weiteren Mechanismen untersucht, durch die Thrombin die Endothelbarriere reguliert. Dazu zählte die Regulation der GTPasen Rho A und Rac 1.

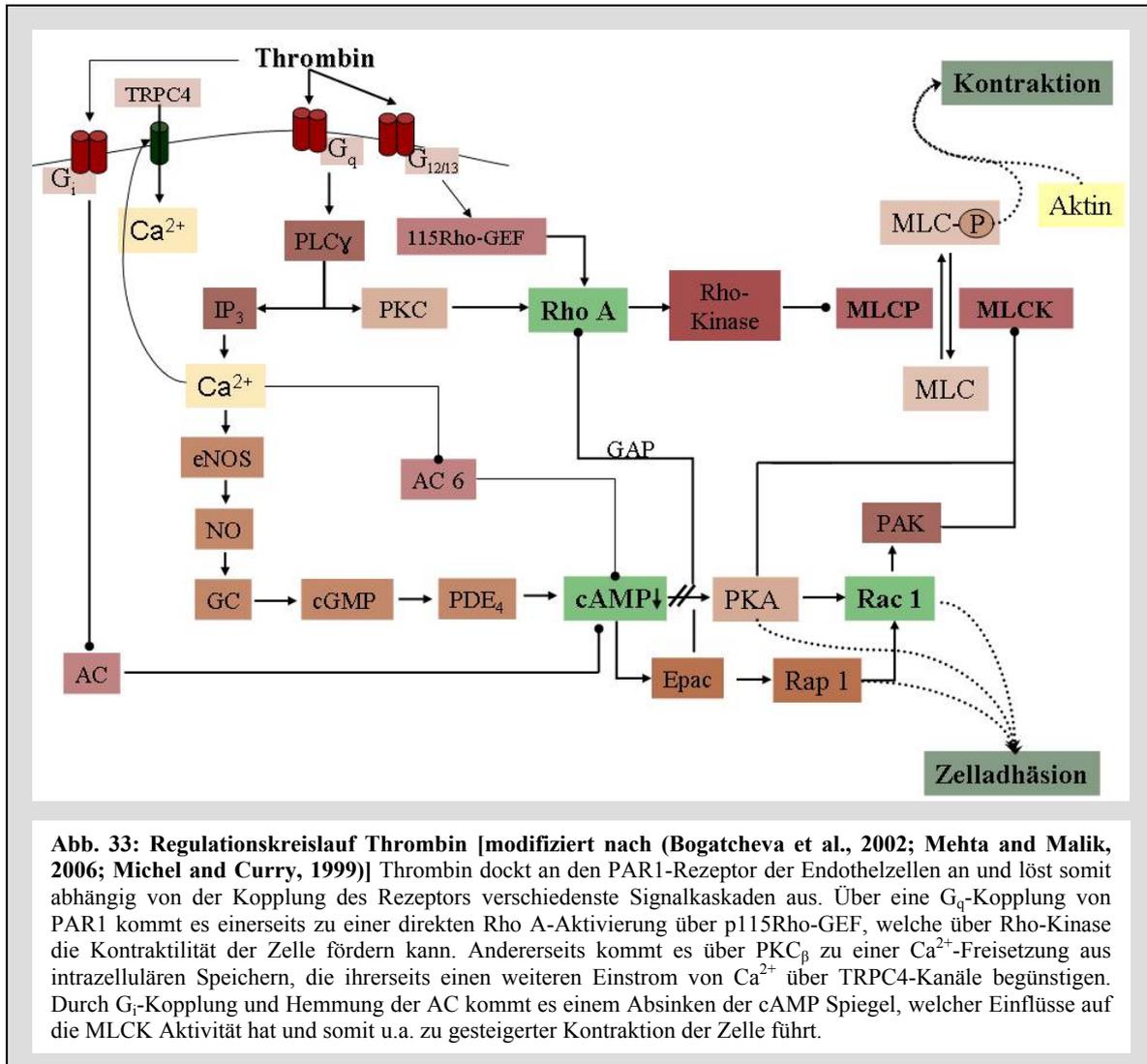
5.3.2. Rac 1 nimmt eine wesentliche Rolle in cAMP-vermittelten protektiven Effekten ein

Zu den durch Thrombin induzierten Mechanismen gibt es viele Studien, da Thrombin oft als eine Art Entzündungsmediator in kultivierten Endothelzellen eingesetzt wird (Abb. 33). Die durch Thrombin vermittelten Effekte werden primär durch PAR1-Rezeptoren (protease activated receptor 1) (Bogatcheva et al., 2002; Hirano et al., 2007) vermittelt. Die Interaktion zwischen PAR1-Rezeptor und intrazellulären Effektoren ist gut untersucht und wird durch heterotrimere GTP-bindende Proteine vermittelt. So interagieren PAR1-Rezeptoren mit G_i -, G_q - und $G_{12/13}$ -Proteinen. $G_{12/13}$ -gekoppelte PAR1-Rezeptoren vermitteln eine Ca^{2+} -unabhängige Aktivierung von Rho A durch p115Rho-GEF (Birukova et al., 2004c; Greenberg et al., 2003), was zu einer direkten Aktivierung von Rho A führt und somit eine gesteigerte Rho-Kinase-vermittelte Kontraktion zur Folge hat. G_q -gekoppelte PAR1-Rezeptoren aktivieren die Phosphoinositolphospholipase C, was über verschiedene Mechanismen zu einem rapiden Anstieg intrazellulärer Ca^{2+} -Spiegel führt (Sandoval et al., 2001). Und G_i -Kopplung resultiert in einer Inaktivierung der Adenylatzyklase und folglich sinkenden cAMP-Spiegeln (Bogatcheva et al., 2002).

Es wurde im Rahmen dieser Untersuchungen gezeigt, dass die Thrombin-vermittelten Effekte mit einer Rac 1-Inaktivierung und einer Rho A-Aktivierung einhergehen. So lagen nach 5 und 15 min und damit zu den Zeitpunkten, an denen eine deutliche Lückenbildung eingetreten war, Rac 1 inaktiviert und Rho A deutlich aktiviert vor. Parallel zu dem transienten Abfall des TER erreichte 60 min nach Zugabe von Thrombin die Aktivität von Rac 1 und Rho A wieder Kontrollniveau.

Die Effekte von Thrombin auf Rho A sind gut untersucht (Essler et al., 1998; Wojciak-Stothard and Ridley, 2002) und konnten innerhalb dieser Untersuchungen auch bestätigt werden. Schon in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass gesteigerte cAMP-Konzentrationen in der Lage sind, die durch Thrombin induzierte Rho A-Aktivierung zu verhindern (Cullere et al., 2005; Fukuhara et al., 2005; Kooistra et al., 2005; Qiao et al., 2003). Derartige Befunde werden durch Untersuchungen bestärkt, die zeigen, dass PKA durch Phosphorylierung von Rho A an Serin¹⁸⁸ die Dissoziation von Rho-GDI hemmt und somit die GTPase in ihrer Aktivität inhibiert (Qiao et al., 2003). Zum anderen wurde für Rap 1 gezeigt, dass es Rho A über die Aktivierung des Rho-GAPs Arap3 inaktivieren kann (Kooistra et al., 2007; Schmidt et al., 2007). Zusammenfassend kann man von diesen

Studien schließen, dass cAMP tatsächlich über Inhibition der Rho A-Aktivierung den Thrombin verursachten Barrierezusammenbruch verhindern könnte. Unser Befund, dass die Hemmung der Rho-Kinase durch Y27632 ebenso effektiv in der Hemmung des Thrombin-induzierten Barrierezusammenbruchs war wie die cAMP-Erhöhung, deutet an, dass die Rho A-Aktivierung in diesem Zusammenhang tatsächlich wichtig ist.



Im Gegensatz zu der Aktivierung von Rho A ist eine Inaktivierung von Rac 1 in manchen Studien gezeigt worden (Birukova et al., 2007a; Vouret-Craviari et al., 2002), in anderen aber nicht (Qiao et al., 2003). Unsere Untersuchungen zeigten eine deutliche Inaktivierung von Rac 1 nach Thrombinzugabe.

Um die Rolle von Rac 1 genauer zu untersuchen, wurde der Rac 1-Inhibitor NSC-23766 zusammen mit F/R oder O-Me-cAMP in der Vorinkubation von Thrombin verwendet. Wir fanden heraus, dass eine Zugabe von Thrombin zu den mit NSC-23766 plus F/R

behandelten Zellen zu einem Barrierezusammenbruch führte. Somit wird deutlich, dass die durch F/R vermittelte Rac 1-unabhängige Barrierestabilisierung nicht ausreichend ist, den durch Thrombin verursachten Barrierezusammenbruch zu verhindern und Rac 1 bei den Thrombin-vermittelten Mechanismen eine entscheidende Rolle spielt. Dennoch beschleunigte die cAMP-Erhöhung unter diesen Bedingungen die Wiederherstellung der Barrierefunktion.

Es ist möglich, dass die Rho A-Aktivierung der Rac 1-Inaktivierung nachgeschaltet ist und Rho-GTPasen somit einer internen Hierarchie unterliegen (Matozaki et al., 2000; Vandenbroucke et al., 2008). Unterstützt wird diese Hypothese auch durch Befunde, die zeigen, dass Rac 1 über PAK 1 das Rho A-GEF NET1 phosphoryliert und somit inhibiert (Alberts et al., 2005). Zahlreiche Studien postulierten bereits den Zusammenhang zwischen Rac 1 und Rho A, in denen eine Balance der jeweiligen Aktivitäten als Voraussetzung einer intakten Endothelbarrierefunktion beschrieben wird (Wojciak-Stothard et al., 2001; Wojciak-Stothard and Ridley, 2002).

5.4. Ausblick

Da viele Studien zur Rolle von Rac 1 nur in vitro durchgeführt wurden, müssten Permeabilitätsmessungen in vivo nach Inhibition von Rac 1 und Rap 1 mit nachfolgender morphologischer Aufbereitung der Gefäßbetten für Immunfluoreszenz- und Elektronenmikroskopie erfolgen.

Zukünftige Untersuchungen sollten weiterhin charakterisieren wie cAMP, Rap 1 und Rac 1 Adhärens- und Occludensjunctionen und weitere Junctionsproteine regulieren. Dabei könnte die Phosphorylierung von VE-Cadherin oder anderer junctionaler Proteine eine Rolle spielen (Kooistra et al., 2007). Es ist folglich von großem Interesse zu untersuchen, ob es durch F/R oder O-Me-cAMP zum Beispiel zu Phosphorylierungen von VE-Cadherin an Tyrosin 685 oder Serin 665 kommt. Ebenso wird eine wesentliche Rolle von p120-Catenin diskutiert (Vandenbroucke et al., 2008). Dabei ist interessant, dass AF6 mit p120-Catenin einen Komplex bilden kann, der die Bindung von p120-Catenin an E-Cadherin steigert und somit die Adhärensjunction stärkt (Hoshino et al., 2005). Ebenso ist AF6 an der Regulation anderer junctionaler Proteine, wie Nektinen oder auch den Occludenskontakten, beteiligt (Mehta and Malik, 2006). Daher müsste auch die Rolle der Nektine für die Endothelbarrierefunktion genauer charakterisiert werden

Das genaue Verständnis der Mechanismen, die bei der Regulation der Endothelbarriere beteiligt sind, kann in der Zukunft die Entwicklung neuer Therapieansätze in der Behandlung vaskulärer Erkrankungen ermöglichen.

