

Echtzeit-Untersuchungen zur Thrombin-abhängigen Änderung
der cAMP-Konzentration in lebenden Endothelzellen

Real-time monitoring of thrombin-dependent changes of the
cAMP concentration in living endothelial cells

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

vorgelegt von

Ruth Werthmann

aus

Eichstätt

Würzburg, 2009

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Hünig

1. Betreuer: Prof. Dr. Moritz Bünemann

2. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Dandekar

3. Betreuer: Prof. Dr. Michaela Kuhn

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

1	Einleitung	1
1.1	Regulation der endothelialen Barrierefunktion.....	2
1.1.1	Erhöhung der transendothelialen Permeabilität.....	2
1.1.2	Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der Barriere.....	6
1.2	Ca ²⁺ -vermittelte Regulation von cAMP-Signalen.....	10
1.3	Regulation endothelialer Signalwege und der Barrierefunktion durch Thrombin.....	14
1.4	Messung von cAMP-Signalen in Echtzeit in lebenden Zellen mittels Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer (FRET).....	17
1.5	Zielsetzung dieser Studie.....	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Material.....	23
2.1.1	Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial.....	23
2.1.2	Antikörper.....	25
2.1.3	Oligonukleotide.....	25
2.1.4	Plasmide.....	26
2.1.5	Zellen und Zellkulturmedien.....	26
2.1.6	Mauslinien.....	26
2.1.7	Software.....	27
2.2	Methoden.....	27
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	27
2.2.1.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	27
2.2.1.2	Transformation von <i>E. coli</i>	28
2.2.1.3	Plasmidpräparation und DNA-Konzentrationsbestimmung.....	28
2.2.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	28
2.2.1.5	Agarosegelelektrophorese.....	29
2.2.1.6	Klonierung verschiedener Plasmide.....	29
2.2.2	Generierung transgener Mäuse mit endothelspezifischer Expression von Epac-camps.....	32
2.2.2.1	Präparation des DNA-Konstruktes für die Mikroinjektion in Maus-Eizellen.....	32
2.2.2.2	Präparation genomischer DNA und Genotypisierung der Mäuse.....	32

2.2.2.3	Kreuzung der Linien CAG-CAT-Epac und Tie2-Cre und Genotypisierung der Nachkommen.....	34
2.2.2.4	Präparation von pulmonären Endothelzellen aus transgenen Mäusen.....	34
2.2.2.5	Präparation des Musculus Cremaster aus transgenen Mäusen.....	36
2.2.3	Zellkultur und Zelltransfektionen.....	36
2.2.4	Reverse Transkriptase-PCR und Real-Time-PCR.....	37
2.2.5	Fluoreszenzmessungen.....	39
2.2.5.1	<i>In vitro</i> -Kalibrierung von Epac1-camps.....	39
2.2.5.2	FRET-Messungen in lebenden Zellen.....	39
2.2.5.3	Ca ²⁺ -Messungen in lebenden Zellen.....	40
2.2.6	Proteinbiochemische Methoden.....	41
2.2.6.1	Herstellung von Zellmembranen und Zelllysaten zur Western Blot-Analyse.....	41
2.2.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
2.2.6.3	Transfer von Proteinen auf Membranen und deren immunologische Detektion.....	43
2.2.6.4	Immunfluoreszenz.....	44
2.2.7	Datenauswertung und statistische Analysen.....	45
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Thrombin verursacht die transiente Abnahme einer erhöhten cAMP- Konzentration im Zellkultursystem.....	46
3.1.1	Thrombin führt in mikro- und makrovaskulären Endothelzellen zu einer transienten Abnahme eines erhöhten cAMP-Spiegels.....	46
3.1.2	Dem Thrombin-induzierten maximalen Anstieg der intrazellulären [Ca ²⁺] folgt zeitlich verzögert die maximale Abnahme der [cAMP].....	49
3.1.3	Die Thrombin-induzierte Abnahme der [cAMP] beruht nicht auf einer G _{i/o} -vermittelten Hemmung von Adenylatzyklasen.....	50
3.1.4	Die Thrombin-induzierte, transiente Abnahme der [cAMP] ist Ca ²⁺ -abhängig.....	52
3.1.5	Die durch Ca ²⁺ und CaM regulierte PDE1 ist nicht maßgeblich an der Thrombin-vermittelten Abnahme der [cAMP] beteiligt.....	55
3.1.6	<i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Kalibrierung von Epac1-camps zur Bestimmung der [cAMP] in lebenden Zellen.....	56

3.1.7	Die Transiente Abnahme der [cAMP] wird durch die Regulation von Adenylatzyklasen beeinflusst.....	57
3.1.8	Die Herunterregulierung der dominanten Adenylatzyklase 6 resultiert in einer Aufhebung der transienten [cAMP]-Abnahme.....	60
3.2	Thrombin führt zu einem zeitlich verzögerten Anstieg der [cAMP].....	65
3.2.1	Eine niedrige [cAMP] steigt nach der Stimulation mit Thrombin an.....	65
3.2.2	Der Thrombin-vermittelte [cAMP]-Anstieg ist Ca^{2+} -abhängig.....	65
3.2.3	Der Thrombin-vermittelte Anstieg der [cAMP] beruht nicht auf einer Calmodulin-abhängigen Aktivierung der AC8.....	67
3.2.4	Thrombin verursacht eine Aktivierung der Phospholipase A_2	69
3.2.5	Der Anstieg der [cAMP] wird durch die Hemmung der Zyklooxygenasen verringert.....	70
3.2.6	Thrombin verursacht auch eine cAMP-unspezifische Änderung des ratiometrischen FRET-Signals.....	72
3.2.7	Der Prostazyklin-Rezeptor ist am Thrombin-induzierten Anstieg der [cAMP] beteiligt.....	73
3.2.8	Bestimmung der [cAMP] in HUVECs nach der Stimulation mit Thrombin.....	75
3.3	Expression von Epac-camps im Endothel transgener Mäuse.....	76
3.3.1	Generierung der Mauslinie Tie2-Epac2.....	76
3.3.2	Kreuzung der Mauslinien CAG-CAT-Epac und Tie2-Cre.....	78
4	Diskussion	81
4.1	Thrombin bewirkt die transiente Abnahme einer erhöhten [cAMP] und einen zeitlich verzögerten [cAMP]-Anstieg.....	81
4.2	Thrombin führt zu einer Ca^{2+} -abhängigen Hemmung der dominanten AC6.....	84
4.3	Thrombin verursacht die Synthese und Ausschüttung von Prostazyklin.....	87
5	Zusammenfassung/ Summary	92
6	Literaturverzeichnis	96
	Publikationen	106
	Lebenslauf	107
	Erklärung	108
	Danksagung	109

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
AC	Adenylatzyklase
ANP	atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
$[cAMP]$	cAMP-Konzentration
CAT	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
cDNA	Complementary-DNA
CFP	Cyan-Fluorescent-Protein
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
COX	Zyklooxygenase
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's-Modified-Eagle's-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic-Acid
dNTPs	Desoxyribonucleosidtriphosphates
DTT	Dithiothreitol
EC_{50}	halbmaximale effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylendioxy-bis(ethylennitrilo)-tetraessigsäure
Epac	Exchange-Protein-Directly-Activated-By-cAMP
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular-Signal-Regulated-Protein-Kinase
FAK	Focal-Adhesion-Kinase
F_{CFP} bzw. YFP	CFP- bzw. YFP-Emission
FCS	Fetal-Calf-Serum
FLIM	Fluorescence-Lifetime-Imaging
FRET	Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDI	Guanine-Nucleotide-Dissociation-Inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine-Nucleotide-Exchange-Factor
GFP	Green-Fluorescent-Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HDMEC	Human-Dermal-Microvascular-Endothelial-Cell
HEK	Human-Embryonic-Kidney
HUVEC	Human-Umbilical-Vein-Endothelial-Cell
IP_3	Inositol-1,4,5-triphosphat
kDa	Kilodalton
MAFP	5,8,11,14- Eicosatetraenyl-Methylester-Phosphonofluoridic-Acid
MLC	Myosin-Light-Chain
MLCK	Myosin-Light-Chain-Kinase
mRNA	Messenger-Ribonucleic-Acid
8MM-IBMX	8-Methoxymethyl-Isobutylmethylxanthine
PAEC	Pulmonary-Artery-Endothelial-Cell

PAF	Platelet-Activating-Factor
PAR	Protease-Activated-Receptor
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PDE	Phosphodiesterase
PEI	Polyethyleneimine
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PGE ₂	Prostaglandin E2
PGI ₂	Prostazyklin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PMVEC	Pulmonary-Microvascular-Endothelial-Cell
PP1M	Myosin-Phosphatase Typ 1
PTX	Pertussis Toxin
R bzw. R/R ₀	Ratiometrisches FRET-Signal
RNA	Ribonucleic-Acid
ROCE	Receptor-Operated-Ca ²⁺ -Entry
ROCK	RhoA-Kinase
rpm	Rounds-Per-Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	Small-Interfering-RNA
SOCE	Store-Operated-Ca ²⁺ -Entry
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
STIM	Stromal-Interaction-Molecule
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRPC	Transient-Receptor-Potential-Canonical
VASP	Vasodilator-Stimulated-Phosphoprotein
VE-Cadherin	vaskulär endotheliales Cadherin
VEGF	Vascular-Endothelial-Growth-Factor
YFP	Yellow-Fluorescent-Protein
ZO	Zona Occludin

1 Einleitung

Endothelzellen kleiden einschichtig alle Blutgefäße aus und bilden so die Grenze zwischen Blut und Gewebe. Aufgrund dieser Position erfüllt das Endothel im Gefäßsystem eine Vielzahl von Funktionen. So sorgt es für einen unbehinderten Blutfluss, indem es unter anderem Substanzen bildet, die die Adhäsion und Aggregation von Blutplättchen hemmen. Bei einer lokalen Verletzung des Gefäßes hingegen sind beschädigte Endothelzellen an der Initiation der Blutgerinnungskaskade beteiligt (Armstrong & Golan, 2005). Des Weiteren reguliert das Endothel den Gefäßtonus, indem es durch die Ausschüttung von Endothelin die Kontraktion oder durch die Abgabe von NO die Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen steuert (Spieker *et al.*, 2006).