6. Literaturverzeichnis

- Adamson, R.H., B. Liu, G.N. Fry, L.L. Rubin, and F.E. Curry. 1998. Microvascular permeability and number of tight junctions are modulated by cAMP. *Am J Physiol.* 274:H1885-94.
- Adamson, R.H., F.E. Curry, G. Adamson, B. Liu, Y. Jiang, K. Aktories, H. Barth, A. Daigeler, N. Golenhofen, W. Ness, and D. Drenckhahn. 2002. Rho and rho kinase modulation of barrier properties: cultured endothelial cells and intact microvessels of rats and mice. *J Physiol.* 539:295-308.
- Adamson, R.H., M. Zeng, G.N. Adamson, J.F. Lenz, and F.E. Curry. 2003. PAF- and bradykinin-induced hyperpermeability of rat venules is independent of actin-myosin contraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285:H406-17.
- Adamson, R.H., J.C. Ly, R.K. Sarai, J.F. Lenz, A. Altangerel, D. Drenckhahn, and F.E. Curry. 2008. Epac/Rap1 pathway regulates microvascular hyperpermeability induced by PAF in rat mesentery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294:H1188-96.
- Aepfelbacher, M., and M. Essler. 2001. Disturbance of endothelial barrier function by bacterial toxins and atherogenic mediators: a role for Rho/Rho kinase. *Cell Microbiol.* 3:649-58.
- Aktories, K., C. Mohr, and G. Koch. 1992. Clostridium botulinum C3 ADP-ribosyltransferase. *Curr Top Microbiol Immunol.* 175:115-31.
- Aktories, K. 1997. Rho proteins: targets for bacterial toxins. *Trends Microbiol.* 5:282-8.
- Aktories, K., G. Schmidt, and I. Just. 2000. Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol Chem.* 381:421-6.
- Alberts, A.S., H. Qin, H.S. Carr, and J.A. Frost. 2005. PAK1 negatively regulates the activity of the Rho exchange factor NET1. *J Biol Chem.* 280:12152-61.
- Amano, M., M. Ito, K. Kimura, Y. Fukata, K. Chihara, T. Nakano, Y. Matsuura, and K. Kaibuchi. 1996. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem.* 271:20246-9.
- Anastasiadis, P.Z., and A.B. Reynolds. 2001. Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Curr Opin Cell Biol.* 13:604-10.
- Angst, B.D., C. Marcozzi, and A.I. Magee. 2001. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci.* 114:629-641.
- Ashkin, A., J.M. Dziedzic, and T. Yamane. 1987. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature.* 330:769-71.
- Aspenstrom, P., A. Fransson, and J. Saras. 2004. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J.* 377:327-37.
- Baumer, Y., S. Burger, F.E. Curry, N. Golenhofen, D. Drenckhahn, and J. Waschke. 2008a. Differential role of Rho GTPases in endothelial barrier regulation dependent on endothelial cell origin. *Histochem Cell Biol.* 129:179-91.
- Baumer, Y., D. Drenckhahn, and J. Waschke. 2008b. cAMP induced Rac 1-mediated cytoskeletal reorganization in microvascular endothelium. *Histochem Cell Biol.* 129:765-778.
- Baumgartner, W., G.J. Schtz, J. Wiegand, N. Golenhofen, and D. Drenckhahn. 2003. Cadherin function probed by laser tweezer and single molecule fluorescence in vascular endothelial cells. *J Cell Sci.* 116:1001-11.
- Bazzoni, G., and E. Dejana. 2004. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev.* 84:869-901.

- Bernards, A. 2003. GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and *Drosophila*. *Biochim Biophys Acta*. 1603:47-82.
- Bershadsky, A. 2004. Magic touch: how does cell-cell adhesion trigger actin assembly? *Trends Cell Biol*. 14:589-93.
- Beyer, E.C., J. Gemel, K.H. Seul, D.M. Larson, K. Banach, and P.R. Brink. 2000. Modulation of intercellular communication by differential regulation and heteromeric mixing of co-expressed connexins. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 33:391-397.
- Birukova, A.A., K.G. Birukov, K. Smurova, D. Adyshev, K. Kaibuchi, I. Alieva, J.G. Garcia, and A.D. Verin. 2004a. Novel role of microtubules in thrombin-induced endothelial barrier dysfunction. *Faseb J*. 18:1879-90.
- Birukova, A.A., F. Liu, J.G. Garcia, and A.D. Verin. 2004b. Protein kinase A attenuates endothelial cell barrier dysfunction induced by microtubule disassembly. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 287:L86-93.
- Birukova, A.A., K. Smurova, K.G. Birukov, K. Kaibuchi, J.G. Garcia, and A.D. Verin. 2004c. Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction. *Microvasc Res*. 67:64-77.
- Birukova, A.A., K. Smurova, K.G. Birukov, P. Usatyuk, F. Liu, K. Kaibuchi, A. Ricks-Cord, V. Natarajan, I. Alieva, J.G. Garcia, and A.D. Verin. 2004d. Microtubule disassembly induces cytoskeletal remodeling and lung vascular barrier dysfunction: role of Rho-dependent mechanisms. *J Cell Physiol*. 201:55-70.
- Birukova, A.A., K.G. Birukov, B. Gorshkov, F. Liu, J.G. Garcia, and A.D. Verin. 2005. MAP kinases in lung endothelial permeability induced by microtubule disassembly. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 289:L75-84.
- Birukova, A.A., E. Alekseeva, A. Mikaelyan, and K.G. Birukov. 2007a. HGF attenuates thrombin-induced endothelial permeability by Tiam1-mediated activation of the Rac pathway and by Tiam1/Rac-dependent inhibition of the Rho pathway. *Faseb J*. 21:2776-86.
- Birukova, A.A., T. Zagranichnaya, P. Fu, E. Alekseeva, W. Chen, J.R. Jacobson, and K.G. Birukov. 2007b. Prostaglandins PGE(2) and PGI(2) promote endothelial barrier enhancement via PKA- and Epac1/Rap1-dependent Rac activation. *Exp Cell Res*. 313:2504-20.
- Birukova, A.A., T. Zagranichnaya, E. Alekseeva, G.M. Bokoch, and K.G. Birukov. 2008. Epac/Rap and PKA are novel mechanisms of ANP-induced Rac-mediated pulmonary endothelial barrier protection. *J Cell Physiol*. 215:715-24.
- Blum, M.S., E. Toninelli, J.M. Anderson, M.S. Balda, J. Zhou, L. O'Donnell, R. Pardi, and J.R. Bender. 1997. Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines. *Am J Physiol*. 273:H286-94.
- Blume, C., P.M. Benz, U. Walter, J. Ha, B.E. Kemp, and T. Renn. 2007. AMP-activated Protein Kinase Impairs Endothelial Actin Cytoskeleton Assembly by Phosphorylating Vasodilator-stimulated Phosphoprotein. *J Biol Chem*. 282:4601-4612.
- Bobak, D.A. 1999. Clostridial toxins: molecular probes of Rho-dependent signaling and apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 193:37-42.
- Bogatcheva, N.V., J.G. Garcia, and A.D. Verin. 2002. Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochemistry (Mosc)*. 67:75-84.
- Bokoch, G.M., and C.J. Der. 1993. Emerging concepts in the Ras superfamily of GTP-binding proteins. *Faseb J*. 7:750-9.
- Boquet, P. 2001. The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*. *Toxicon*. 39:1673-80.

- Bos, J.L. 2005. Linking Rap to cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* 17:123-8.
- Bourne, H.R., D.A. Sanders, and F. McCormick. 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature.* 349:117-27.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Braga, V.M., L.M. Machesky, A. Hall, and N.A. Hotchin. 1997. The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol.* 137:1421-31.
- Braga, V.M., A. Del Maschio, L. Machesky, and E. Dejana. 1999. Regulation of cadherin function by Rho and Rac: modulation by junction maturation and cellular context. *Mol Biol Cell.* 10:9-22.
- Briggs, M.W., and D.B. Sacks. 2003. IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO Rep.* 4:571-4.
- Broman, M.T., P. Kouklis, X. Gao, R. Ramchandran, R.F. Neamu, R.D. Minshall, and A.B. Malik. 2006. Cdc42 regulates adherens junction stability and endothelial permeability by inducing alpha-catenin interaction with the vascular endothelial cadherin complex. *Circ Res.* 98:73-80.
- Broman, M.T., D. Mehta, and A.B. Malik. 2007. Cdc42 regulates the restoration of endothelial adherens junctions and permeability. *Trends Cardiovasc Med.* 17:151-6.
- Brugnera, E., L. Haney, C. Grimsley, M. Lu, S.F. Walk, A.C. Tosello-Trampont, I.G. Macara, H. Madhani, G.R. Fink, and K.S. Ravichandran. 2002. Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol.* 4:574-82.
- Bustelo, X.R., V. Sauzeau, and I.M. Berenjano. 2007. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays.* 29:356-70.
- Carbajal, J.M., and R.C. Schaeffer, Jr. 1999. RhoA inactivation enhances endothelial barrier function. *Am J Physiol.* 277:C955-64.
- Carmeliet, P., M.G. Lampugnani, L. Moons, F. Breviario, V. Compernelle, F. Bono, G. Balconi, R. Spagnuolo, B. Oostuyse, M. Dewerchin, A. Zanetti, A. Angellilo, V. Mattot, D. Nuyens, E. Lutgens, F. Clotman, M.C. de Ruiter, A. Gittenberger-de Groot, R. Poelmann, F. Lupu, J.M. Herbert, D. Collen, and E. Dejana. 1999. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell.* 98:147-57.
- Chaves-Olarte, E., I. Florin, P. Boquet, M. Popoff, C. von Eichel-Streiber, and M. Thelestam. 1996. UDP-glucose deficiency in a mutant cell line protects against glucosyltransferase toxins from *Clostridium difficile* and *Clostridium sordellii*. *J Biol Chem.* 271:6925-32.
- Chaves-Olarte, E., M. Weidmann, C. Eichel-Streiber, and M. Thelestam. 1997. Toxins A and B from *Clostridium difficile* differ with respect to enzymatic potencies, cellular substrate specificities, and surface binding to cultured cells. *J Clin Invest.* 100:1734-41.
- Chaves-Olarte, E., P. Low, E. Freer, T. Norlin, M. Weidmann, C. von Eichel-Streiber, and M. Thelestam. 1999. A novel cytotoxin from *Clostridium difficile* serogroup F is a functional hybrid between two other large clostridial cytotoxins. *J Biol Chem.* 274:11046-52.
- Chong, L.D., A. Traynor-Kaplan, G.M. Bokoch, and M.A. Schwartz. 1994. The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell.* 79:507-13.

- Christensen, A.E., F. Selheim, J. de Rooij, S. Dremier, F. Schwede, K.K. Dao, A. Martinez, C. Maenhaut, J.L. Bos, H.G. Genieser, and S.O. Doskeland. 2003. cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. *J Biol Chem.* 278:35394-402.
- Chuang, T.H., X. Xu, U.G. Knaus, M.J. Hart, and G.M. Bokoch. 1993. GDP dissociation inhibitor prevents intrinsic and GTPase activating protein-stimulated GTP hydrolysis by the Rac GTP-binding protein. *J Biol Chem.* 268:775-8.
- Cioffi, D.L., T.M. Moore, J. Schaack, J.R. Creighton, D.M.F. Cooper, and T. Stevens. 2002. Dominant regulation of interendothelial cell gap formation by calcium-inhibited type 6 adenylyl cyclase. Vol. 157. 1267-1278.
- Comerford, K.M., D.W. Lawrence, K. Synnestvedt, B.P. Levi, and S.P. Colgan. 2002. Role of vasodilator-stimulated phosphoprotein in PKA-induced changes in endothelial junctional permeability. *FASEB J.* 16:583-585.
- Corada, M., M. Mariotti, G. Thurston, K. Smith, R. Kunkel, M. Brockhaus, M.G. Lampugnani, I. Martin-Padura, A. Stoppacciaro, L. Ruco, D.M. McDonald, P.A. Ward, and E. Dejana. 1999. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:9815-20.
- Corada, M., F. Liao, M. Lindgren, M.G. Lampugnani, F. Breviario, R. Frank, W.A. Muller, D.J. Hicklin, P. Bohlen, and E. Dejana. 2001. Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability. *Blood.* 97:1679-84.
- Cote, J.F., and K. Vuori. 2007. GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways. *Trends Cell Biol.* 17:383-93.
- Cullere, X., S.K. Shaw, L. Andersson, J. Hirahashi, F.W. Luscinskas, and T.N. Mayadas. 2005. Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase. *Blood.* 105:1950-5.
- Daly, R.J. 2004. Cortactin signalling and dynamic actin networks. *Biochem J.* 382:13-25.
- de Rooij, J., F.J.T. Zwartkruis, M.H.G. Verheijen, R.H. Cool, S.M.B. Nijman, A. Wittinghofer, and J.L. Bos. 1998. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature.* 396:474-477.
- Debrececi, B., Y. Gao, F. Guo, K. Zhu, B. Jia, and Y. Zheng. 2004. Mechanisms of guanine nucleotide exchange and Rac-mediated signaling revealed by a dominant negative trio mutant. *J Biol Chem.* 279:3777-86.
- Dejana, E., M. Corada, and M.G. Lampugnani. 1995. Endothelial cell-to-cell junctions. *Faseb J.* 9:910-8.
- Dejana, E., G. Bazzoni, and M.G. Lampugnani. 1999. Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Exp Cell Res.* 252:13-9.
- Dejana, E. 2004. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:261-70.
- Dormond, O., and C. Ruegg. 2003. Regulation of endothelial cell integrin function and angiogenesis by COX-2, cAMP and Protein Kinase A. *Thromb Haemost.* 90:577-85.
- Drees, F., S. Pokutta, S. Yamada, W.J. Nelson, and W.I. Weis. 2005. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell.* 123:903-15.
- Drenckhahn, D. 2003. Zellenlehre. In Benninghoff-Drenckhahn Anatomie Band 1, Urban & Fischer, München/Jena, 16. Auflage.

- Drenckhahn D, N.W. 1997. The endothelial contractile cytoskeleton. In *Vascular Endothelium: Physiology, Pathology, and Therapeutic Opportunities*, G.V.R. Born/C.J. Schwarz, Eds., Schattauer, Stuttgart, New Horizon Series 3:1-25.
- Dudek, S.M., and J.G. Garcia. 2001. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol.* 91:1487-500.
- Ebnet, K. 2008. Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions. *Histochemistry and Cell Biology.* 130:1-20.
- Eisenmann, D.M. 2005. Wnt signaling. *WormBook*:1-17.
- Ellerbroek, S.M., K. Wennerberg, and K. Burridge. 2003. Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo. *J Biol Chem.* 278:19023-31.
- Ellis, R.W., D. Defeo, T.Y. Shih, M.A. Gonda, H.A. Young, N. Tsuchida, D.R. Lowy, and E.M. Scolnick. 1981. The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes. *Nature.* 292:506-11.
- Erez, N., A. Bershadsky, and B. Geiger. 2005. Signaling from adherens-type junctions. *Eur J Cell Biol.* 84:235-44.
- Essler, M., M. Amano, H.-J. Kruse, K. Kaibuchi, P.C. Weber, and M. Aepfelbacher. 1998. Thrombin Inactivates Myosin Light Chain Phosphatase via Rho and Its Target Rho Kinase in Human Endothelial Cells. Vol. 273. 21867-21874.
- Förster, C. 2008. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol.*
- Foster, R., K.Q. Hu, Y. Lu, K.M. Nolan, J. Thissen, and J. Settleman. 1996. Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. *Mol Cell Biol.* 16:2689-99.
- Fransson, A., A. Ruusala, and P. Aspenstrom. 2003. Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. *J Biol Chem.* 278:6495-502.
- Fukuhara, A., K. Shimizu, T. Kawakatsu, T. Fukuhara, and Y. Takai. 2003. Involvement of nectin-activated Cdc42 small G protein in organization of adherens and tight junctions in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem.* 278:51885-93.
- Fukuhara, S., A. Sakurai, H. Sano, A. Yamagishi, S. Somekawa, N. Takakura, Y. Saito, K. Kangawa, and N. Mochizuki. 2005. Cyclic AMP Potentiates Vascular Endothelial Cadherin-Mediated Cell-Cell Contact To Enhance Endothelial Barrier Function through an Epac-Rap1 Signaling Pathway. Vol. 25. 136-146.
- Fukuhara, T., K. Shimizu, T. Kawakatsu, T. Fukuyama, Y. Minami, T. Honda, T. Hoshino, T. Yamada, H. Ogita, M. Okada, and Y. Takai. 2004. Activation of Cdc42 by trans interactions of the cell adhesion molecules nectins through c-Src and Cdc42-GEF FRG. *J Cell Biol.* 166:393-405.
- Fukuyama, T., H. Ogita, T. Kawakatsu, T. Fukuhara, T. Yamada, T. Sato, K. Shimizu, T. Nakamura, M. Matsuda, and Y. Takai. 2005a. Involvement of the c-Src-Crk-C3G-Rap1 Signaling in the Nectin-induced Activation of Cdc42 and Formation of Adherens Junctions. Vol. 280. 815-825.
- Fukuyama, T., H. Ogita, T. Kawakatsu, M. Inagaki, and Y. Takai. 2005b. Activation of Rac by cadherin through the c-Src-Rap1-phosphatidylinositol 3-kinase-Vav2 pathway. *Oncogene.* 25:8-19.
- Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita, and S. Tsukita. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol.* 123:1777-88.
- Furuse, M., M. Hata, K. Furuse, Y. Yoshida, A. Haratake, Y. Sugitani, T. Noda, A. Kubo, and S. Tsukita. 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. Vol. 156. 1099-1111.

- Gallagher, P.J., B.P. Herring, and J.T. Stull. 1997. Myosin light chain kinases. *J Muscle Res Cell Motil.* 18:1-16.
- Gao, Y., J. Xing, M. Streuli, T.L. Leto, and Y. Zheng. 2001. Trp(56) of rac1 specifies interaction with a subset of guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem.* 276:47530-41.
- Gao, Y., J.B. Dickerson, F. Guo, J. Zheng, and Y. Zheng. 2004. Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:7618-23.
- Garavini, H., K. Riento, J.P. Phelan, M.S. McAlister, A.J. Ridley, and N.H. Keep. 2002. Crystal structure of the core domain of RhoE/Rnd3: a constitutively activated small G protein. *Biochemistry.* 41:6303-10.
- Garcia, J.G., H.W. Davis, and C.E. Patterson. 1995. Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell Physiol.* 163:510-22.
- Garcia, J.G., V. Lazar, L.I. Gilbert-McClain, P.J. Gallagher, and A.D. Verin. 1997. Myosin light chain kinase in endothelium: molecular cloning and regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 16:489-94.
- Garcia, J.G., F. Liu, A.D. Verin, A. Birukova, M.A. Dechert, W.T. Gerthoffer, J.R. Bamberg, and D. English. 2001. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest.* 108:689-701.
- Gates, J., and M. Peifer. 2005. Can 1000 reviews be wrong? Actin, alpha-Catenin, and adherens junctions. *Cell.* 123:769-72.
- Gopalakrishnan, S., K.W. Dunn, and J.A. Marris. 2002. Rac1, but not RhoA, signaling protects epithelial adherens junction assembly during ATP depletion. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283:C261-72.
- Gotsch, U., E. Borges, R. Bosse, E. Bggemeyer, M. Simon, H. Mossmann, and D. Vestweber. 1997. VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci.* 110 (Pt 5):583-588.
- Graesser, D., A. Solowiej, M. Bruckner, E. Osterweil, A. Juedes, S. Davis, N.H. Ruddle, B. Engelhardt, and J.A. Madri. 2002. Altered vascular permeability and early onset of experimental autoimmune encephalomyelitis in PECAM-1-deficient mice. *J Clin Invest.* 109:383-92.
- Greenberg, D.L., G.J. Mize, and T.K. Takayama. 2003. Protease-activated receptor mediated RhoA signaling and cytoskeletal reorganization in LNCaP cells. *Biochemistry.* 42:702-9.
- Grosheva, I., M. Shtutman, M. Elbaum, and A.D. Bershadsky. 2001. p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *J Cell Sci.* 114:695-707.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 260:3440-50.
- Gulino, D., E. Delachanal, E. Concord, Y. Genoux, B. Morand, M.O. Valiron, E. Sulpice, R. Scaife, M. Alemany, and T. Vernet. 1998. Alteration of endothelial cell monolayer integrity triggers resynthesis of vascular endothelium cadherin. *J Biol Chem.* 273:29786-93.
- Habets, G.G., E.H. Scholtes, D. Zuydgeest, R.A. van der Kammen, J.C. Stam, A. Berns, and J.G. Collard. 1994. Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. *Cell.* 77:537-49.