Eine weitere wichtige Funktion des Endothels ist die Bereitstellung einer regulierbaren Barriere zwischen Blut und Gefäßwand bzw. interstitiellen Gewebe (Mehta & Malik, 2006; Michel & Curry, 1999). Diese Barrierefunktion beruht auf der selektiven Permeabilität des Endothels für makromolekulare, wasserlösliche Substanzen. Der Transport von Stoffen und Flüssigkeit durch die einzellige Endothelschicht kann grundsätzlich über trans- und parazelluläre Wege erfolgen. Feststoffe, die einen geringeren Durchmesser als 3 nm besitzen und lipophile Substanzen können passiv über den transzellulären Weg die Barriere passieren, wohingegen wasserlösliche Makromoleküle über 3 nm, wie zum Beispiel Albumin, aktiv über den parazellulären Weg transportiert werden müssen. Die parazelluläre Permeabilität des Endothels wird durch das Gleichgewicht zweier antagonistischer Kräfte bestimmt, der zentripetalen Spannungskraft des Zytoskeletts und den Adhäsionskräften zwischen benachbarten Zellen bzw. zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (Garcia *et al.*, 1995; Lum & Malik, 1996). Für eine hohe Adhäsion benachbarter Endothelzellen sorgen so genannte Tight- und Adherens-Junctions, die unter normalen Umständen für eine restriktive Barriere sorgen (Bazzoni & Dejana, 2003). Entzündungsmediatoren wie Histamin oder Koagulationsfaktoren wie Thrombin führen hingegen durch Aktivierung ihrer spezifischer Rezeptoren zu einem Abbau der ausgebildeten Junctions und zu einer verstärkten Kontraktion des Zytoskeletts und dadurch zu einer Lückenbildung zwischen den Zellen. So können Plasmaproteine und Flüssigkeit ungehindert das Endothel passieren. Die Signalwege, welche die Permeabilität des Endothels über die Bildung bzw. Störung der Tight- und Adherens-Junctions und eine Umorganisation des Aktinzytoskeletts kontrollieren, werden primär durch die sekundären Botenstoffe zyklisches AMP (cAMP) und Ca^{2+} reguliert (Abb. 1; Mehta & Malik, 2006; Michel & Curry, 1999). In dieser Arbeit wurden Ca^{2+} - und cAMP-Signale mit hoher zeitlicher Auflösung in lebenden Endothelzellen untersucht (siehe 1.5 Zielsetzung

dieser Studie). Die zellulären Mechanismen, durch die diese Signalstoffe die Barrierefunktion des Endothels steuern, werden nachfolgend näher erläutert.

1.1 Regulation der endothelialen Barrierefunktion

1.1.1 Erhöhung der transendothelialen Permeabilität

Die Barriere, die durch Endothelzellen gebildet wird, ist strukturell durch Adherens-Junctions und Tight-Junctions organisiert (Abb. 1). Adherens-Junctions, die im Endothel dominieren, bestehen aus vaskulär endotheliale Cadherin (VE-Cadherin), einem transmembranären Protein, das durch Interaktion seiner extrazellulären Domäne mit anderen VE-Cadherin-Molekülen benachbarter Endothelzellen assoziiert ist. Intrazellulär binden an das VE-Cadherin sowohl p120-Catenin, als auch α -, β - und γ -Catenine. Letztere verknüpfen die Adherens-Junctions mit dem Aktinzytoskelett und sind so für die Aufrechterhaltung der Integrität derselben von großer Bedeutung (Lampugnani *et al.*, 1995). p120-Catenin fungiert als Bindeglied zwischen VE-Cadherin und verschiedenen Kinasen, Phosphatasen und Rho-GTPasen. Dadurch beeinflusst auch p120-Catenin die Stabilität der Adherens-Junctions, die vor allem durch den Phosphorylierungsstatus der Cadherine und Catenine bestimmt wird (Vandenbroucke *et al.*, 2008).

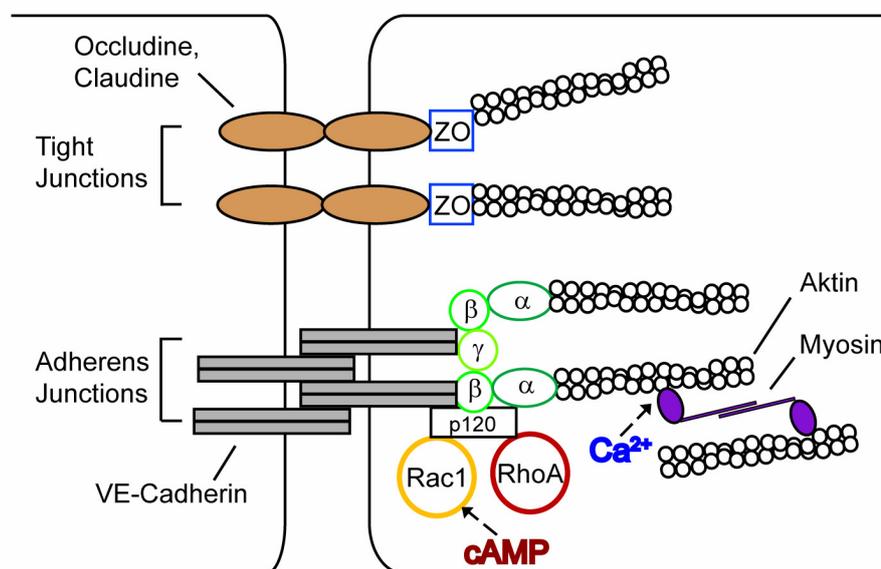


Abb. 1: Struktur der endothelialen Tight- und Adherens-Junctions

Die extrazellulären Domänen der Occludine und Claudine (Tight-Junctions) bzw. des VE-Cadherins (Adherens-Junctions) halten einen engen Zell-Zell-Kontakt aufrecht. Die intrazellulären Domänen dieser Proteine sorgen über die Bindung von Zona Occludinen (ZO) bzw. α -, β - und γ -Cateninen für eine Verknüpfung mit dem Aktinzytoskelett. p120-Catenin stellt ein Bindeglied zwischen VE-Cadherin und verschiedenen Kinasen, Phosphatasen und Rho-GTPasen (zum Beispiel Rac1 und RhoA) dar. Ca^{2+} fördert durch die Aktin-Myosin-Interaktion eine Kontraktion, cAMP bewirkt durch die Aktivierung von Rac1 eine erhöhte Stabilität der Junctions (modifiziert aus Mehta & Malik, 2006).

Tight-Junctions stellen etwa ein Fünftel der endothelialen Junctions und sind ebenso für die Integrität der endothelialen Barriere von Bedeutung (Mehta & Malik, 2006). Endotheliale Tight-Junctions bestehen aus aneinanderhaftenden Occludinen und Claudinen, welche mit Zona Occludin-Proteinen verknüpft sind (Abb. 1). Zona Occludine stellen die intrazelluläre Komponente der Tight-Junctions dar und sorgen, ähnlich wie die Catenine der Adherens-Junctions, für eine Verknüpfung der Junctions mit dem Aktinzytoskelett (Bazzoni & Dejana, 2004). Dynamische Interaktionen zwischen den Proteinen der Junctions und dem Aktinzytoskelett sind für die Regulation der endothelialen Permeabilität sehr bedeutend. Während ein kortikales Aktinband Adherens-Junctions stabilisiert, führt eine Umorganisation des Aktinzytoskeletts zu Stressfasern (Bündel von Aktinfasern, assoziiert mit nichtmuskulärem Myosin) zu einer Destabilisierung der Junctions (Dudek & Garcia, 2001; Vandenbroucke *et al.*, 2008). Außerdem resultiert die Ausbildung von Stressfasern in einer Kontraktion der Endothelzellen. Dadurch kommt es zu einer Lückenbildung und somit zu einer Erhöhung der Permeabilität. Eine Aktin-Myosin-vermittelte Kontraktion von Endothelzellen erfolgt nach Phosphorylierung der so genannten Myosin-Light-Chains (MLCs). Durch die Phosphorylierung ändern die MLCs ihre Konformation, interagieren mit Aktinfilamenten und verursachen eine Kontraktion, indem sie entlang der Aktinfilamente gleiten (Wojciak-Stothard & Ridley, 2003). Für diese Phosphorylierung ist in erster Linie eine Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige endothelspezifische Myosin-Light-Chain-Kinase (MLCK) zuständig, die MLC direkt an Threonin-18 und/oder Serin-19 phosphoryliert (Garcia *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 1997). Viele vasoaktive Substanzen, die zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels führen, verursachen einen Anstieg der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ (Ca^{2+} -Konzentration), gefolgt von einer Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts und einer Kontraktion der Endothelzellen (Andriopoulou *et al.*, 1999; Abb. 2). So wurde zum Beispiel für Thrombin gezeigt, dass ein rascher Anstieg der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ einer maximalen MLC-Phosphorylierung etwa 60 s vorausgeht. 5 min nach Stimulation der Endothelzellen mit Thrombin konnte eine Kontraktion und Lückenbildung der Zellen beobachtet werden, die nach 10 min in einer maximalen Permeabilitätserhöhung für Albumin resultierte (Garcia *et al.*, 1995). Der Phosphorylierungsstatus der MLC wird jedoch nicht nur durch die Aktivität der MLCK bestimmt, sondern auch durch die Aktivität von Myosin-assoziierten Protein-Phosphatasen (Verin *et al.*, 1995) und indirekt durch kleine GTPasen der Rho-Familie reguliert (van Nieuw Amerongen & van Hinsbergh, 2001). Unter den Vertretern der Rho-GTPasen wurden die drei Klassen Rho, Rac und Cdc42 besonders gut untersucht. Während eine Aktivierung von Rho zu einer vermehrten Bildung von kontraktile Stressfasern führt,

regulieren Rac und Cdc42 periphere Aktinbündel und wirken so barriereprotektiv (van Nieuw Amerongen & van Hinsbergh, 2001).

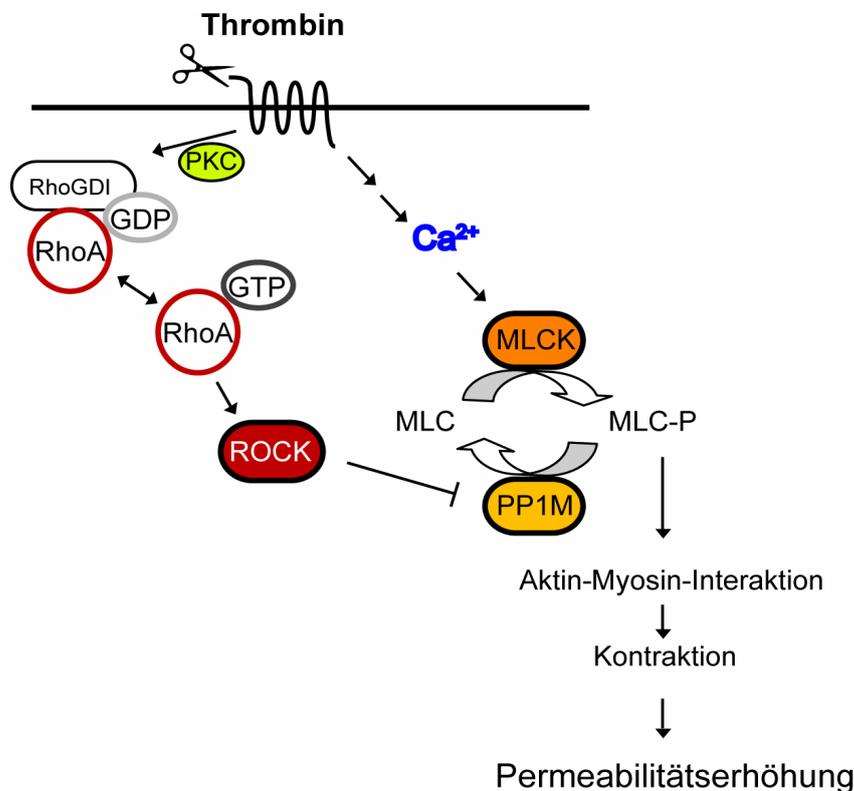


Abb. 2: Erhöhung der transendothelialen Permeabilität durch Thrombin

Thrombin führt nach Aktivierung des Rezeptors zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, welche die MLCK aktiviert, sodass MLCs phosphoryliert werden. Die dadurch verstärkte Aktin-Myosin-Interaktion resultiert in der Kontraktion der Endothelzellen und einer Permeabilitätserhöhung des Endothels. Außerdem wird durch Thrombin Proteinkinase C (PKC)-abhängig die GTPase RhoA aktiviert, indem durch Phosphorylierung der Rho-Guanine-Nucleotide-Dissociation-Inhibitor (RhoGDI) von RhoA dissoziiert. Die durch RhoA aktivierte RhoA-Kinase (ROCK) inhibiert durch Phosphorylierung die Myosin-Phosphatase Typ 1 (PP1M) und sorgt so ebenfalls für eine verstärkte Phosphorylierung der MLCs (modifiziert aus Vandenbroucke *et al.*, 2008).