- Halbrugge, M., C. Friedrich, M. Eigenthaler, P. Schanzenbacher, and U. Walter. 1990. Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. Vol. 265. 3088-3093.
- Hall, A. 2005. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans.* 33:891-5.
- Harbeck, B., S. Httelmaier, K. Schluter, B.M. Jockusch, and S. Illenberger. 2000. Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J Biol Chem.* 275:30817-30825.
- Hart, M.J., Y. Maru, D. Leonard, O.N. Witte, T. Evans, and R.A. Cerione. 1992. A GDP dissociation inhibitor that serves as a GTPase inhibitor for the Ras-like protein CDC42Hs. *Science.* 258:812-5.
- Hartmann, C., A. Zozulya, J. Wegener, and H.-J. Galla. 2007. The impact of glia-derived extracellular matrices on the barrier function of cerebral endothelial cells: An in vitro study. *Experimental Cell Research.* 313:1318-1325.
- Haselton, F.R., E. Dworska, S.S. Evans, L.H. Hoffman, and J.S. Alexander. 1996. Modulation of retinal endothelial barrier in an in vitro model of the retinal microvasculature. *Exp Eye Res.* 63:211-22.
- Hastie, L.E., W.F. Patton, H.B. Hechtman, and D. Shepro. 1997. H₂O₂-induced filamin redistribution in endothelial cells is modulated by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *J Cell Physiol.* 172:373-81.
- Hippenstiel, S., S. Tannert-Otto, N. Vollrath, M. Krull, I. Just, K. Aktories, C. von Eichel-Streiber, and N. Suttorp. 1997. Glucosylation of small GTP-binding Rho proteins disrupts endothelial barrier function. *Am J Physiol.* 272:L38-43.
- Hirano, K., N. Nomoto, M. Hirano, F. Momota, A. Hanada, and H. Kanaide. 2007. Distinct Ca²⁺ requirement for NO production between proteinase-activated receptor 1 and 4 (PAR1 and PAR4) in vascular endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 322:668-77.
- Hirano, S., A. Nose, K. Hatta, A. Kawakami, and M. Takeichi. 1987. Calcium-dependent cell-cell adhesion molecules (cadherins): subclass specificities and possible involvement of actin bundles. *J Cell Biol.* 105:2501-10.
- Hirata, K., T. Ishida, K. Penta, M. Rezaee, E. Yang, J. Wohlgemuth, and T. Quertermous. 2001. Cloning of an immunoglobulin family adhesion molecule selectively expressed by endothelial cells. *J Biol Chem.* 276:16223-31.
- Hoffmann, C., M. Pop, J. Leemhuis, J. Schirmer, K. Aktories, and G. Schmidt. 2004. The *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxic necrotizing factor (CNFY) selectively activates RhoA. *J Biol Chem.* 279:16026-32.
- Hogan, C., N. Serpente, P. Cogram, C.R. Hosking, C.U. Bialucha, S.M. Feller, V.M.M. Braga, W. Birchmeier, and Y. Fujita. 2004. Rap1 Regulates the Formation of E-Cadherin-Based Cell-Cell Contacts. Vol. 24. 6690-6700.
- Holz, G.G., G. Kang, M. Harbeck, M.W. Roe, and O.G. Chepurny. 2006. Cell physiology of cAMP sensor Epac. Vol. 577. 5-15.
- Homma, Y., and Y. Emori. 1995. A dual functional signal mediator showing RhoGAP and phospholipase C-delta stimulating activities. *Embo J.* 14:286-91.
- Honda, T., K. Shimizu, T. Kawakatsu, A. Fukuhara, K. Irie, T. Nakamura, M. Matsuda, and Y. Takai. 2003. Cdc42 and Rac small G proteins activated by trans-interactions of nectins are involved in activation of c-Jun N-terminal kinase, but not in association of nectins and cadherin to form adherens junctions, in fibroblasts. *Genes Cells.* 8:481-91.

- Hoshino, T., T. Sakisaka, T. Baba, T. Yamada, T. Kimura, and Y. Takai. 2005. Regulation of E-cadherin endocytosis by nectin through afadin, Rap1, and p120ctn. *J Biol Chem.* 280:24095-103.
- Ichii, T., and M. Takeichi. 2007. p120-catenin regulates microtubule dynamics and cell migration in a cadherin-independent manner. *Genes Cells.* 12:827-39.
- Ishida, T., R.K. Kundu, E. Yang, K. Hirata, Y.D. Ho, and T. Quertermous. 2003. Targeted disruption of endothelial cell-selective adhesion molecule inhibits angiogenic processes in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 278:34598-604.
- Jacobson, J.R., S.M. Dudek, P.A. Singleton, I.A. Kolosova, A.D. Verin, and J.G.N. Garcia. 2006. Endothelial cell barrier enhancement by ATP is mediated by the small GTPase Rac and cortactin. Vol. 291. L289-295.
- Jaffe, A.B., and A. Hall. 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:247-69.
- Jeong, H.-W., Z. Li, M.D. Brown, and D.B. Sacks. 2007. IQGAP1 Binds Rap1 and Modulates Its Activity. Vol. 282. 20752-20762.
- Johnson, P.H., and L.I. Grossman. 1977. Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double- and single-stranded DNAs. *Biochemistry.* 16:4217-25.
- Kawakatsu, T., H. Ogita, T. Fukuhara, T. Fukuyama, Y. Minami, K. Shimizu, and Y. Takai. 2005. Vav2 as a Rac-GDP/GTP exchange factor responsible for the nectin-induced, c-Src- and Cdc42-mediated activation of Rac. *J Biol Chem.* 280:4940-7.
- Kikuchi, A., S. Kuroda, T. Sasaki, K. Kotani, K. Hirata, M. Katayama, and Y. Takai. 1992. Functional interactions of stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins and their common substrate small GTP-binding protein. *J Biol Chem.* 267:14611-5.
- Kim, J.A., M. Montagnani, K.K. Koh, and M.J. Quon. 2006. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation.* 113:1888-904.
- Kitayama, H., Y. Sugimoto, T. Matsuzaki, Y. Ikawa, and M. Noda. 1989. A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell.* 56:77-84.
- Knox, A.L., and N.H. Brown. 2002. Rap1 GTPase regulation of adherens junction positioning and cell adhesion. *Science.* 295:1285-8.
- Kooistra, M.R., N. Dube, and J.L. Bos. 2007. Rap1: a key regulator in cell-cell junction formation. *J Cell Sci.* 120:17-22.
- Kooistra, M.R.H., M. Corada, E. Dejana, and J.L. Bos. 2005. Epac1 regulates integrity of endothelial cell junctions through VE-cadherin. *FEBS Letters.* 579:4966-4972.
- Kouklis, P., M. Konstantoulaki, S. Vogel, M. Broman, and A.B. Malik. 2004. Cdc42 regulates the restoration of endothelial barrier function. *Circ Res.* 94:159-66.
- Krogh, A., E.M. Landis, and A.H. Turner. 1932. The Movement of Fluid through the Human Capillary Wall in Relation to Venous Pressure and to the Colloid Osmotic Pressure of the Blood. *J Clin Invest.* 11:63-95.
- Krugmann, S., R. Williams, L. Stephens, and P.T. Hawkins. 2004. ARAP3 Is a PI3K- and Rap-Regulated GAP for RhoA. *Current Biology.* 14:1380-1384.
- Kuroda, S., M. Fukata, K. Kobayashi, M. Nakafuku, N. Nomura, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1996. Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, Cdc42 and Rac1. *J Biol Chem.* 271:23363-7.
- Kyhse-Andersen, J. 1984. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods.* 10:203-9.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.

- Lafuente, E.M., A.A.F.L. van Puijenbroek, M. Krause, C.V. Carman, G.J. Freeman, A. Berezovskaya, E. Constantine, T.A. Springer, F.B. Gertler, and V.A. Boussiotis. 2004. RIAM, an Ena/VASP and Profilin Ligand, Interacts with Rap1-GTP and Mediates Rap1-Induced Adhesion. *Developmental Cell*. 7:585-595.
- Lampugnani, M.G., M. Corada, P. Andriopoulou, S. Esser, W. Risau, and E. Dejana. 1997. Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells. *J Cell Sci*. 110 (Pt 17):2065-77.
- Lampugnani, M.G., and E. Dejana. 1997. Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Curr Opin Cell Biol*. 9:674-82.
- Lee, J.-F., Q. Zeng, H. Ozaki, L. Wang, A.R. Hand, T. Hla, E. Wang, and M.-J. Lee. 2006. Dual Roles of Tight Junction-associated Protein, Zonula Occludens-1, in Sphingosine 1-Phosphate-mediated Endothelial Chemotaxis and Barrier Integrity. Vol. 281. 29190-29200.
- Leung, T., E. Manser, L. Tan, and L. Lim. 1995. A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem*. 270:29051-4.
- Li, R., B. Debreceni, B. Jia, Y. Gao, G. Tigyi, and Y. Zheng. 1999. Localization of the PAK1-, WASP-, and IQGAP1-specifying regions of Cdc42. *J Biol Chem*. 274:29648-54.
- Libby, P., M. Aikawa, and M.K. Jain. 2006. Vascular endothelium and atherosclerosis. *Handb Exp Pharmacol*:285-306.
- Lockman, H.A., R.A. Gillespie, B.D. Baker, and E. Shakhnovich. 2002. Yersinia pseudotuberculosis produces a cytotoxic necrotizing factor. *Infect Immun*. 70:2708-14.
- Loirand, G., P. Gurin, and P. Pacaud. 2006. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res*. 98:322-334.
- Lorenowicz, M.J., M. Fernandez-Borja, and P.L. Hordijk. 2007. cAMP Signaling in Leukocyte Transendothelial Migration. Vol. 27. 1014-1022.
- Lorenowicz, M.J., M. Fernandez-Borja, M.R.H. Kooistra, J.L. Bos, and P.L. Hordijk. 2008. PKA and Epac1 regulate endothelial integrity and migration through parallel and independent pathways. *European Journal of Cell Biology*. In Press, Corrected Proof.
- Lozano, E., M.A.M. Frasa, K. Smolarczyk, U.G. Knaus, and V.M.M. Braga. 2008. PAK is required for the disruption of E-cadherin adhesion by the small GTPase Rac. Vol. 121. 933-938.
- Lundquist, E.A. 2006. Small GTPases. *WormBook*:1-18.
- Madaule, P., and R. Axel. 1985. A novel ras-related gene family. *Cell*. 41:31-40.
- Maillet, M., S.J. Robert, M. Cacquevel, M. Gastineau, D. Vivien, J. Bertoglio, J.L. Zugaza, R. Fischmeister, and F. Lezoualc'h. 2003. Crosstalk between Rap1 and Rac regulates secretion of sAPP[alpha]. *Nat Cell Biol*. 5:633-639.
- Malik, A.B., S.K. Lo, and R. Bizios. 1986. Thrombin-induced alterations in endothelial permeability. *Ann N Y Acad Sci*. 485:293-309.
- Malliri, A., S. van Es, S. Huveneers, and J.G. Collard. 2004. The Rac exchange factor Tiam1 is required for the establishment and maintenance of cadherin-based adhesions. *J Biol Chem*. 279:30092-8.
- Matozaki, T., H. Nakanishi, and Y. Takai. 2000. Small G-protein networks: their crosstalk and signal cascades. *Cell Signal*. 12:515-24.
- Matsui, T., M. Amano, T. Yamamoto, K. Chihara, M. Nakafuku, M. Ito, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1996. Rho-associated kinase, a novel

- serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *Embo J.* 15:2208-16.
- Mehta, D., and A.B. Malik. 2006. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev.* 86:279-367.
- Mertens, A.E., T.P. Rygiel, C. Olivo, R. van der Kammen, and J.G. Collard. 2005. The Rac activator Tiam1 controls tight junction biogenesis in keratinocytes through binding to and activation of the Par polarity complex. *J Cell Biol.* 170:1029-37.
- Michel, C.C., and F.E. Curry. 1999. Microvascular permeability. *Physiol Rev.* 79:703-61.
- Miki, H., H. Yamaguchi, S. Suetsugu, and T. Takenawa. 2000. IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature.* 408:732-5.
- Miyoshi, J., and Y. Takai. 2005. Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. *Adv Drug Deliv Rev.* 57:815-55.
- Moerenhout, M., B. Himpens, and J. Vereecke. 2001. Intercellular communication upon mechanical stimulation of CPAE- endothelial cells is mediated by nucleotides. *Cell Calcium.* 29:125-136.
- Muller, R.T., U. Honnert, J. Reinhard, and M. Bahler. 1997. The rat myosin myr 5 is a GTPase-activating protein for Rho in vivo: essential role of arginine 1695. *Mol Biol Cell.* 8:2039-53.
- Narumiya, S., T. Ishizaki, and N. Watanabe. 1997. Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett.* 410:68-72.
- Nasdala, I., K. Wolburg-Buchholz, H. Wolburg, A. Kuhn, K. Ebnet, G. Brachtendorf, U. Samulowitz, B. Kuster, B. Engelhardt, D. Vestweber, and S. Butz. 2002. A transmembrane tight junction protein selectively expressed on endothelial cells and platelets. *J Biol Chem.* 277:16294-303.
- Navarro, P., L. Caveda, F. Breviario, I. Mndoteanu, M.G. Lampugnani, and E. Dejana. 1995. Catenin-dependent and -independent functions of vascular endothelial cadherin. *J Biol Chem.* 270:30965-30972.
- Nishikawa, M., P. de Lanerolle, T.M. Lincoln, and R.S. Adelstein. 1984. Phosphorylation of mammalian myosin light chain kinases by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase and by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 259:8429-36.
- Nitta, T., M. Hata, S. Gotoh, Y. Seo, H. Sasaki, N. Hashimoto, M. Furuse, and S. Tsukita. 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol.* 161:653-60.
- Nobes, C.D., and A. Hall. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 81:53-62.
- Nobes, C.D., and A. Hall. 1999. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol.* 144:1235-44.
- Noren, N.K., B.P. Liu, K. Burrige, and B. Kreft. 2000. p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol.* 150:567-80.
- Nusrat, A., M. Giry, J.R. Turner, S.P. Colgan, C.A. Parkos, D. Carnes, E. Lemichez, P. Boquet, and J.L. Madara. 1995. Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:10629-33.
- Obaishi, H., H. Nakanishi, K. Mandai, K. Satoh, A. Satoh, K. Takahashi, M. Miyahara, H. Nishioka, K. Takaishi, and Y. Takai. 1998. Frabin, a novel FGD1-related actin filament-binding protein capable of changing cell shape and activating c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem.* 273:18697-700.

- Patterson, C.E., H. Lum, K.L. Schaphorst, A.D. Verin, and J.G. Garcia. 2000. Regulation of endothelial barrier function by the cAMP-dependent protein kinase. *Endothelium*. 7:287-308.
- Perez-Moreno, M., M.A. Davis, E. Wong, H.A. Pasolli, A.B. Reynolds, and E. Fuchs. 2006. p120-catenin mediates inflammatory responses in the skin. *Cell*. 124:631-44.
- Persidsky, Y., D. Heilman, J. Haorah, M. Zelivyanskaya, R. Persidsky, G.A. Weber, H. Shimokawa, K. Kaibuchi, and T. Ikezu. 2006. Rho-mediated regulation of tight junctions during monocyte migration across the blood-brain barrier in HIV-1 encephalitis (HIVE). *Blood*. 107:4770-80.
- Popoff, M.R., E. Chaves-Olarte, E. Lemichez, C. von Eichel-Streiber, M. Thelestam, P. Chardin, D. Cussac, B. Antonny, P. Chavrier, G. Flatau, M. Giry, J. de Gunzburg, and P. Boquet. 1996. Ras, Rap, and Rac small GTP-binding proteins are targets for *Clostridium sordellii* lethal toxin glucosylation. *J Biol Chem*. 271:10217-24.
- Price, L.S., A. Hajdo-Milasinovic, J. Zhao, F.J. Zwartkruis, J.G. Collard, and J.L. Bos. 2004. Rap1 regulates E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *J Biol Chem*. 279:35127-32.
- Qiao, J., F. Huang, and H. Lum. 2003. PKA inhibits RhoA activation: a protection mechanism against endothelial barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 284:L972-80.
- Retta, S.F., F. Balzac, and M. Avolio. 2006. Rap1: a turnabout for the crosstalk between cadherins and integrins. *Eur J Cell Biol*. 85:283-93.
- Reynolds, A.B. 2007. p120-catenin: Past and present. *Biochim Biophys Acta*. 1773:2-7.
- Ridley, A.J., H.F. Paterson, C.L. Johnston, D. Diekmann, and A. Hall. 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*. 70:401-10.
- Ridley, A.J. 2001a. Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic*. 2:303-10.
- Ridley, A.J. 2001b. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci*. 114:2713-22.
- Rivero, F., H. Dislich, G. Glockner, and A.A. Noegel. 2001. The Dictyostelium discoideum family of Rho-related proteins. *Nucleic Acids Res*. 29:1068-79.
- Rosenberger, P., J. Khoury, T. Kong, T. Weissmuller, A.M. Robinson, and S.P. Colgan. 2007. Identification of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) as an HIF-regulated tissue permeability factor during hypoxia. Vol. 21. 2613-2621.
- Rossman, K.L., C.J. Der, and J. Sondek. 2005. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:167-80.
- Sakisaka, T., W. Ikeda, H. Ogita, N. Fujita, and Y. Takai. 2007. The roles of nectins in cell adhesions: cooperation with other cell adhesion molecules and growth factor receptors. *Curr Opin Cell Biol*. 19:593-602.
- Sandoval, R., A.B. Malik, T. Naqvi, D. Mehta, and C. Tiruppathi. 2001. Requirement for Ca²⁺ signaling in the mechanism of thrombin-induced increase in endothelial permeability. Vol. 280. L239-247.
- Schlegel, N., S. Burger, N. Golenhofen, U. Walter, D. Drenckhahn, and J. Waschke. 2007. The role of VASP in the regulation of cAMP- and Rac 1-mediated endothelial barrier stabilization. 00273.2007.
- Schmidt, G., P. Sehr, M. Wilm, J. Selzer, M. Mann, and K. Aktories. 1997. Gln 63 of Rho is deamidated by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature*. 387:725-729.
- Schmidt, G., J. Selzer, M. Lerm, and K. Aktories. 1998. The Rho-deamidating cytotoxic necrotizing factor 1 from Escherichia coli possesses transglutaminase activity.

- Cysteine 866 and histidine 881 are essential for enzyme activity. *J Biol Chem.* 273:13669-13674.
- Schmidt, M., C. Sand, K.H. Jakobs, M.C. Michel, and P.A. Weernink. 2007. Epac and the cardiovascular system. *Curr Opin Pharmacol.* 7:193-200.
- Schnittler, H.J., A. Wilke, T. Gress, N. Suttorp, and D. Drenckhahn. 1990. Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium. *J Physiol.* 431:379-401.
- Schwamborn, J.C., and A.W. Puschel. 2004. The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat Neurosci.* 7:923-929.
- Sehrawat, S., X. Cullere, S. Patel, J. Italiano, Jr., and T.N. Mayadas. 2008. Role of epac1, an exchange factor for rap GTPases, in endothelial microtubule dynamics and barrier function. *Mol Biol Cell.* 19:1261-70.
- Sekimata, M., Y. Kabuyama, Y. Emori, and Y. Homma. 1999. Morphological changes and detachment of adherent cells induced by p122, a GTPase-activating protein for Rho. *J Biol Chem.* 274:17757-62.
- Sheetz, M.P. 1998. Laser tweezers in cell biology. Introduction. *Methods Cell Biol.* 55:xi-xii.
- Simon, A.M., and A.R. McWhorter. 2002. Vascular Abnormalities in Mice Lacking the Endothelial Gap Junction Proteins connexin37 and connexin40. *Developmental Biology.* 251:206-220.
- Smith, G.R., S.A. Givan, P. Cullen, and G.F. Sprague, Jr. 2002. GTPase-activating proteins for Cdc42. *Eukaryot Cell.* 1:469-80.
- Sorokina, E.M., and J. Chernoff. 2005. Rho-GTPases: new members, new pathways. *J Cell Biochem.* 94:225-31.
- Stelzner, T.J., J.V. Weil, and R.F. O'Brien. 1989. Role of cyclic adenosine monophosphate in the induction of endothelial barrier properties. *J Cell Physiol.* 139:157-66.
- Sun, H., J.W. Breslin, J. Zhu, S.Y. Yuan, and M.H. Wu. 2006. Rho and ROCK signaling in VEGF-induced microvascular endothelial hyperpermeability. *Microcirculation.* 13:237-47.
- Takahashi, K., H. Nakanishi, M. Miyahara, K. Mandai, K. Satoh, A. Satoh, H. Nishioka, J. Aoki, A. Nomoto, A. Mizoguchi, and Y. Takai. 1999. Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein. *J Cell Biol.* 145:539-49.
- Takai, Y., K. Kaibuchi, A. Kikuchi, T. Sasaki, and H. Shirataki. 1993. Regulators of small GTPases. *Ciba Found Symp.* 176:128-38; discussion 138-46.
- Takai, Y., T. Sasaki, and T. Matozaki. 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* 81:153-208.
- Takeichi, M. 1988. Cadherins: key molecules for selective cell-cell adhesion. *IARC Sci Publ.* 76-9.
- Tiruppathi, C., A.B. Malik, P.J. Del Vecchio, C.R. Keese, and I. Giaever. 1992. Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: assessment of endothelial barrier function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:7919-23.
- Trahey, M., and F. McCormick. 1987. A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science.* 238:542-5.
- van Horck, F.P., M.R. Ahmadian, L.C. Haeusler, W.H. Moolenaar, and O. Kranenburg. 2001. Characterization of p190RhoGEF, a RhoA-specific guanine nucleotide exchange factor that interacts with microtubules. *J Biol Chem.* 276:4948-56.