Unter allen vasoaktiven Substanzen, die zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels führen, wurden die Wirkungen des Thrombin am intensivsten untersucht (Abb. 2): Die Stimulation von Endothelzellen mit Thrombin führte innerhalb einer Minute zu einer Aktivierung von RhoA und zu dessen Translokation an die Zellmembran, die 15 min anhält. Während dieser Zeit wurden Rac1 und Cdc41 nicht aktiviert (Qiao *et al.*, 2003; van Nieuw Amerongen *et al.*, 2000). Die der RhoA-GTPase nachgeschaltete RhoA-Kinase (ROCK) reguliert die MLC-Phosphorylierung, indem sie vor allem die Myosin-Phosphatase, speziell die Myosin-Phosphatase Typ 1 (PP1M), inhibiert und so für einen höheren Phosphorylierungsgrad der MLC sorgt (Essler *et al.*, 1998). *In vitro* konnte auch eine direkte Phosphorylierung der MLC

durch ROCK bestätigt werden, *in vivo* ist dieser Effekt aber vermutlich gegenüber der Aktivität der MLCK zu vernachlässigen (Amano *et al.*, 1996; van Nieuw Amerongen & van Hinsbergh, 2001). Mehta *et al.* (2001) postulierten für die Thrombin-vermittelte Aktivierung von RhoA einen Proteinkinase C (PKC)-abhängigen Mechanismus. Demnach führt die Stimulation mit Thrombin zu einer Ca^{2+} - und Diacylglycerin-abhängigen Aktivierung der PKC α . Diese phosphoryliert den Rho-Guanine-Nucleotide-Dissociation-Inhibitor (RhoGDI), der mit der GDP-gebundenen, inaktiven Form von Rho einen Komplex bildet. Durch die Phosphorylierung dissoziiert das RhoGDI von RhoA und führt so zu dessen Aktivierung (Abb. 2).

Auch andere vasoaktive Substanzen, wie zum Beispiel bakterielle Lipopolysaccharide (Essler *et al.*, 2000) oder das bakterielle Substrat PMT (Essler *et al.*, 1998), führen neben Thrombin über eine Aktivierung von RhoA und ROCK zu einer Stressfaserbildung und Kontraktion. Dagegen ist die Rolle von RhoA bei einer Histamin-induzierten Bildung von Stressfasern weniger klar. In einer Studie konnte eine RhoA- bzw. ROCK-Abhängigkeit festgestellt werden (Wojciak-Stothard *et al.*, 2001), in anderen jedoch nicht (Hirase *et al.*, 2001; van Nieuw Amerongen *et al.*, 1998). Für viele vasoaktive Substanzen wie Endothelin 1, Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF) und Angiotensin II wurde eine Beteiligung von RhoA noch nicht getestet. Es gibt jedoch auch Substanzen wie Bradykinin oder Platelet-Activating-Factor (PAF), bei denen die Aktivierung von RhoA oder ROCK wohl keine entscheidende Rolle bei der Permeabilitäts-erhöhung spielt (Adamson *et al.*, 2002).

Wie bereits erwähnt, wird die Permeabilität nicht nur durch eine Umorganisation des Zytoskeletts, sondern auch durch einen veränderten Phosphorylierungsstatus der Proteine der Junctions und der darauf folgenden verringerten Stabilität der Junctions, erhöht. Hierfür existieren jedoch keine einheitlichen Mechanismen. Eine Stimulation von Endothelzellen mit Histamin resultiert beispielsweise in einer Phosphorylierung von VE-Cadherin und β -Catenin und einer Dephosphorylierung des p120-Catenins (Andriopoulou *et al.*, 1999; Shasby *et al.*, 2002), wohingegen nach einer Stimulation mit Thrombin PKC α -vermittelt p120-Catenin phosphoryliert, und VE-Cadherin und β -Catenin dephosphoryliert werden (Konstantoulaki *et al.*, 2003).

Zusammenfassend führen Entzündungsmediatoren, Thrombin und andere vasoaktive Substanzen über einen Anstieg der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ zu einer Aktivierung der MLCK und teilweise zu einer Aktivierung der kleinen GTPase RhoA, was letztlich eine verstärkte Kontraktion bewirkt. Weiterhin sorgen verschiedene Kinasen und Phosphatasen für einen veränderten Phosphorylierungsstatus der an den Junctions beteiligten Proteine und damit für

eine Destabilisierung der Junctions. Eine verstärkte Kontraktion und eine verringerte Adhäsion der Zellen resultieren letztlich in einer Permeabilitätserhöhung des Endothels.

1.1.2 Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der Barriere

Es gibt, im Gegensatz zu den oben genannten, auch vasoaktive Substanzen, welche die Barrierefunktion der Endothelzellen basal unterstützen bzw. die Barriereintegrität nach einer Entzündung oder Verletzung des Gefäßes wiederherstellen. Dazu gehören vor allem Sphingosin-1-Phosphat (S1P; Garcia *et al.*, 2001) und Substanzen, die wie Prostazyklin (PGI₂), Prostaglandin E₂ (PGE₂) und β -adrenerge Agonisten über die Aktivierung eines G_s-gekoppelten Rezeptors zu einem Anstieg des sekundären Botenstoffs cAMP führen (Farmer *et al.*, 2001; Langeler & van Hinsbergh, 1991; Abb. 3).

S1P, das von aktivierten Blutplättchen ausgeschüttet wird, wirkt bei einer Gefäßverletzung einem Thrombin-induzierten Permeabilitätsanstieg entgegen. Auch im Zellkultursystem unterstützt S1P sowohl basal als auch nach einer Thrombin-Stimulation die Adhäsion der Endothelzellen. S1P hat dem Thrombin entgegengesetzte Wirkungen auf das Aktinzytoskelett, da es eine Stärkung des kortikalen Aktinrings verursacht, der zur Stabilität der endothelialen Junctions beiträgt (Garcia *et al.*, 2001). S1P führt über die Bindung an den S1P₁-Rezeptor, der an das G_i-Protein gekoppelt ist, zu einer Aktivierung von Rac1 (Abb. 3). Über die Aktivierung verschiedener Kinasen wird schließlich das Aktin-regulierende Protein Cofilin durch Phosphorylierung gehemmt und so die Ausbildung des kortikalen Aktinrings gefördert. Die Signalwege, die dabei ablaufen, sind jedoch noch unklar (Garcia *et al.*, 2001). Weiterhin wurde gezeigt, dass S1P eine verstärkte Interaktion von VE-Cadherin mit α - und β -Cateninen und eine Translokation der Focal-Adhesion-Kinase (FAK) an die Adhärens-Junctions hervorruft und so auch direkt zu einer erhöhten Stabilität der Junctions beiträgt (Sun *et al.*, 2009).

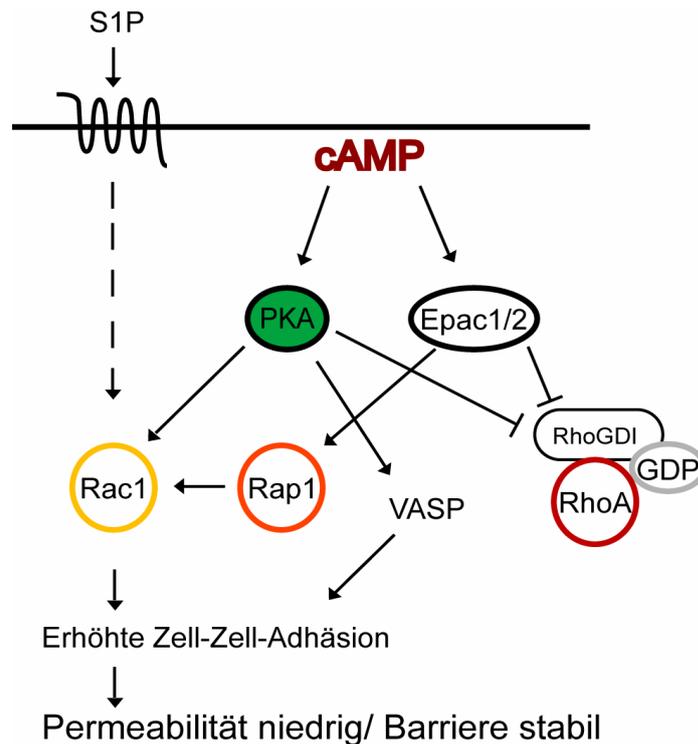


Abb. 3: Aufrechterhaltung der Barriere durch S1P und cAMP

Ein erhöhter cAMP-Spiegel steigert die Zell-Zell-Adhäsion sowohl durch die Aktivierung von Epac1/2 (Exchange-Protein-Directly-Activated-By-cAMP) als auch durch Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Beides resultiert schließlich in einer erhöhten Aktivität von Rac1. Auch S1P führt über die Rezeptorbindung zu einer Aktivierung von Rac1, dadurch zu einer verstärkten Adhäsion der Endothelzellen und einer gesteigerten Barrierefunktion. Außerdem führt die PKA-vermittelte Phosphorylierung von VASP (Vasodilator-Stimulated-Phosphoprotein) zur Stabilisierung der interendothelialen Junctions und somit zu einer erhöhten Barriereintegrität. Des Weiteren wurde sowohl für die PKA als auch für Epac1/2 gezeigt, dass die Dissoziation des RhoGDI von RhoA und damit letztlich die Aktin-Myosin-Interaktion (siehe Abb. 2) gehemmt wird (modifiziert aus Vandembroucke *et al.*, 2008).

Neben S1P, unterstützt vor allem cAMP als bedeutender sekundärer Botenstoff über verschiedene Signalkaskaden die Barrierefunktion des Endothels (Abb. 3). Es konnte sowohl in intakten Gefäßen als auch in Endothelzellkulturen gezeigt werden, dass ein erhöhter cAMP-Spiegel die endotheliale Barrierefunktion verstärkt (Adamson *et al.*, 1998; Stelzner *et al.*, 1989; Waschke *et al.*, 2004). Dieser Barriere-unterstützende Effekt des cAMP konnte sowohl für ruhende als auch für Thrombin-stimulierte Endothelzellen nachgewiesen werden (Baumer *et al.*, 2008; Schlegel *et al.*, 2008). Einige Studien zeigten, dass ein hoher cAMP-Spiegel, wie zum Beispiel nach einer Vorbehandlung der Endothelzellen mit Forskolin und Phosphodiesterase-Inhibitoren, einen Thrombin-induzierten Permeabilitätsanstieg vollständig unterbindet (Baumer *et al.*, 2009; Carson *et al.*, 1989; Garcia *et al.*, 1995; Tiruppathi *et al.*, 1992; Waschke *et al.*, 2004). Andere Studien beobachteten jedoch, dass ein erhöhter cAMP-Spiegel im Zellkultursystem einen initialen Permeabilitätsanstieg nach Thrombingabe nicht

verhindert, die Zeit bis zur Wiederherstellung der Barriere aber signifikant verkürzt (Moy *et al.*, 1998; Fukuhara *et al.*, 2005; Qiao *et al.*, 2003).

cAMP führt sowohl durch Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) als auch über das cAMP-abhängige Protein Epac (Exchange-Protein-Directly-Activated-By-cAMP) zu einer verstärkten Adhäsion und einer verringerten Kontraktion der Endothelzellen (Abb. 3). Die cAMP-abhängige Aktivierung der PKA kann über verschiedene Mechanismen zu einer erhöhten Integrität der Endothelbarriere führen. Eine Annahme beruht darauf, dass die Phosphorylierung der MLCs durch die PKA reguliert wird. Die endothelspezifische MLCK besitzt PKA-Phosphorylierungsstellen und *in vitro* konnte gezeigt werden, dass cAMP deren Aktivität verringert (Garcia *et al.*, 1997). Weiterhin gibt es Hinweise, dass durch Aktivierung der PKA die Rho-GTPase RhoA inhibiert wird. Qiao *et al.* (2003) konnten zeigen, dass ein Anstieg der [cAMP] (cAMP-Konzentration) in verschiedenen Endothelzelltypen PKA-abhängig eine Thrombin-induzierte Aktivierung von RhoA und deren Translokation an die Zellmembran verringern kann. Dies geschieht wohl durch Hemmung der Thrombin-vermittelten Dissoziation des RhoA von einem Guanine-Nucleotide-Dissociation-Inhibitor (GDI), wodurch RhoA in einem inaktiven Zustand im Zytosol bleibt. Da aktivierte RhoA die Myosin-assoziierte Proteinphosphatasen inhibiert und so in einer verstärkten MLC-Phosphorylierung und Kontraktion der Endothelzellen resultiert, führt die PKA-vermittelte Inhibierung der RhoA zu einer verringerten Permeabilität (Qiao *et al.*, 2003). Moy *et al.* (1998) konnten jedoch nicht bestätigen, dass eine erhöhte [cAMP] die durch Thrombin erhöhte MLC-Phosphorylierung und dadurch erhöhte Kontraktion von Human-Umbilical-Vein-Endothelial-Cells (HUVECs) verhindern kann. Der barriereprotektive Effekt des cAMP beruht deshalb vielleicht nur in geringem Maße auf einer PKA-vermittelten Verringerung des Phosphorylierungszustands der MLC.

Weiterhin sorgt die cAMP-abhängige PKA für die Phosphorylierung des Aktin-bindenden Proteins VASP (Vasodilator-Stimulated-Phosphoprotein) und es wird diskutiert, dass dies wichtig für die Translokation von VASP an kortikale Aktinstränge nahe der Tight- und Adherens-Junctions ist (Benz *et al.*, 2008; Comerford *et al.*, 2002). Dort sorgt phosphoryliertes VASP für eine verringerte Spannung und somit für eine erhöhte Barriere-Integrität des Endothels (Comerford *et al.*, 2002).

Insgesamt führen PKA-vermittelte Signale vor allem zu einer Verkürzung der Regenerationsphase, die das Endothel benötigt, um zum Beispiel nach einer durch Thrombin erhöhten Permeabilität wieder zum Ausgangszustand zurückzukehren (Moy *et al.*, 1998; Qiao *et al.*, 2003). Die cAMP-vermittelte Unterstützung der Barrierefunktion konnte jedoch von

Qiao *et al.* (2003) durch Inhibierung der PKA nicht vollständig aufgehoben werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass auch PKA-unabhängige Mechanismen zum Schutz der Barriere beitragen. Dies konnte in den letzten Jahren auch bestätigt werden: Zahlreiche Arbeiten belegen eine Beteiligung von Epac, dem cAMP-abhängigen Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor der GTPase Rap1 (Adamson *et al.*, 2008; Cullere *et al.*, 2005; Fukuhara *et al.*, 2005; Kooistra *et al.*, 2005). Eine direkte Aktivierung von Epac in HUVECs führte zu einer VE-Cadherin-vermittelten Bildung von Adherens-Junctions, einem Abbau von Stressfasern und einer verstärkten Bildung von kortikalem Aktin (Kooistra *et al.*, 2005). Fukuhara *et al.* (2005) konnten ebenso zeigen, dass durch Aktivierung von Rap1 nach einem Anstieg der [cAMP] die VE-Cadherin-vermittelte Adhäsion der Endothelzellen verstärkt wird und zu einer Umorganisation des kortikalen Aktins führt. Mittlerweile wurde auch nachgewiesen, dass mehrere Proteine der Junctions und Proteine, die das Aktinzytoskelett kontrollieren, als Effektorproteine von Rap1 fungieren (Kooistra *et al.*, 2007). Auch für Rac1, einem möglichen Zielprotein von Rap1, konnte belegt werden, dass es nach einer cAMP-abhängigen Aktivierung von Epac kortikale Aktinbündel stabilisiert und zu einer Translokation des Rac1-Effektorproteins Cortactin an die Junctions führt (Baumer *et al.*, 2008). Das Aktin-bindende Protein Cortactin ist an der Umorganisation von kortikalen Aktinfasern beteiligt (Daly, 2004). Eine PKA-vermittelte Aktivierung von Rac1 kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (Baumer *et al.*, 2008; Waschke *et al.*, 2004). Da Rac1 keine PKA-Phosphorylierungsstellen besitzt, erfolgt die Aktivierung wahrscheinlich indirekt über eine Aktivierung der Rac1-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren Tiam und Vav2 (Kooistra *et al.*, 2007). Cullere *et al.* (2005) konnten auch eine Epac-vermittelte Herunterregulation der durch Thrombin aktivierten GTPase Rho feststellen, und schlugen, wie schon für Rap1 und Rac1 beschrieben, einen Crosstalk zwischen Rap und Rho-GTPasen vor. Wie für Rac1 ist auch für RhoA sowohl eine PKA- als auch eine Epac-vermittelte Regulation beschrieben (Baumer *et al.*, 2008; Cullere *et al.*, 2005; Qiao *et al.*, 2003). Vermutlich sorgen sowohl PKA-abhängige als auch Epac-vermittelte Mechanismen für eine Inhibierung von RhoA und eine Aktivierung von Rac1 und somit letztendlich zu einer Aufrechterhaltung der Barrierefunktion des Endothels.

Neben Rac1 ist noch eine weitere kleine GTPase beschrieben, die zur Wiederherstellung der Barriereintegrität des Endothels beiträgt. Etwa eine Stunde nach Stimulation mit Thrombin konnte sowohl in der Zellkultur als auch im intakten Gefäß eine Aktivierung und Translokation von Cdc42 an die Zellmembran beobachtet werden. Zeitgleich findet eine Regeneration der Stabilität der Adherens-Junctions statt, sodass angenommen wird, dass es

sich bei der verspäteten Aktivierung von Cdc42 um einen negativen Rückkopplungsmechanismus zur Wiederherstellung der endothelialen Barrierefunktion handelt (Broman *et al.*, 2006; Kouklis *et al.*, 2004). Es ist noch nicht bekannt, welche Mechanismen zur Aktivierung von Cdc42 führen und ob cAMP dabei eine Rolle spielt.

Die Wirkung des cAMP auf die Barriereintegrität des Endothels ist eventuell von dessen Kompartimentierung in der Zelle abhängig. Vermutlich unterstützt cAMP nur dann die Barrierefunktion, wenn es durch membranständige Adenylatzyklasen (ACs) gebildet wird. Sayner *et al.* (2006) konnten nämlich zeigen, dass durch pathogene Bakterien, die lösliche ACs in eukaryotische Zellen transferieren, ein zytosolischer cAMP-Pool generiert wird, der zu einer Lückenbildung zwischen den Zellen führt und somit eine die Barriere störende Wirkung hat (Sayner *et al.*, 2006).

Während cAMP, welches durch membranständige ACs gebildet wird, eindeutig die Aufrechterhaltung der endothelialen Barriere unterstützt, wird die Rolle des zyklischen GMP (cGMP) eher kontrovers diskutiert. Schreier *et al.* (2008) beobachteten *in vivo* eine erhöhte Permeabilität nach der Gabe des atrialen natriuretischen Peptids (ANP), das zu einem Anstieg von cGMP führt. Fürst *et al.* (2008) zeigten jedoch sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, dass ANP nach einer Histamin-induzierten Erhöhung der Permeabilität die Barrierefunktion wiederherstellt. Andere Arbeiten konnten je nach Ursprung der Endothelzellen und Höhe der ANP-Konzentration entweder Permeabilitäts-erhöhende oder -verringende Effekte durch cGMP feststellen (Draijer *et al.*, 1995; Zimmerman *et al.*, 1990). Surapisitchat *et al.* (2007) schlugen schließlich vor, dass die tatsächliche Wirkung des cGMP vom relativen Expressionslevel der cGMP-inhibierten Phosphodiesterase 3A (PDE) und der cGMP-stimulierten PDE2A in Endothelzellen verschiedenen vaskulären Ursprungs und von der Konzentration des ANP bzw. cGMP abhängt. Dies würde bedeuten, dass cGMP über die Steuerung des Abbaus von cAMP die Barrierefunktion des Endothels reguliert (Surapisitchat *et al.*, 2007).

1.2 Ca²⁺-vermittelte Regulation von cAMP-Signalen

Fast alle der beschriebenen Mechanismen, die die Barrierefunktion des Endothels regulieren, beruhen auf Signalen der antagonistisch wirkenden sekundären Botenstoffe Ca²⁺ und cAMP. Diese beiden Botenstoffe regulieren sich auch gegenseitig, wobei im Folgenden nur die Möglichkeiten der Ca²⁺-vermittelten Regulation von cAMP-Signalen beschrieben werden.

Die Familie der Adenylatzyklasen, die cAMP aus ATP synthetisieren, besteht in Säugetieren aus neun ubiquitär vorkommenden, membranständigen Isoformen (AC1-9) und einer

löslichen Isoform (sAC), die vor allem im Hoden exprimiert wird. Alle membranständigen Isoformen besitzen eine ähnliche Struktur: Einem intrazellulären N-Terminus folgt eine Region M1, die sechs Transmembrandomänen umfasst. Der dritte intrazelluläre Loop ist besonders lang und bildet einen Teil der katalytischen Domäne (C1). Darauf folgt die zweite 6-fach transmembranäre Region M2, und der ebenfalls intrazelluläre C-Terminus bildet schließlich die zweite Hälfte der katalytischen Untereinheit (C2; Beazely & Watts, 2006). Alle membranständigen ACs werden über die α -Untereinheit stimulatorischer G-Proteine ($G\alpha_s$) nach Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren aktiviert, und setzen dann ATP rasch zu cAMP um. cAMP wird durch Hydrolyse zu Adenosin-5'-monophosphat durch cAMP-spezifische PDEs wieder abgebaut. Die rasche Synthese und der Abbau von cAMP ermöglichen eine räumlich und zeitlich gerichtete Signalweiterleitung. Eine Aktivierung von Rezeptoren, die an das inhibitorische G-Protein ($G\alpha_i$) gekoppelt sind, führt zu einer Inhibierung aller ACs außer AC2, AC4 und AC7, und auch $G_{\beta\gamma}$ inhibiert (AC1, AC8) oder stimuliert (AC2, AC4, AC7) bestimmte ACs (Willoughby & Cooper, 2007).