- van Nieuw Amerongen, G.P., and V.W.M. van Hinsbergh. 2002. Targets for pharmacological intervention of endothelial hyperpermeability and barrier function. *Vascular Pharmacology*. 39:257-272.
- van Rijen, H., M.J. van Kempen, L.J. Anallers, M.B. Rook, A.C. van Ginneken, D. Gros, and H.J. Jongsma. 1997. Gap junctions in human umbilical cord endothelial cells contain multiple connexins. Vol. 272. C117-130.
- van Rijen, H.V.M., M.J.A. van Kempen, S. Postma, and H.J. Jongsma. 1998. TUMOUR NECROSIS FACTOR [alpha] ALTERS THE EXPRESSION OF CONNEXIN43, CONNEXIN40, AND CONNEXIN37, IN HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS. *Cytokine*. 10:258-264.
- van Wetering, S., J.D. van Buul, S. Quik, F.P. Mul, E.C. Anthony, J.P. ten Klooster, J.G. Collard, and P.L. Hordijk. 2002. Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells. *J Cell Sci*. 115:1837-46.
- Vandenbroucke, E., D. Mehta, R. Minshall, and A.B. Malik. 2008. Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann N Y Acad Sci*. 1123:134-45.
- Vega, F.M., and A.J. Ridley. 2007. SnapShot: Rho family GTPases. *Cell*. 129:1430.
- Vestweber, D. 2008. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 28:223-32.
- Vittet, D., T. Buchou, A. Schweitzer, E. Dejana, and P. Huber. 1997. Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:6273-8.
- Vouret-Craviari, V., P. Boquet, J. Pouyssegur, and E. Van Obberghen-Schilling. 1998. Regulation of the actin cytoskeleton by thrombin in human endothelial cells: role of Rho proteins in endothelial barrier function. *Mol Biol Cell*. 9:2639-53.
- Vouret-Craviari, V., C. Bourcier, E. Boulter, and E. van Obberghen-Schilling. 2002. Distinct signals via Rho GTPases and Src drive shape changes by thrombin and sphingosine-1-phosphate in endothelial cells. *J Cell Sci*. 115:2475-84.
- Waschke, J., W. Baumgartner, R.H. Adamson, M. Zeng, K. Aktories, H. Barth, C. Wilde, F.E. Curry, and D. Drenckhahn. 2004a. Requirement of Rac activity for maintenance of capillary endothelial barrier properties. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 286:H394-H401.
- Waschke, J., D. Drenckhahn, R.H. Adamson, H. Barth, and F.E. Curry. 2004b. cAMP protects endothelial barrier functions by preventing Rac-1 inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 287:H2427-H2433.
- Waschke, J., D. Drenckhahn, R.H. Adamson, and F.E. Curry. 2004c. Role of adhesion and contraction in Rac 1-regulated endothelial barrier function in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 287:H704-H711.
- Waschke, J., F.E. Curry, R.H. Adamson, and D. Drenckhahn. 2005. Regulation of actin dynamics is critical for endothelial barrier functions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 288:H1296-H1305.
- Waschke, J., S. Burger, F.R. Curry, D. Drenckhahn, and R.H. Adamson. 2006. Activation of Rac-1 and Cdc42 stabilizes the microvascular endothelial barrier. *Histochem Cell Biol*. 125:397-406.
- Weed, S.A., A.V. Karginov, D.A. Schafer, A.M. Weaver, A.W. Kinley, J.A. Cooper, and J.T. Parsons. 2000. Cortactin Localization to Sites of Actin Assembly in Lamellipodia Requires Interactions with F-Actin and the Arp2/3 Complex. Vol. 151. 29-40.
- Weed, S.A., and J.T. Parsons. 2001. Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene*. 20:6418-34.

- Wegmann, F., K. Ebnet, L. Du Pasquier, D. Vestweber, and S. Butz. 2004. Endothelial adhesion molecule ESAM binds directly to the multidomain adaptor MAGI-1 and recruits it to cell contacts. *Experimental Cell Research*. 300:121-133.
- Wennerberg, K., and C.J. Der. 2004. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci*. 117:1301-12.
- Wittchen, E.S., R.A. Worthylake, P. Kelly, P.J. Casey, L.A. Quilliam, and K. Burrige. 2005. Rap1 GTPase inhibits leukocyte transmigration by promoting endothelial barrier function. *J Biol Chem*. 280:11675-82.
- Wojciak-Stothard, B., S. Potempa, T. Eichholtz, and A.J. Ridley. 2001. Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability. *J Cell Sci*. 114:1343-55.
- Wojciak-Stothard, B., and A.J. Ridley. 2002. Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol*. 39:187-199.
- Wojciak-Stothard, B., L.Y. Tsang, and S.G. Haworth. 2005. Rac and Rho play opposing roles in the regulation of hypoxia/reoxygenation-induced permeability changes in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 288:L749-60.
- Wolburg, H., and A. Lippoldt. 2002. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol*. 38:323-37.
- Wright, T.J., L. Leach, P.E. Shaw, and P. Jones. 2002. Dynamics of vascular endothelial-cadherin and beta-catenin localization by vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in human umbilical vein cells. *Exp Cell Res*. 280:159-68.
- Wu, M.P., D. Jay, and A. Stracher. 1994. Existence of multiple phosphorylated forms of human platelet actin binding protein. *Cell Mol Biol Res*. 40:351-7.
- Yajnik, V., C. Paulding, R. Sordella, A.I. McClatchey, M. Saito, D.C.R. Wahrer, P. Reynolds, D.W. Bell, R. Lake, S. van den Heuvel, J. Settleman, and D.A. Haber. 2003. DOCK4, a GTPase Activator, Is Disrupted during Tumorigenesis. *Cell*. 112:673-684.
- Yamada, S., S. Pokutta, F. Drees, W.I. Weis, and W.J. Nelson. 2005. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell*. 123:889-901.
- Yamamoto, M., S.H. Ramirez, S. Sato, T. Kiyota, R.L. Cerny, K. Kaibuchi, Y. Persidsky, and T. Ikezu. 2008. Phosphorylation of Claudin-5 and Occludin by Rho Kinase in Brain Endothelial Cells. Vol. 172. 521-533.
- Yang, C., and M.G. Kazanietz. 2007. Chimaerins: GAPs that bridge diacylglycerol signalling and the small G-protein Rac. *Biochem J*. 403:1-12.
- Yuan, S.Y. 2002. Protein kinase signaling in the modulation of microvascular permeability. *Vascul Pharmacol*. 39:213-23.
- Zhang, B., and Y. Zheng. 1998. Regulation of RhoA GTP hydrolysis by the GTPase-activating proteins p190, p50RhoGAP, Bcr, and 3BP-1-activating proteins p190, p50RhoGAP, Bcr, and 3BP-1. *Biochemistry*. 37:5249-57.
- Zheng, Y., M.F. Olson, A. Hall, R.A. Cerione, and D. Toksoz. 1995. Direct involvement of the small GTP-binding protein Rho in lbc oncogene function. *J Biol Chem*. 270:9031-4.

Zur Literatursuche diene folgende Internetseite:

PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>)

7. Anhang

7.1. Chemikalienauflistung

Alle Chemikalien und Substanzen entsprechen dem höchstmöglichen Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen bezogen:

Acrylamidlösung, 40 %	C_3H_5NO	Roth, Karlsruhe
Agarose	---	GIBCO BRL, Eggenstein
Amidoschwarz	$C_{22}H_{14}N_8Na_2O_9S_2$	Merck, Darmstadt
3- Aminophthalhydrazid (Luminol)	$C_8H_7N_3O_2$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	$(NH_4)_2S_2O_8$	Serva, Heidelberg
Ampicillin	$C_{16}H_{19}N_3O_4S$	Boehringer, Mannheim
Ampuwa (deionisiertes H_2O)	H_2O	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Aprotinin	$C_{284}H_{432}N_{84}O_{79}S_7$	AppliChem, Darmstadt
BamH1	---	Fermentas, St. Leon-Roth
BAPTA	$C_{22}H_{24}N_2O_{10}$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bacto-Agar	---	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Bradykinin	$C_{50}H_{73}N_{15}O_{11}$ $x3C_2H_4O_2$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Borsäure	H_3BO_3	AppliChem, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	---	Sigma, Deisenhofen
Bradford-Reagenz	$C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	$C_{19}H_9Br_4NaO_5S$	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	$CaCl_2 \times 2H_2O$	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R250	$C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$	Merck, Darmstadt
p- Coumarinsäure	$C_9H_8O_3$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxycholsäure (DOC)	$C_{24}H_{39}NaO_4$	Roth, Karlsruhe
Dimethylpimelimidate (DMP)	$C_9H_{18}N_2O_2 \times 2HCl$	Pierce, Rockford

Dimethylsulfoxid (DMSO)	C_2H_6OS	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	AppliChem, Darmstadt
Dispase	---	Roche, Penzberg
Dithiothreitol (DTT)	$C_4H_{10}O_2S_2$	Roth, Karlsruhe
DNAse	---	Roche, Penzberg
Essigsäure, konz. (Eisessig)	$C_2H_4O_2$	Roth, Karlsruhe
Ethanol, reinst	C_2H_5OH	Roth, Karlsruhe
Ethanolamin	C_2H_7NO	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	$C_{21}H_{20}N_3Br$	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	Roth, Karlsruhe
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	$C_{14}H_{24}N_2O_{10}$	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	---	Biochrom, Berlin
Fluoresceinisothiocyanat FD4 (FITC-Dextran)	---	Sigma, Deisenhofen
Forskolin	$C_{22}H_{34}O_7$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FURA-2	$C_{29}H_{22}N_3O_{14}K_5$	Invitrogen, Karlsruhe
Gelatine	---	AppliChem, Darmstadt
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	AppliChem, Darmstadt
Glutaraldehyd	$C_5H_8O_2$	
Glutathionsepharose	---	Amersham Bioscience
Glycerin	$C_3H_8O_3$	Merck, Darmstadt
Glycin	$C_2H_5NO_2$	AppliChem, Darmstadt
HBSS	---	AppliChem, Darmstadt
Hefe Extrakt (Bacto TM Yeast Extract)---		BD Biosciences, Heidelberg
Hepes Salz	$C_8H_{18}N_2O_4S$	Serva, Heidelberg
Hepes Säure	$C_8H_{18}N_2O_4S$	Serva, Heidelberg
Histamin	$C_5H_9N_3 \times 2HCl$	Sigma-Aldrich, Steinheim

Igepal CA 630	$(C_2H_4O)_n C_{14}H_{22}O$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	C_3H_8O	Sigma-Aldrich, Steinheim
Iso propyl- β -D-thiogalacopyranosid (IPTG)	$C_9H_{18}O_5S$	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid	KCl	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
Kanamycin	$C_{18}H_{36}N_4O_{11}$	ICN Biomedicals Inc, Aurora
Kollagenase A	---	Roche, Penzberg
Leupeptin	$2C_{20}H_{38}N_6O_4$ $\cdot H_2SO_4$	AppliChem, Darmstadt
Lysozym	---	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	---	privat
Magnesiumchlorid	$MgCl_2 \times 6H_2O$	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumsulfat	$MgSO_4 \times 7H_2O$	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	C_2H_6OS	Merck, Darmstadt
MES	$C_6H_{13}NO_4S$	Roth, Karlsruhe
Methanol	CH_3OH	Roth, Karlsruhe
Narcorenlösung (Pentobarbitallösung)	$C_{11}H_{18}N_2O_3$	Merial, Halbergmoos
Natriumazid	NaN_3	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	NaCl	AppliChem, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	NaH_2PO_4	AppliChem, Darmstadt
Natrium dodecylsulfat (SDS)	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	Serva, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natronlauge	NaOH	Riedel deHaen, Seelze
Nonidet P40	$(C_2H_4O)_{-8}C_{14}H_{22}O$	Roche, Penzberg
Normal donkey serum (NDS)	---	Dianova, Hamburg

Normal goat serum (NGS)	---	Sigma, Deisenhofen
NSC-23766 (Rac 1-Inhibitor)	C ₂₄ H ₃₈ C ₁₃ N ₇	Calbiochem/Merck, Darmstadt
O-Me-cAMP	C ₁₇ H ₁₆ ClN ₅ O ₆ P ₅ Na	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
n- Propylgallat	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	Sigma, Deisenhofen
Platelet-activating factor (PAF)	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P x H ₂ O	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd	(CH ₂ O) _n	AppliChem, Darmstadt
Penicillin G	C ₁₆ H ₁₉ N ₂ O ₄ S	Sigma, Deisenhofen
Pepstatin	C ₃₄ H ₆₃ N ₅ O ₉	AppliChem, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	C ₇ H ₇ FO ₂ S	Roth, Darmstadt
Ponceaus S	C ₂₂ H ₁₂ N ₄ Na ₄ O ₁₃ S ₄	AppliChem, Darmstadt
RNAse	---	Roche, Penzberg
Rolipram	C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salzsäure	HCl	AppliChem, Darmstadt
Streptomycin	C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂	Sigma, Deisenhofen
N',N',N',N',- Tetramethyl- ethylendiamin (TEMED)	C ₆ H ₁₆ N ₂	Roth, Karlsruhe
Thombin, human	---	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trichloressigsäure	C ₂ C ₁₃ O ₂ H	Roth, Karlsruhe
Tris	C ₄ H ₁₁ NO ₃	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	C ₃₄ H ₆₂ O ₁₁	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	---	Serva, Heidelberg
Trypton (Bacto™ Trypton)	---	GIBCO BRL, Eggenstein
Tween 20	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂	AppliChem, Darmstadt
Xba1	---	Fermentas, St. Leon-Roth
Y27632	C ₁₄ H ₂₁ N ₃ Ox2HCl	Calbiochem, La Jolla, CA