Außerdem regulieren intrazelluläre Ca^{2+} -Signale, die zeitlich und räumlich ebenfalls sehr komplex sind, die Aktivität von ACs. Intrazelluläre Ca^{2+} -Signale entstehen durch Aktivierung G_q -gekoppelter Rezeptoren und über die im Folgenden kurz erläuterte Signalkaskade. Durch G_q wird die Phospholipase C- β (PLC- β) aktiviert, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) spaltet. IP₃ diffundiert durch das Zytosol und setzt Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) frei, indem es an IP₃-Rezeptoren an der ER-Membran bindet. Die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER führt zu einem schnellen, starken und transienten Ca^{2+} -Signal in der Zelle, dem eine anhaltende Plateauphase folgt, die durch den so genannten kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom zustande kommt (Willoughby & Cooper, 2007). Dieser kapazitative bzw. Speicher-gesteuerte Ca^{2+} -Einstrom (Store-Operated- Ca^{2+} -Entry, SOCE) erfolgt über einen Kanal, der aus TRPC1- (Transient-Receptor-Potential-Canonical) und TRPC4-Untereinheiten aufgebaut ist (Cioffi & Stevens, 2006). Für TRPC1 und TRPC4 wurde nachgewiesen, dass sie an einem Ca^{2+} -vermittelten Anstieg der transendothelialen Permeabilität beteiligt sind (Tirupathi *et al.*, 2006). Die Möglichkeit, dass ähnlich wie in blutbildenden Zellen und Blutplättchen Orai1 (Braun *et al.*, 2009) statt TRPC1/TRPC4 als Ca^{2+} -Kanal für den kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom fungiert, wird kontrovers diskutiert (Abdullaev *et al.*, 2008; Beech, 2009). Abdullaev *et al.* (2008) postulierten, dass Orai1 als Ca^{2+} -Kanal fungiert und zeigten außerdem, dass STIM1 (Stromal-Interaction-Molecule 1) wie in Blutplättchen (Varga-Szabo *et al.*, 2008) das Ca^{2+} -Sensorprotein an der ER-Membran darstellt, und so an der Vermittlung zwischen der Ca^{2+} -

Ausschüttung aus dem ER und dem darauf folgenden kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom beteiligt ist.

Neben dem Speicher-gesteuerten (SOCE) Ca^{2+} -Einstrom existiert auch noch der Rezeptor-gesteuerte Ca^{2+} -Einstrom (Receptor-Operated- Ca^{2+} -Entry, ROCE). Nach Aktivierung eines G_q -gekoppelten Rezeptors, zum Beispiel durch Thrombin, und der darauf folgenden Aktivierung der PLC- β , führt das Spaltprodukt Diacylglycerol (DAG) auch direkt zur Aktivierung von TRPC6 und so zu einem Anstieg der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ (Ahmed & Malik, 2005). Vermutlich ist präferentiell der kapazitative Ca^{2+} -Einstrom und nicht der Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER an der Regulation der ACs in elektrisch nicht erregbaren Zellen beteiligt (Chiono *et al.*, 1995; Fagan *et al.*, 1998).

Die AC1 und die AC8, deren Expression vor allem im Gehirn sehr hoch ist, werden Calmodulin (CaM)-abhängig durch Ca^{2+} stimuliert (Cali *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 1991). *In vitro* wurden Dissoziationskonstanten (K_d) von etwa $0,1 \mu\text{M}$ Ca^{2+} (AC1; Wu *et al.*, 1993) bzw. $0,5 \mu\text{M}$ Ca^{2+} (AC8; Cali *et al.*, 1994) bestimmt und für die AC8 wurde ein möglicher Mechanismus der Aktivierung durch $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ vorgeschlagen (Simpson *et al.*, 2006). Die AC8 besitzt zwei CaM-Bindestellen nahe dem katalytischen Zentrum, eine am intrazellulären N-Terminus, die andere am ebenfalls intrazellulären C-Terminus. Es wird angenommen, dass bereits im ruhenden Zustand ein CaM-Molekül über gebundenes Ca^{2+} an die N-terminale Bindestelle rekrutiert wird und so sterisch das aktive Zentrum der AC blockiert. Nach dem Anstieg der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ bindet Ca^{2+} an weitere Ca^{2+} -Bindestellen des CaM. Das dadurch aktivierte CaM kann nun an die zweite CaM-Bindestelle am C-Terminus binden und führt so durch eine Konformationsänderung zur Aufhebung der zuvor bestehenden Autoinhibition der AC, sodass ATP zu cAMP umgesetzt werden kann (Simpson *et al.*, 2006).

Neben dieser Ca^{2+} -abhängigen Stimulation der AC1 und AC8, existiert auch eine Ca^{2+} -vermittelte Hemmung der Aktivität von ACs (Abb. 1-4). Alle ACs werden durch hohe Konzentrationen an Ca^{2+} ($10\text{-}25 \mu\text{M}$) gehemmt (Cooper *et al.*, 2003). Dies geschieht vermutlich durch die Konkurrenz um eine nieder-affine Bindestelle für die Ionen Ca^{2+} , Mg^{2+} und Mn^{2+} im katalytischen Zentrum (Willoughby & Cooper, 2007). Biochemische und kristallographische Studien zeigten, dass Mg^{2+} oder Mn^{2+} als Co-Faktoren bei der cAMP-Synthese der ACs benötigt werden (Garbers & Johnson, 1975; Tesmer *et al.*, 1999; Zimmermann *et al.*, 1998). So bestätigte die Kristallstruktur einer aktivierten AC-Chimäre, die aus der C1-Domäne der AC5 und der C2-Domäne der AC2 besteht, dass das katalytisch aktive Zentrum zwei Bindestellen für Mg^{2+} (oder Mn^{2+}) besitzt, die beide besetzt sein müssen,

bevor mit Hilfe dieser Ionen das Substrat ATP gebunden werden kann (Tesmer *et al.*, 1997; Tesmer *et al.*, 1999).

Dagegen werden die stark homologen Isoformen AC5 und AC6 schon durch physiologische Ca^{2+} -Konzentrationen gehemmt (0,2-0,6 μM ; Guillou *et al.*, 1999; Yoshimura & Cooper, 1992). AC5 und AC6 werden im Herzen, im Striatum und in Zellen des Gefäßsystems wie Endothelzellen, Glattmuskelzellen und Blutzellen exprimiert (Willoughby & Cooper, 2007). Die Hemmung geschieht CaM-unabhängig und beruht vermutlich auf einer nicht-kompetitiven Inhibierung der Mg^{2+} -vermittelten Aktivierung. Mit verschiedenen AC-Chimären durchgeführte Experimente bewiesen, dass die hoch-affine Ca^{2+} -vermittelte Inhibierung der AC5 durch die katalytische C1-Domäne zustande kommt (Hu *et al.*, 2002). Mou *et al.* (2009) konnten kürzlich an Kristallstrukturen der AC5(C1)/ AC2(C2)-Chimäre zeigen, dass Ca^{2+} eine katalytisch-inaktive „offene“ Konformation der C1- und C2-Domänen stabilisiert und zwar sowohl im Substrat (ATP)- als auch im Produkt (Pyrophosphat)-gebundenen Zustand. Da die AC nach Abgabe von cAMP zu einer inaktiven „offenen“ Konformation zurückkehrt, während Pyrophosphat noch gebunden ist, inhibiert Ca^{2+} die AC5 vermutlich durch Stabilisierung des Enzym-Produkt-Komplexes. Dabei wird durch die Bindung von Ca^{2+} die Bindung von Mg^{2+} an die räumlich nahen Mg^{2+} -Bindestellen sterisch behindert, sodass die AC5 nicht durch Mg^{2+} aktiviert werden kann (Mou *et al.*, 2009).

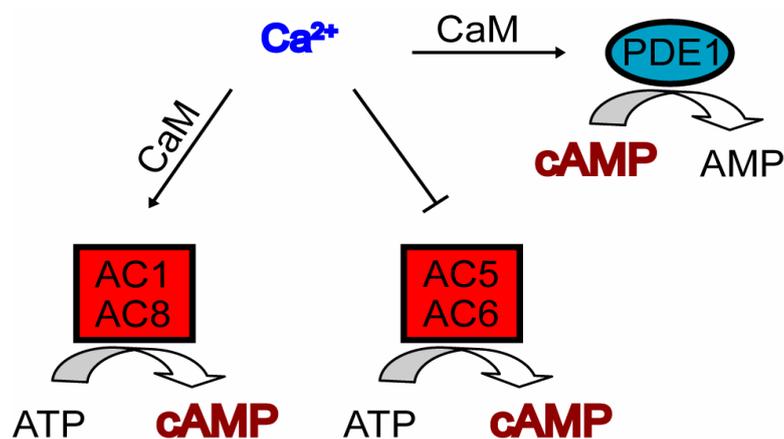


Abb. 4: Ca^{2+} -abhängige Regulation von Adenylatzyklasen (ACs) und Phosphodiesterasen (PDEs)
 Ca^{2+} beeinflusst die Synthese und den Abbau von cAMP durch Regulation der Aktivität von ACs und PDEs. AC1 und AC8 werden CaM-abhängig durch Ca^{2+} stimuliert, während AC5 und AC6 direkt durch physiologische Ca^{2+} -Konzentrationen gehemmt werden. Die Isoformen der PDE1-Familie werden CaM-abhängig durch Ca^{2+} aktiviert, sodass vermehrt cAMP hydrolysiert wird.

Ca^{2+} reguliert nicht nur die Synthese von cAMP durch Stimulation oder Hemmung der ACs, sondern beeinflusst auch dessen Abbau durch PDEs (Abb. 4). Es existiert eine PDE-Familie, die PDE1, die Ca^{2+} /CaM-abhängig stimuliert wird. Diese Familie wird durch drei Gene mit unterschiedlichen Splicevarianten konstituiert, wobei die Ca^{2+} /CaM-Sensitivität der einzelnen Isoformen variiert (Lugnier, 2006). Die Struktur aller Isoformen ist jedoch gleich: Alle PDE1-Isoformen besitzen vier Domänen, nämlich zwei CaM-bindende, eine inhibitorische und eine katalytische Domäne. Wie für viele andere Ca^{2+} /CaM-aktivierte Proteine beschrieben, verursacht die Bindung von Ca^{2+} /CaM an die PDE1 die Aufhebung einer Auto-Inhibierung. Normalerweise ist die PDE1 durch die inhibitorische Domäne in einem Zustand geringer Aktivität arretiert. Die Bindung von Ca^{2+} /CaM führt zu einer Konformationsänderung und Aktivierung des Enzyms (Sonnenburg *et al.*, 1995). Der genaue Mechanismus der Ca^{2+} /CaM-abhängigen Aktivierung der PDE1 ist jedoch noch nicht aufgeklärt (Goraya & Cooper, 2005). Ähnlich wie Ca^{2+} -sensitive ACs, die präferentiell durch einen kapazitativen Ca^{2+} -Einstrom reguliert werden (Chiono *et al.*, 1995; Fagan *et al.*, 1998), wird die PDE1 bevorzugt durch einen Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum aktiviert und nur zu einem geringen Teil durch einen Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER. Experimente mit endogen PDE1-exprimierenden humanen Astrozytomazellen zeigten, dass etwa 80 % der PDE1-Aktivierung durch einen Ca^{2+} -Einstrom von außen bedingt ist (Goraya *et al.*, 2004). Dies ist insofern verwunderlich, da es sich bei PDEs, im Gegensatz zu den membranständigen ACs, um zytosolische Proteine handelt. Allerdings wurde die PDE1 auch in Membranpräparationen von Leberzellen detektiert (Smoake *et al.*, 1995). Möglicherweise sorgen Komplexe mit dem Zytoskelett oder mit Gerüstproteinen, oder eine Lipidmodifikation für eine Kollokalisierung der PDE1 mit den Ca^{2+} -Kanälen der Zellmembran (Goraya & Cooper, 2005). Die PDE1 wird je nach Isoform vor allem im Gehirn, im Herzen, im Skelettmuskel, in glatten Muskelzellen und im Hoden exprimiert (Lugnier, 2006). In Endothelzellen konnte jedoch bisher keine PDE1-Aktivität nachgewiesen werden (Netherton & Maurice, 2004; Seybold *et al.*, 2005).

1.3 Regulation endothelialer Signalwege und der Barrierefunktion durch Thrombin

Die Protease Thrombin entsteht während der Koagulationskaskade, zum Beispiel nach einer Gefäßverletzung, durch proteolytische Spaltung von Prothrombin durch Faktor X. Thrombin ist ein vielseitiges Enzym, das entscheidend an der Fortführung der Koagulationskaskade beteiligt ist. So verursacht Thrombin die Aktivierung und Aggregation von Blutplättchen. Weiterhin spaltet Thrombin das lösliche Plasmaprotein Fibrinogen in Fibrinmonomere, die zu Fibrin polymerisieren und sorgt durch Aktivierung des Faktors XIII für deren

Querverknüpfung. Aggregierte Blutplättchen und vernetzte Fibrinfasern bilden schließlich ein Blutgerinnsel, das den verletzten Bereich des Blutgefäßes abdichtet (Armstrong & Golan, 2005). Aufgrund seiner geringen Lebensdauer wirkt Thrombin vor allem dort, wo es gebildet wird, nämlich am Ort der Gefäßverletzung. Allerdings fördert Thrombin nicht nur die Thrombenbildung, sondern wirkt auch auf noch intaktes Endothel, das sich in räumlicher Nähe zur Gefäßverletzung befindet.

Thrombin beeinflusst Form und Funktion der Endothelzellen durch Aktivierung der Protease-Activated-Receptors (PARs). Diese endothelspezifischen Wirkungen werden im Folgenden erläutert. Thrombin aktiviert die G-Protein-gekoppelten PARs, indem es eine N-terminale Domäne des Rezeptors abspaltet, die als intramolekularer Ligand den Rezeptor aktiviert. Es existieren vier murine bzw. humane PARs, wobei PAR1, PAR3 und PAR4 durch Thrombin aktiviert werden, PAR2 hingegen durch Trypsin. Endothelzellen exprimieren den Thrombin-aktivierten PAR1, der an G_i , G_q und $G_{12/13}$ gekoppelt ist (Bogatcheva *et al.*, 2001; Coughlin, 2000; Macfarlane *et al.*, 2001). Die α -Untereinheiten von $G_{12/13}$ binden RhoGEFs (Guanine-Nucleotide-Exchange-Factor), die die RhoA-GTPase aktivieren, und führen durch die unter 1.1.1 beschriebenen Rho-abhängigen Antworten des Zytoskeletts zu einer Erhöhung der Permeabilität (Kozasa *et al.*, 1998; Vouret-Craviari *et al.*, 1998).

Durch Aktivierung des G_i -Proteins werden zuvor aktive ACs in ihrer Aktivität gehemmt, sodass es durch eine folgende Aktivität von PDEs zu einem Abbau von cAMP kommt. Eine direkte Kopplung von G_i -Proteinen an PAR1 wurde in COS-7-Zellen durch Echtzeitmessungen mittels Bioluminescence-Resonance-Energy-Transfer (Ayoub *et al.*, 2007) und in Neuroblastomazellen durch die Immunopräzipitation von G_i nach einer Thrombin-Stimulation (Ogino *et al.*, 1996) bestätigt. In Endothelzellen fehlt bisher jedoch ein direkter Nachweis für die Kopplung von PAR1 an G_i . Eine Studie von Manolopoulos *et al.* (1997) detektierte in mikrovaskulären Endothelzellen des Nebennierenmarks der Ratte (RAMECs) durch Radioliganden-Bindungsanalysen nach einer Thrombin-Stimulation eine Pertussis Toxin (PTX)-sensitive Abnahme der [cAMP] (cAMP-Konzentration), sodass eine PAR1-vermittelte Aktivierung von G_i impliziert wurde. Auch in vaskulären Glattmuskelzellen war die Thrombin-induzierte Abnahme der [cAMP] PTX-sensitiv (Kanthou *et al.*, 1996). In einer anderen Studie an Lungenfibroblasten wurde hingegen eine G_i -Aktivierung nur vermutet, da Thrombin auch dort eine [cAMP]-Abnahme verursachte (Hung *et al.*, 1992). Wie bereits beschrieben, können die AC5 und AC6 jedoch auch über Ca^{2+} gehemmt werden (siehe 1.2).

Durch die Kopplung des PAR1 an G_q-Proteine führt Thrombin, über die Bildung des sekundären Botenstoffs IP₃, zu einem Anstieg der intrazellulären [Ca²⁺], und zwar sowohl durch die initiale Ausschüttung aus dem ER als auch über den nachfolgenden kapazitativen Ca²⁺-Einstrom aus dem extrazellulären Raum. Lum *et al.* (1992) verfolgten in bovinen Lungenarterien-Endothelzellen (PAECs) den zeitlichen Verlauf der IP₃-Bildung und der Ca²⁺-Signale nach einer Stimulation mit Thrombin. Bereits nach 10 s wurde eine vermehrte Bildung von IP₃ beobachtet, gefolgt von einem maximalen Ca²⁺-Signal nach 16 s, das danach langsam zurückging und nach etwa 50 s einen halbmaximalen Wert erreichte.

Mehrere Studien detektierten in Radio- oder Enzym-immunbiologischen cAMP-Analysen eine Thrombin-vermittelte Abnahme der [cAMP]. Es wurde vermutet, dass dies nicht durch die Aktivierung von G_i, sondern durch eine Ca²⁺-induzierte Hemmung der in Endothelzellen exprimierten AC5 und AC6 verursacht wird (Baumer *et al.*, 2008; Cioffi *et al.*, 2002). In mikrovaskulären Lungen-Endothelzellen (PMVECs), die mit dem PDE4-Inhibitor Rolipram inkubiert wurden, verringerte sich die cAMP-Konzentration bei zusätzlicher Inkubation mit Thrombin um circa 50 %. Eine Überexpression der Ca²⁺-stimulierten AC8 in diesen Zellen führte jedoch zu einem Thrombin-vermittelten Anstieg der [cAMP]. Dies ist ein indirekter Hinweis auf eine endogen vorliegende Ca²⁺-abhängige Inhibierung von AC5 und AC6 (Cioffi *et al.*, 2002). Des Weiteren zeigte die Messung der AC-Aktivität in Zellmembranpräparationen von bovinen Lungenarterien-Endothelzellen (PAECs), dass die Isoproterenol- oder Forskolin-stimulierte Produktion von cAMP durch submikromolare Ca²⁺-Konzentrationen um bis zu 30 % erniedrigt wurde. Dies ist auch ein Hinweis darauf, dass die Thrombin-vermittelte Abnahme der [cAMP] auf einer Ca²⁺-abhängigen Inhibierung der AC5 und AC6 beruht und nicht durch Aktivierung von G_i verursacht wird (Stevens *et al.*, 1995).

Vor allem durch die erzeugten Ca²⁺-Signale, aber wahrscheinlich auch durch eine Erniedrigung des cAMP-Spiegels, verursacht Thrombin eine Erhöhung der Permeabilität des Endothels aufgrund der bereits beschriebenen Auswirkungen auf das Zytoskelett und die Stabilität der Adherens-Junctions (vgl. 1.1.1). So konnten zum Beispiel Tirupathi *et al.* (1992) durch die Messung der elektrischen Impedanz einer einschichtigen, dichten Zelllage boviner PAECs und PMVECs in beiden Zelltypen bereits nach 0,5 min einen Thrombin-induzierten Anstieg der Permeabilität messen, der für 2 h anhielt bevor die ursprüngliche Impedanz wiederhergestellt war. Die Messung der maximalen Durchgangsrates von Albumin durch eine Schicht konfluenter boviner PAECs bestätigte ebenfalls, dass Thrombin innerhalb von min die Permeabilität maximal erhöht (Lum *et al.*, 1992). Allerdings verhinderte eine Vorbehandlung der Endothelzellen mit 8-Bromo-cAMP die Thrombin-induzierte Abnahme

der Impedanz, ein Hinweis darauf, dass Thrombin eventuell nur bei niedrigen cAMP-Konzentrationen zu einer Erhöhung der Permeabilität führt (Tiruppathi *et al.*, 1992). Cioffi *et al.* (2002) konnten ebenso eine Thrombin-abhängige Lückenbildung zwischen Lungenendothelzellen beobachten, stellten jedoch einen Unterschied zwischen makrovaskulären (PAEC) und mikrovaskulären (PMVEC) Endothelzellen fest: Bei PAECs war die Lückenbildung progressiv über 2 h, während sie bei den PMVECs innerhalb von 10 min maximal war und sich die Lücken zwischen den Zellen innerhalb von 2 h wieder zurückbildeten. Die durch Thrombin erhöhte Permeabilität führt allgemein zu einer verstärkten Durchgangrate von Blutplasmae Proteinen und zur Bildung von Ödemen (Coughlin, 2000).

Intaktes Endothel, das sich in der Nähe einer Gefäßverletzung befindet, unterstützt einerseits die Hämostase, zum Beispiel durch Präsentation des von Willebrandfaktors, der zur Adhäsion von Blutplättchen führt, andererseits ist es auch entscheidend daran beteiligt, eine Thrombenbildung auf den verletzten Bereich zu beschränken. Die Synthese und Sekretion von Prostazyklin durch das Endothel ist ein Mechanismus, der der Hämostase entgegenwirkt. Über G_s -gekoppelte Rezeptoren erhöht Prostazyklin die [cAMP] in den Blutplättchen und hemmt so deren Aggregation und die Ausschüttung weiterer Plättchen-aktivierender Substanzen. Außerdem induziert Prostazyklin, ebenfalls über Aktivierung G_s -gekoppelter Rezeptoren und eine nachfolgende cAMP-Bildung, die Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen und wirkt somit vasodilatatorisch (Armstrong & Golan, 2005). Es ist bekannt, dass Thrombin die Bildung von Prostazyklin in Endothelzellen veranlasst (Wheeler-Jones, 2008). Dies geschieht vermutlich über eine Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der Phospholipase A_2 (PLA₂), die die Spaltung der Arachidonsäure aus Membranphospholipiden katalysiert. Arachidonsäure wird durch die Zyklooxygenasen (COX) 1 und 2 zu Prostaglandin H₂, und durch die Prostazyklinsynthase schließlich zu Prostazyklin konvertiert und aus dem Endothel sezerniert (Jaffe *et al.*, 1987; Wheeler-Jones, 2008). Thrombin wirkt somit bei einer Gefäßverletzung sowohl pro- als auch antithrombotisch und spielt so eine wichtige regulatorische Rolle während der Hämostase.