7.2. Auflistung der Zusammensetzung von Lösungen und Puffer

Zellkultur:

0,5 % Gelatinelösung in H₂O, autoklaviert

0,05 % Trypsinlösung mit 0,02 % EDTA in PBS, sterilfiltriert

2 % Glutaraldehydlösung in PBS

Einfriermedium: 10 % DMSO / 10 % FCS in DMEM

Penicillin-Stammlösung: 12,87 g/ml in PBS, pH 5,5, sterilfiltriert

Streptomycin-Stammlösung: 6,01 g/ml in PBS, pH 5,5, sterilfiltriert

PSEC-Präparation:

Kollagenase A-Lösung: 1 mg/ml Kollagenase A in PBS, sterilfiltriert

Permeabilitätsmessung in vivo:

Ringer-Stammlösung	
771,40 g	NaCl
34,22 g	KCl
29,40 g	CaCl ₂ x 2H ₂ O
29,57 g	MgSO ₄ x 7H ₂ O
ad 20 l Aqua _{dest.}	

Ringer-Gebrauchslösung (pH 7,4)	
400 ml	Ringer-Stammlösung
1,98 g	Glucose
0,84 g	NaHCO ₃
4,70 g	Hepes Salz
5,25 g	Hepes Säure
ad 2l Aqua _{dest.}	

Ringer/BSA-Lösung: 0,05 g BSA in 5 ml Ringer-Gebrauchslösung sterilfiltriert

Immunfluoreszenz:

PBS: (phosphat buffered saline)	400,3 g	NaCl
	10,0 g	KCl
	65,3 g	Na ₂ HPO ₄
	ad 10 l Aqua _{dest.}	

TBS (pH 7,4) (tris buffered saline)	2,42 g	Tris
	29,22 g	NaCl
	ad 1 l Aqua _{dest.}	

2 % PFA-Lösung in PBS

0,1 % Triton X-100 Lösung in PBS

BSA/NGS-Lösung: 3 % BSA / 1 % NGS in PBS

10 % NDS-Lösung: 10 % NDS in 0,5 % Natriumazid

Eindecklösung: 60 % Glycerin / 1 % NPG in PBS

Pull Down-Assay – Präparation der Sepharose

Ampicillin-Stammlösung: 100 mg/ml in H₂O, sterilfiltriert

LB-Medium (siehe Molekularbiologie)

0,5 mM IPTG-Lösung (in H₂O)

PBS

1 mg/ml Lysozymbilösung in H₂O

Lösung aus: 0,4 % Triton X-100 und 1 mM EDTA in PBS

Pull Down-Assay/Triton-Assay mit anschließender Gel Elektrophorese und Western Blot:

PBS mit 0,05 % Tween 20 pH = 7,4

TBS mit 0,05 % Tween 20 pH = 7,4

Luminollösung: 250 mM 3-Aminophthalhydrazid in DMSO

Coumarinsäurelösung: 90 mM p-Coumarinsäure in DMSO

5 % Magermilch in PBS ± 0,05 % Tween

Bradford-Stammlösung vor Gebrauch 1:5 mit H₂O verdünnen

Lysepuffer vor Gebrauch zusetzen: 1 mM PMSF, 1 µg/µl Leupeptin/Pepstatin/Aproteinin

Rho Puffer vor Gebrauch 1:5 mit 10% Glycerol in Aqua_{dest.} verdünnen

5 fach-Lysepuffer Rho Pull Down (pH 7,5)	
125 mM	HEPES
70 mM	NaCl
50 mM	MgCl ₂
5 mM	EDTA
10 %	Glycerol
5 %	Igepal CA-630
ad 500 ml Aqua _{dest.}	

2 fach-Lysepuffer Rac Pull Down (pH 7,5)	
3,03 g	Tris
1,02 g	MgCl ₂
3,65 g	NaCl
10 ml	Nonidet P40
50 ml	Glycerol
2,50 g	DOC
ad 500 ml Aqua _{dest.}	

Triton-Lysepuffer (pH 6,8)	
0,5%	Triton X-100
50 mM	MES
25 mM	EGTA
5 mM	MgCl ₂
in Aqua _{dest.}	

SDS-Sammelgel:	vier 10 % Gele	vier 10 % Gele
Aqua _{dest.}	8,1 ml	4,8 ml
1,5 M Tris pH 8,8	6,7 ml	10,0 ml
30 % Acrylamid	5,0 ml	5,0 ml
10 % SDS in H ₂ O	0,2 ml	
10 % APS in H ₂ O	60 µl	
TEMED	30 µl	

Trenngel	für vier 10 % Gele
Aqua _{dest.}	6,2 ml
1,5 M Tris pH 8,8	1,2 ml
30 % Acrylamid	2,5 ml
10 % SDS in H ₂ O	0,1 ml
10 % APS in H ₂ O	30 µl
TEMED	15 µl

Probenpuffer:	
0,454 g	Tris
1,2 g	SDS
7,56 g	Glycin
400 µl	Brompholblau
(30 mg)	DTT)
ad 20 ml Aqua _{dest.}	

Elektrophoresepuffer (5fach):	
50,0 g	SDS
720,0 g	Glycin
150,0 g	Tris
ad 100 ml Aqua _{dest.}	

Blotpuffer:	
25 mM	Tris
195 mM	Glycin
20 %	Methanol
0,1 %	SDS
in Aqua _{dest.}	

ECL I – Lösung:

1 ml	Luminollösung
0,44 ml	Coumarinsäurelösung
10 ml	Tris/HCl Lsg pH 8,0
ad 100 ml Aqua _{dest.}	

ECL II – Lösung:

64 µl	30 % H ₂ O ₂
10 ml	Tris/HCl Lsg pH 8,0
ad 100 ml Aqua _{dest.}	

Ponceau:

5,0 g	PonceauS
30,0 g	Trichloressigsäure
ad 1 l Aqua _{dest.}	

Amidoschwarz:**Färbelösung**

0,5 %	Amidoschwarz
45 %	Methanol
45 %	Aqua _{dest.}
10 %	Eisessig

Entfärbelösung

47,5 %	Methanol
47,5 %	Aqua _{dest.}
5 %	Eisessig

Auflöselösung

80 %	Ameisensäure
10 %	Eisessig
10 %	Trichloressigsäure

Permeabilitätsmessungen mit Transwell-Filtern:

PBS

FITC-Dextran Lösung in PBS: 10 mg FITC-Dextran/ml PBS

Laserpinzette:

0,1 M NaH₂PO₄ Lösung pH 8,1 in H₂O

0,5 M NaH₂PO₄ Lösung pH 8,0 in H₂O

HBSS Lösung

0,1 M Boratpuffer in H₂O pH 9,0

0,1 M Boratpuffer pH 8,5

0,2 M Ethanolamin pH 8,0

100 mM EGTA Lösung

Molekularbiologie:

- SOC-Medium (pH =7,0 einstellen und autoklavieren): 1 l autoklaviertes Medium mit 20 ml 1 M Glucoselösung versetzen und sterilfiltrieren

20,0 g	Bacto-Tryptone (Casein-Hydrolysat)
10,0 g	Bacto-Yeast
0,5 g	NaCl
250 mM	KCl
ad 1 l Aqua _{dest.}	

- LB Medium (pH=7,0 mit 1 M NaOH einstellen und autoklavieren)

10,0 g	Bacto-Tryptone (Casein-Hydrolysat)
5,0 g	Bacto-Yeast
10,0 g	NaCl
ad 1 l Aqua _{dest.}	

- LB Agar (pH=7,0 mit 1 M NaOH einstellen und autoklavieren)

10,0 g	Bacto-Tryptone (Casein-Hydrolysat)
5,0 g	Bacto-Yeast
15,0 g	Bacto-Agar
10,0 g	NaCl
ad 1 l Aqua _{dest.}	

Ampicillin-Stammlösung: 100 mg/ml in H₂O, sterilfiltriert

Kanamycin-Stammlösung: 50 mg/ml in H₂O, sterilfiltriert

0,1 %ige Ethidiumbromidlösung

TBE-Puffer (10fach; mit HCl pH 8,3)

108 g	Tris
55 g	Borsäure
9,3 g	EDTA
ad 1 l Aqua _{dest.}	

Agarosegel-Probenpuffer (6fach)

0,2 ml	100 mM EDTA (pH 8,0)
10,0 g	Glycerin
50 mg	Bromphenolblau
50 mg	Xylencyanol
ad 20 ml Aqua _{dest.}	

FURA-2:

FURA-2-Stammlösung: 1 mM FURA-2 in DMSO

FRET-Puffer (pH 7,3)

137 mM	NaCl
5,4 mM	KCl
10 mM	HEPES
2 mM	CaCl ₂
1 mM	MgCl ₂
solve in Aqua _{des}	

7.3. Auflistung von Geräten und Verbrauchsmaterialien

7.3.1. Geräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Varioklav, Oberschleißheim
Automatikpipetten	Eppendorf, Hamburg
Blot-Kammer	Sigma, Deisenhofen
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Digitalkamera	Powershot A75, Canon, Tokio
ECIS 1600R	Applied BioPhysics Inc., USA
Elektrophoresekammern für	Spezialanfertigung der Fa. Noras,
Polyacrylamid-Minigele	Würzburg

Feinwaage AB 104	Mettler Toledo GmbH, Gießen
Fluoreszenzspektrophotometer	Wallac Victor2, Perkin-Elmer, Überlingen
Gefrierschrank	Heraeus, Hanau
Gelkammern	GIBCO BRL, Keutz
Heizwasserbad	Haake Messtechnik, Karlsruhe
Kamera für FURA-2-Messungen	Visitron Systems, Puchheim
Kühlwasserbad	Lauda, Lauda
Magnetrührer	Janke & Kunkel, Staufen
Mikropipetten-Schleifgerät	Sutter Company, CA, USA
Mikrowelle	Moulinex, Leipzig
Mikroskope:	
• Fluoreszenz-Mikroskop:	Axioskop 2 mot plus; Zeiss, Hamburg
• FURA-2-Messungen	Zeiss Axiovert200, Hamburg
• Konfokales UV Laserscanning- mikroskop:	Zeiss (Zeiss LSM 510), Hamburg
• Optische Pinzette:	Eigenbau mit Nd:Yag-Laser (1064 nm) und NA-Objektiv (100 x 1.3, Öl; Zeiss); Mikroskop: Axiovert 135; Zeiss, Oberkochen
• Mikroskop am Mikroperfusions-Arbeitsplatz	Leica DM LI, Wetzlar
Netzgeräte	GIBCO BRL, Keutz
Nucleofactor II	Amaxa, Köln
pH-Meter	Hanna-Instruments, Kehl am Rhein
Photometer	SmartSpec™ Plus Spectrophotometer, BioRad
Mikropipetten-Puller	Bachofer, Reutlingen
Schüttler	Unimax 2010; Heidolph, Schwabach
Sonifier 250	Branson Ultrasonics, Danbury
Spektrophotometer	Sunrise, Tecan GmbH, Crailsheim
Sterilisator	Heraeus, Hanau
Thermoblock	Liebisch, Bielefeld