1.4 Messung von cAMP-Signalen in Echtzeit in lebenden Zellen mittels Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer (FRET)

Um Änderungen der [cAMP] in Zellen zu detektieren, wurden vielfach immunbiologische Methoden eingesetzt, die ein Aufbrechen der Zellen erfordern, und somit keine Aussagen über die Zeitverläufe und die räumliche Lokalisation der Signale zulassen (Baumer *et al.*,

2008; Cioffi *et al.*, 2002; Stevens *et al.*, 1999). Dagegen ermöglichte die Entwicklung Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer (FRET)-basierter cAMP-Sensoren die Messung von [cAMP]-Änderungen in Echtzeit in einzelnen lebenden Zellen (Nikolaev *et al.*, 2004; Zaccolo *et al.*, 2000).

FRET ist der strahlungslose Energietransfer von einem angeregten Donor-Fluorophor auf ein Akzeptorfluorophor, der auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor beruht. Dadurch kann eine Emission des Akzeptorfluorophors detektiert werden, obwohl nur das Donorfluorophor direkt angeregt wurde. Dieser Energietransfer ist möglich, wenn sich das Emissionsspektrum des Donors und das Anregungsspektrum des Akzeptors überlappen und die beiden Fluorophore sich in einem Abstand von wenigen nm befinden (Förster, 1948). Die FRET-Effizienz Y_{FRET} ist abhängig vom Abstand r zwischen den Fluorophoren und definiert als:

$$Y_{\text{FRET}} = 1 / (1 + r^6 / R_0^6)$$

Dabei ist R_0 der Förster-Radius, der folgendermaßen definiert ist:

$$R_0 = (8,79 \times 10^{17} n^{-4} Q_D \kappa^2 J)^{1/6} [\text{nm}]$$

Hierbei ist n der refraktäre Index des Mediums, Q_D die Quantenausbeute des Donors, κ^2 der Orientierungsfaktor der Fluorophore zueinander und J die spektrale Überlappung zwischen Donoremission und Akzeptoranregung. Der Förster-Radius beschreibt praktisch die Distanz zwischen Donor und Akzeptor, bei der die FRET-Effizienz 50 % beträgt.

Generell kann FRET auf drei Arten bestimmt werden, nämlich durch intensitätsbasierte Messungen, Fluoreszenz-Lebenszeit-Messungen (Fluorescence-Lifetime-Imaging, FLIM) und Messungen der Fluoreszenz-Anisotropie (Yasuda, 2006).

Bei intensitätsbasierten FRET-Messungen werden die relativen Emissionsstärken des Donorfluorophors und des Akzeptorfluorophors aufgenommen und meist ratiometrisch als Akzeptoremission gegenüber der Emission des Donors dargestellt. Da die Donorfluoreszenz spektral zum Teil mit der Akzeptoremission überlappt und das Akzeptorfluorophor zu einem kleinen Teil auch bei Anregung des Donors direkt angeregt wird, muss die Akzeptoremission dabei um diese Werte korrigiert werden. Ratiometrische FRET-Messungen sind dazu geeignet die Dynamik der Konformationsänderungen von Proteinen zu untersuchen. Um absolute FRET-Effizienzen zu bestimmen, kann auch die Donorfluoreszenz vor und nach dem

Bleichen des Akzeptors gemessen werden. Findet FRET zwischen den zwei Fluorophoren statt, so ist die Donorfluoreszenz nach Bleichen des Akzeptors stärker, da die Energie nicht mehr auf den Akzeptor übertragen, sondern direkt emittiert wird.

Bei Bestimmung der FRET-Effizienz durch Fluoreszenz-Lebenszeit-Messung wird die Zeit zwischen Anregung und Emission des Donorfluorophors gemessen. Die Lebensdauer des Fluoreszenzsignals folgt dabei im Idealfall einer Monoexponentialfunktion. Findet FRET zwischen Donor und Akzeptor statt, so verkürzt sich die Lebensdauer der Donorfluoreszenz, da ein Teil der Energie strahlungslos auf den Akzeptor übertragen wird.

Die dritte Möglichkeit, die FRET-Effizienz zu bestimmen, ist die Messung der Fluoreszenz-Anisotropie. Dabei werden die Fluorophore, deren Dipolmoment sich parallel zu polarisiertem Licht befindet, angeregt und dann deren Dipolmoment bei der Emission bestimmt. Findet kein FRET statt, so ist die Polarisation von Anregungs- und Emissions-Dipolmoment fast gleich. Beim Auftreten von FRET ändert sich je nach Ausmaß des Energietransfers die Polarisation des Dipols bei der Emission und die Anisotropie wird verringert.

Durch die Distanzabhängigkeit ermöglicht die Messung von FRET die Detektion der Interaktion zweier Proteine, die mit jeweils einem Fluorophor markiert sind oder von intramolekularen Konformationsänderungen eines Proteins, das sowohl ein Donor- als auch ein Akzeptorfluorophor trägt (Yasuda, 2006). Als Fluorophore werden häufig Varianten des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) verwendet, die an die jeweiligen Proteine fusioniert werden (Tsien, 1998).

Es wurden zahlreiche FRET-basierte Sensoren entwickelt, die es ermöglichen, die Dynamik intrazellulärer Signale, wie zum Beispiel Ca^{2+} , cGMP oder cAMP, zu verfolgen (Nikolaev *et al.*, 2004; Miyawaki *et al.*, 1997; Russwurm *et al.*, 2007). Für diese Sensoren wurden meist das cyan fluoreszierende Protein (CFP) als Donorfluorophor und das gelb fluoreszierende Protein (YFP) als Akzeptorfluorophor verwendet und die FRET-Effizienz ratiometrisch bestimmt. Dies ist möglich, da sich das Emissionsspektrum des CFP und das Anregungsspektrum des YFP überlappen (Abb. 5).

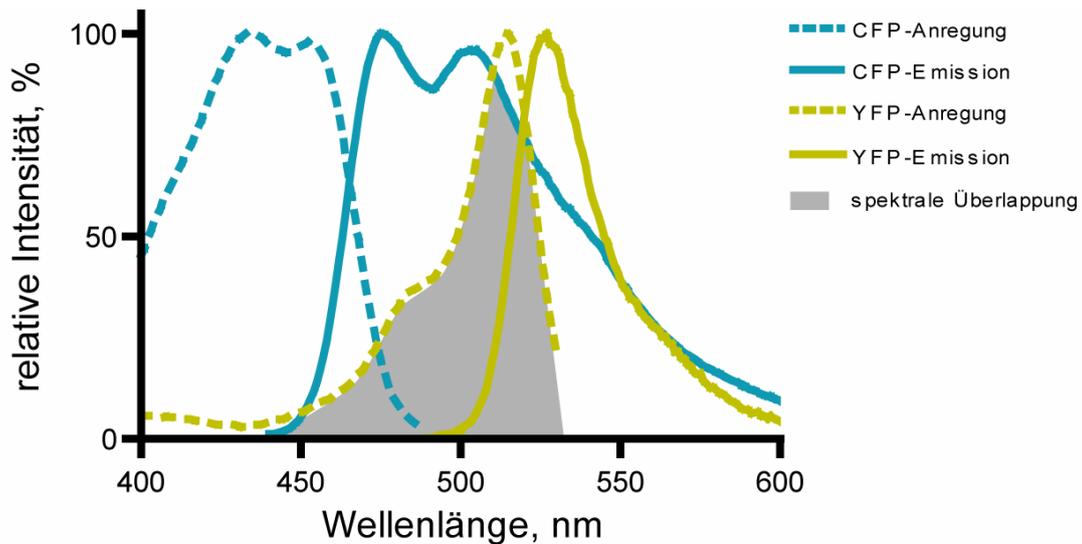


Abb. 5: Anregungs- und Emissionsspektren von CFP und YFP

CFP (Donor, blau) und YFP (Akzeptor, gelb) besitzen definierte Anregungs- und Emissionsspektren. Durch die spektrale Überlappung (grauer Bereich) der Donor-Emission (blaue durchgezogene Linie) und der Akzeptor-Anregung (gelb gestrichelte Linie) kann ein Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer bei alleiniger Anregung des Donors zu einer Akzeptor-Emission führen (Anregungs- und Emissionsintensitäten von Invitrogen, www.invitrogen.com).

Um [cAMP]-Änderungen zu verfolgen, wurden unter anderem FRET-Sensoren entwickelt, die die regulatorische und die katalytische Untereinheit der PKA, jeweils fusioniert an Donor- oder Akzeptorfluorophor, verwendeten. Die Bindung von cAMP an die regulatorische Untereinheit resultiert in einer Dissoziation der Untereinheiten, sodass kein Energietransfer mehr stattfinden kann (Adams *et al.*, 1991; Bacskai *et al.*, 1993; Zaccolo *et al.*, 2000). Allerdings ist der Mechanismus der PKA-Aktivierung und -Dissoziation durch die kooperative Bindung von cAMP an verschieden affine Bindungsstellen komplex (Diller *et al.*, 2001). Außerdem sind diese PKA-basierten Sensoren katalytisch aktiv und beeinflussen so die Physiologie der Zelle und, durch Aktivierung cAMP-spezifischer PDEs, auch die cAMP-Signale selbst. Deswegen wurden FRET-Sensoren entwickelt, die nur eine Bindedomäne für cAMP besitzen und katalytisch nicht aktiv sind (Nikolaev *et al.*, 2004). Die vorliegende Studie verwendet Epac1-camps um [cAMP]-Änderungen in Endothelzellen in Echtzeit zu verfolgen. Dieser Sensor besteht aus einer cAMP-Bindedomäne des Proteins Epac1, die sich zwischen einem CFP (enhanced CFP) und einem YFP (enhanced YFP) befindet. Bindet kein cAMP an die Bindedomäne, so findet FRET zwischen den beiden Fluorophoren statt. Ein Anstieg der [cAMP] und die nachfolgende Bindung führt zu einer Konformationsänderung des Sensors, die Fluorophore entfernen sich voneinander und es kommt zu einer Verringerung des Energietransfers (Abb. 6).

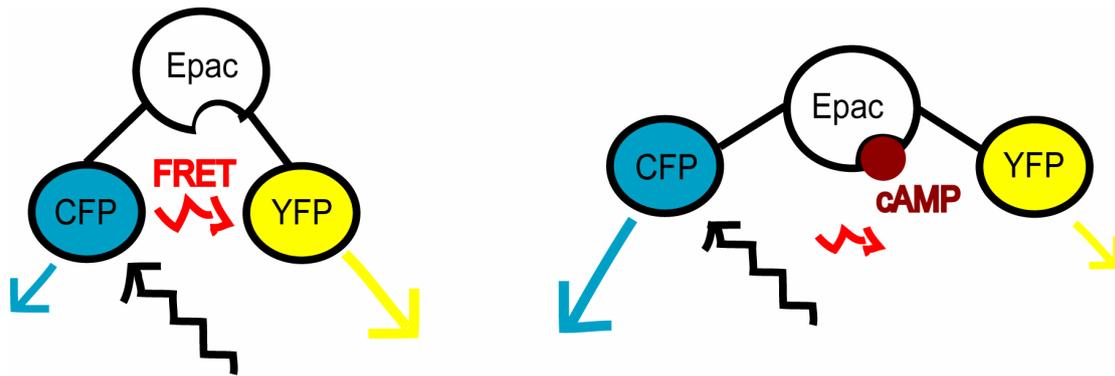


Abb. 6: Aufbau und Prinzip des FRET-basierten cAMP-Sensors Epac1-camps.