UV-Tisch mit UV-Kontaktlampe	Vetter GmbH, Wiesloch Chroma 43 (Mittelwelle 302)
Vakuumsaugpumpe	Heinse Ziller, Würzburg
Vortex-Gerät	Bender & Hobein AG, Zürich
Waage	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen/Rotoren	Tischzentrifuge 5415C; Eppendorf, Hamburg 5804 R; Eppendorf, Hamburg SorvallRC5B und SorvallRC5B Plus mit Rotoren GSA und SS-34; L-80 Ultrazentrifuge mit Rotoren; Beckmann, München SW 55 Ti und 50.2 Ti

7.3.2. Verbrauchsmaterialien

Baysilone-Paste	GE Bayer Silicones, Wilton
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg
Fotolaborchemikalien	Kodak, Paris
Gasflammer	Gasi; Schütt, Göttingen
Gel Blotting-Filterpapier	Whatman, Middlesex
Glaswaren	Schott, Wertheim
Handschuhe	Proline, Azid Bonz, Herrenberg
Frischhaltefolie	Dow, Midland
Glaskapillaren	World Precision Instruments, Florida
Gluthathionsepharose	Amersham Bioscience, Schweden
Kryoröhrchen	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Monovette [®]	Sarstedt, Nürnberg
Monovette-Kanülen	Sarstedt, Nürnberg
Nitrylhandschuhe	Ansell Protective Products, Coshocton
Nitrozellulosemembran	Amersham, Braunschweig
Papier	Kimwipes; Kimberly-Clark, Mainz
Parafilm	Pechiney plastic packaging, Menasha

Petrischalen	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Plastikpipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Plastikreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Plastikröhrchen	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Polaroidfilme	Polaroid, Enschede
Protein-A-Mikroperlen	Dynal, Oslo
Röntgenfilme	Amersham Biosciences, Buckinghamshire
Superdex 200	GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala
Spritzen	B Braun, Melsungen
Sterilfilter	Roth, Karlsruhe
Transwellfilter	Falcon BD, Frankreich
Zellkulturflaschen und Platten	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen

7.4. Lebenslauf

Name: Yvonne Baumer
 Anschrift: Eugenstraße 54
 72072 Tübingen
 Telefon: Festnetz: 07071-5499011
 Mobil: 0177-3272646
 Email Adresse: yvonne.baumer@web.de
 Geburtsdatum: 22.03.1981
 Geburtsort: Meiningen
 Familienstand: ledig

Schulausbildung: 1987 – 1991 POS Hans Beimler Meiningen (Grundschule)
 1991 – 1999 Henfling-Gymnasium Meiningen
 mit Abschluss Abitur

Studium: 1999 – 2005 Studium der Pharmazie an der Julius-
 Maximilians-Universität in Würzburg
 Abschluss: Approbation als Apothekerin

Berufstätigkeit: 08/2005 - Promotion an der Julius-Maximilians-Universität
 08/2008 Würzburg, Institut für Anatomie und Zellbiologie
 unter der Leitung von Prof. Dr. D. Drenckhahn
 Thema: Die Rolle und Mechanismen der GTPasen
 Rac 1 und Rho A in der Regulation der
 Endothelbarriere.

nebenberufliche 01/2000 – 12/2005 Serviceleiterin, Cinemaxx Würzburg
 Tätigkeiten: seit 01/2006 Apothekerin, Engel-Apotheke Würzburg

Würzburg, den 26.8.08

7.5. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Drenckhahn für die Bereitstellung des Themas der Arbeit. Außerdem danke ich ihm für die Möglichkeit, mich an der Vorlesung „Phytopharmazie für Mediziner“ beteiligen zu können.

Großer Dank gilt Prof. Dr. Waschke für die Betreuung der Arbeit, die vielfältigen Gespräche und Anregungen, Unterstützung, Hilfe, Ideen und Vorschläge und auch die ehrlich entgegengebrachte Kritik.

Prof. Dr. Roitsch danke ich für die Betreuung dieser Dissertation als Vertreter der Fakultät der Biologie der Julius-Maximilians-Universität und für die Möglichkeit, an den Staatsexamensprüfungen der Pharmazeuten als Beisitzer teilnehmen zu können.

Dank gilt auch Dr. Nicolas Schlegel, der an vielen Tagen und Abenden ehrlicher und kritischer Freund/Arbeitskollege war, auch wenn es einmal nicht um die Anatomie ging.

Frau Nadja Niedermeier gilt ebenfalls großer Dank. Zum einen hat Sie mir viele der in dieser Arbeit angewandten Methoden beigebracht und sich stets darum bemüht, dass die Laborarbeit den rechten Gang beibehält. Zum anderen ist sie in all den Jahren zu einer sehr guten Freundin geworden.

Des Weiteren allen Kollegen der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Waschke ein großer Dank. Lisa Bergauer, die mit ihrer technischen Assistenz immer wieder eine gute Kollegin und Freundin war. Wolfgang-Moritz Heupel, der als Doktorandenkollege meine Probleme oft sehr gut verstehen konnte und immer mit Rat und Tat hilfreich zu Seite stand. Dr. Athina Hübner danke ich für ideenreiche Gespräche. Tanja Frantzeskakis danke ich für ihre Unterstützung bei den *in vivo*-Versuchen. Sie hat viele einsame Tage im Rattenlabor erfreulich gestaltet. Dr. Judith Gutberlet hat mich gerade in der Anfangszeit mit freundschaftlichen und kollegialen Gesprächen unterstützt. Seraj Kahn, Stefanie Imhof, Katharina Müller-Marschhausen und Sabrina Burger danke ich als weiteren Mitgliedern dieser Arbeitsgruppe. Ihnen noch einmal ein herzliches Danke für das nette Arbeitsklima.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie für die immer wieder entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit.

Ruth Wertmann, eine Doktorandenkollegin aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. Bünemann aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg möchte ich für ihre nette, hilfsbereite und freundschaftliche Zusammenarbeit bei den FURA-2-Messungen und Amaxa- Transfektionen danken.

Letztlich danke ich natürlich dem SFB 688 für die Finanzierung dieser Doktorarbeit.

Ein abschließendes großes Dankeschön gilt natürlich meinen Eltern und meiner Großmutter, die mich über all die Jahre des Studiums und der Promotion immer unterstützt haben und mir bei Problemen stets mit Ruhe und Kraft hilfreich zur Seite standen.

7.6. Ehrenwörtliche Erklärungen

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die im Fachbereich Biologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Die Rolle und Mechanismen der GTPasen Rac 1 und Rho A in der Regulation der Endothelbarriere.“ im Institut für Anatomie und Zellbiologie unter Leitung von Prof. Dr. Drenckhahn unter Betreuung durch Prof. Dr. Waschke ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen biologischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit oder eine andere als Dissertation vorgelegt. Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht wie in angehängter Publikationsliste angegeben.

Würzburg, den 26.8.08

Yvonne Baumer

7.7. Publikationsliste Yvonne Baumer, geb. 22.03.1981 in

Meiningen

A. Originalarbeiten:

1. Baumer Y., Burger S., Curry F.E., Golenhofen N., Drenckhahn D., Waschke J. (2008)

Differential role of Rho GTPases in endothelial barrier regulation dependent on endothelial cell origin.

Histochem Cell Biol. 129:179-91.

2. Baumer, Y., Drenckhahn D., Waschke J. (2008)

cAMP induced Rac 1-mediated cytoskeletal reorganization in microvascular endothelium.

Histochem Cell Biol. 129:765-778

3. Schlegel N., Baumer Y., Drenckhahn D., Waschke J. (2008)

LPS-induced endothelial barrier breakdown is caused by a decrease of cAMP leading to Rac 1 inactivation and loss of claudin 5

Critical Care Medicine; im Druck

4. Heupel WM., Efthymiadis A., Schlegel N., Müller T., Baumer Y., Baumgartner W., Drenckhahn D., Waschke J. (2008)

In vivo endothelial barrier stabilization via a cyclic tandem peptide targeting VE-cadherin transinteraction

Journal of Cell Science; in Revision

5. Baumer Y., Spindler V., Werthmann R.C., Bünemann M., Waschke J. (2008)

Role of Rac 1 and cAMP in endothelial barrier breakdown and thrombin-induced barrier breakdown

Journal of Cell Physiology; in Revision

B. Kongressbeiträge:

1. Burger S., Baumer Y., Drenckhahn D., Waschke J. (2006)

Role of Rho A in the regulation of microvascular endothelial barrier properties

101. Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft in Freiburg vom 7.-10. April 2006

2. Waschke J., Burger S., Baumer Y., Drenckhahn D. (2006)

Rho and Rac differentially regulate barrier functions dependent on the origin of endothelial cells

23. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg 27.9.06-29.9.06

3. Baumer Y., Drenckhahn D., Waschke J. (2007)

cAMP via Epac/Rap1 activates Rac 1 in microvascular endothelium *in vitro*

103. Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft in Innsbruck vom 14.-17. April 2007

4. Schlegel N., Baumer Y., Drenckhahn D., Waschke J. (2007)

LPS- induced endothelial barrier breakdown is caused by a decrease of cAMP leading to Rac 1 inactivation and loss of claudin 5

103. Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft in Innsbruck vom 14.-17. April 2007

5. Baumer Y., Drenckhahn D., Waschke J. (2008)

cAMP via Epac/Rap 1 strengthened endothelial cell junctions and induced Rac 1-mediated cytoskeletal reorganization in microvascular endothelium

Congress of Experimental Biology, San Diego vom 05.04. - 09.04.2008; San Diego, USA

6. Schlegel N., Baumer Y., Drenckhahn D., Waschke J. (2008)

cAMP-dependent Rac 1 inactivation is associated with LPS- induced endothelial barrier breakdown

Congress of Experimental Biology, San Diego vom 05.04. - 09.04.2008; San Diego, USA

7. Baumer Y., Drenckhahn D., Waschke J. (2008)

Role of cAMP and Rac 1 in thrombin-induced endothelial barrier break-down

24. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg 24.9.08-26.9.08

C. Vorträge:

1. Baumer Y., Waschke J., Drenckhahn D. (2006)

Role of Rho A in microvascular and macrovascular endothelial barrier regulation *in vitro*

Vortrag im Rahmen des SFB 688-Minisymposiums am 27.4.06 in Würzburg

2. Baumer Y., Waschke J., Drenckhahn D. (2007)

The role of Rho A and Rac 1 in barrier stabilization of microvascular and macrovascular endothelium

Vortrag im Rahmen des Symposium von SFB 612, 688 und GRK 1089 vom 30.10.-02.10.2007 in Düsseldorf

3. Baumer Y., Drenckhahn D., Waschke J. (2008)

Role of cAMP and Rac 1 in thrombin-induced endothelial barrier break-down

24. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg 24.9.08-26.9.08