Eine Bindedomäne des Epac1-Proteins ist an ein CFP und ein YFP fusioniert. Bindet kein cAMP, so wird nach Anregung des CFP ein Teil der Energie an das YFP übertragen (FRET), sodass sowohl eine Emission des CFP als auch des YFP detektiert wird (links). Bindet cAMP an die Bindedomäne führt eine Konformationsänderung des Sensors zu einem verringerten Energietransfer, sodass die CFP-Emission erhöht und die YFP-Emission erniedrigt wird (rechts).

Da die beiden Fluorophore Teil eines Proteins sind und so stets gleich stark exprimiert werden, ist es möglich, anhand definierter Änderungen des ratiometrischen FRET-Signals, absolute cAMP-Konzentrationen zu bestimmen. Eine *in vitro*-Kalibrierung bestimmte den Wirkungsbereich von Epac1-camps, der dem physiologisch wirksamen Bereich des cAMP entspricht (10 nM bis 100 μ M), die halbmaximal effektive Konzentration beträgt etwa 2,4 μ M. Epac1-camps wurde bereits in einigen Studien verwendet unter anderem um Ca^{2+} -abhängige cAMP-Signale in Insulin-sezernierenden Zellen (MIN6) oder AC8-exprimierenden Human-Embryonic-Kidney-Zellen (HEK293) zu untersuchen (Landa *et al.*, 2005; Willoughby & Cooper, 2006).

Die Echtzeit-Bestimmung von cAMP in lebenden Zellen stellt zwar einen bedeutenden Fortschritt gegenüber immunbiologischen Messungen dar, aber in einem Zellkulturmodell liegen natürlich nicht die physiologischen Bedingungen des Gefäßsystems vor. Dies trifft auch besonders auf die Endothelzellen zu, die im Gefäß auf der einen Seite den Scherkräften des Blutstroms ausgesetzt sind, und auf der anderen Seite in engem Kontakt zur extrazellulären Matrix und Glattmuskelzellen stehen. Eine gezielte Expression von Epac-camps in Endothelzellen der Maus würde unter Verwendung eines Zwei-Photonen-Mikroskops eine cAMP-Messung innerhalb vaskulären Gewebes ermöglichen. Durch die Zwei-Photonen-Technologie können Fluorophore bis zu 100 μ m tief im Gewebe angeregt werden. Diese Technologie wurde bereits bei der Messung von Ca^{2+} -Gradienten in Mausherzen, die mit Ca^{2+} -sensitiven, fluoreszierenden Farbstoffen beladen wurden, angewendet (Rubart *et al.*, 2003). Außerdem wurden Skelettmuskelzellen der Maus mit den FRET-basierten Sensoren für Ca^{2+} (Miyawaki *et al.*, 1997) und cAMP (Nikolaev *et al.*, 2004)

transfiziert, und die Dynamik dieser Signale *in vivo* mit einem Zwei-Photonen-Mikroskop verfolgt (Rudolf *et al.*, 2004; Rudolf *et al.*, 2006).

1.5 Zielsetzung dieser Studie

Ca²⁺- und cAMP-Signale sind für die Physiologie des Endothels von großer Bedeutung, da sie dessen Permeabilität und dadurch den Übergang von Makromolekülen und Flüssigkeit vom Blut ins Gewebe regulieren. Der Koagulationsfaktor Thrombin führt über einen Anstieg der intrazellulären [Ca²⁺] zu einer Lückenbildung zwischen den Zellen und somit zu einer erhöhten Permeabilität. Die Thrombin-induzierten Ca²⁺-Signale wurden durch Fluoreszenzmessungen bereits in Echtzeit in lebenden Endothelzellen untersucht. Ebenso wurde durch Messung des elektrischen Widerstands einer dichten Endothelzellschicht oder durch Messung der Durchlässigkeit eines farbig markierten Proteins die Änderung der Permeabilität in Echtzeit verfolgt. Allerdings ist unklar, wie Thrombin die [cAMP] in Endothelzellen beeinflusst. Immunbiologische Analysen der [cAMP]-Änderungen zeigten zwar, dass Thrombin die cAMP-Level um 30-50 % erniedrigt, aber diese Werte wurden nach einer Inkubationszeit von mehreren Minuten und aus einem Pool an Zellen ermittelt. Außerdem ermöglichen immunbiologische Analysen keine Bestimmung der freien intrazellulären [cAMP].

Da Ca²⁺-Signale sehr schnell sind und cAMP-Signale zeitlich sehr komplex reguliert werden, ist es das Ziel dieser Studie, Thrombin-vermittelte Änderungen von cAMP-Signalen mit hoher zeitlicher Auflösung in einzelnen lebenden Endothelzellen zu untersuchen. Dafür sollen zunächst Endothelzellen mit dem FRET-Sensor Epac1-camps transfiziert, die Auswirkungen von Thrombin sowohl auf basale als auch auf erhöhte cAMP-Spiegel ermittelt, und die Mechanismen der Thrombin-vermittelten Regulation der [cAMP] aufgeklärt werden. Außerdem soll mit Hilfe fluoreszierender Ca²⁺-Indikatoren eine Echtzeitmessung von Ca²⁺-Signalen durchgeführt und der Zeitverlauf zwischen Ca²⁺- und cAMP-Signalen untersucht werden.

Des Weiteren soll ein transgenes Mausmodell mit einer gewebespezifischen Expression von Epac-camps im Endothel generiert werden. Die spezifische Expression von Epac-camps in Endothelzellen mit Hilfe des endothelspezifischen Tie2-Promotors soll schließlich eine FRET-basierte Messung von [cAMP]-Änderungen im intakten Gewebe oder *in vivo* ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial

Amersham (GE Healthcare, München):

ECL Plus;

AppliChem (Darmstadt):

Agar; Ampicillin; APS; Benzamidin; BSA; CaCl_2 ; DMSO; Dithiothreitol (DTT); EDTA; EGTA; Gelatine; Glycin; Hefeextrakt; Hepes; KCl; MgCl_2 ; non-fat dry milk; NaCl; NaF; Natriumlauroylsarcosin; NP-40; $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; Na_3VO_4 ; Paraformaldehyd; Pepton; PMSF; Sodiumdodecylsulfate (SDS); Tris; TritonX-100; Trypton; Tween-20;

Biochrom (Berlin):

Kollagenase A;

Bio-Rad (München):

Bradford Reagenz; Chelex-100 Resin; iQ SYBR Green Supermix; 96 well Real-Time-PCR-Platten;

Calbiochem (Darmstadt):

Mowiol 4-88 Reagenz;

Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA):

CAY10441; Carbaprostacyclin;

Dharmacon (Thermo Fisher Scientific Inc, Lafayette, CO, USA):

siGENOME SMARTpool: für Human-Non-Targeting-siRNA, Human-AC5-siRNA, Human-AC6-siRNA;

Eppendorf (Hamburg):

Desoxyribonukleotide (dNTPs); Taq Polymerase;

Fuji (Düsseldorf):

Röntgenfilme;

Hartenstein (Würzburg):

Filterpapier; Glasplättchen, 24 mm; Objektträger;

Invitrogen (Molecular Probes, Karlsruhe):

Dynabeads (Schaf anti-Ratte); Fluo-4 (AM); Fura-2 (AM); Lipofectamine 2000;

OptiMEM I; SuperScript II Reverse Transcriptase;

J. T. Baker (Deventer, Niederlande):

Ethanol; Isopropanol;

Lonza (Köln):

Basic-Nucleofector-Kit-For-Primary-Endothelial-Cells;

Millipore (Schwalbach):

Human-Plasma-Fibronectin-Purified-Protein; Immobilon-P Membran;

New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main):

DNA Standard; Restriktionsenzyme;

Nunc GmbH (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold):

Zellkulturschalen und -flaschen;

peQLab (Erlangen):

Agarose; peqGOLD Proteinmarker III; peqGOLD TriFast;

Pierce (Thermo Fisher Scientific, Bonn):

BCA Protein Assay Kit; Dialysekammern;

Promega (Mannheim):

Pfu DNA-Polymerase; T4 DNA-Ligase;

Qiagen (Hilden):

Qiagen DNA-Maxiprep; Qiagen Plasmid-Mini-Kit; Qiaquick Gel-Extraction-Kit;

Ratiopharm (Ulm):

Heparin-Natrium (25000 U/ 5 ml)

Roche (Palo Alto, CA, USA):

Adenosindeaminase;

Roth (Karlsruhe):

Acrylamid/ Bisacrylamid (30 %/ 0,8 %; V/V); Ascorbinsäure; Roti-load; TEMED;

Schleicher & Schuell GmbH (Dassel):

Sterilfilter;

Sigma-Aldrich (München):

Acetylsalicylsäure; A23187; BAPTA-AM; cAMP; Endothelial Cell Growth Supplement; Fetal-Calf-Serum (FCS); Indomethacin; Isoproterenol; 8-Methoxymethyl-Isobutylmethylxanthine (8MM-IBMX); Methanol; Pertussis Toxin (PTX); Polyethyleneimine (PEI); Poly-L-Lysin; Proteinase K; RNAsin; Thrombin from human plasma;

Tocris (Bristol, UK):

Forskolin; 5,8,11,14-Eicosatetraenyl-Methylester-Phosphonofluoridic-Acid (MAFP);

2.1.2 Antikörper

Becton Dickinson (Heidelberg):

Monoklonaler Ratte anti-Maus-CD 102 Antikörper;

Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA):

Polyklonaler Kaninchen anti-phospho-ERK Antikörper;

Polyklonaler Kaninchen anti-ERK Antikörper;

Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter anti-Kaninchen Antikörper;

Santa Cruz (Heidelberg):

Ziege anti-human VE-cadherin Antikörper;

Cy3-gekoppelter Esel anti-Ziege Antikörper;

Polyklonaler Kaninchen anti-Adenylatzyklase V/VI Antikörper (sc-590);

Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziege anti-Kaninchen Antikörper;

2.1.3 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers.net GmbH (Ulm) bezogen.

2.1.4 Plasmide

pcDNA3.1 (-)	invitrogen (Karlsruhe)
pcDNA3_Epac1	Dr. Viacheslav O Nikolaev, Würzburg
pcDNA3_Epac2	Dr. Viacheslav O Nikolaev, Würzburg
pcDNA3_AC4	Prof. Dermot MF Cooper, Cambridge, UK
pcDNA3_AC6	Prof. Dermot MF Cooper, Cambridge, UK
pcDNA3_AC8a	Prof. John Krupinski, Manchester, UK
pET3a_CaM	Dr. Ulrike Zabel, Würzburg
pcDNA3_CaM12	Philip Bentley, Hershey, USA
pcDNA3_CaM1234	David Yue, Baltimore, USA
pcDNA3_Cre	Marcus Möller, Heidelberg
pTie2_P/E	Marcus Möller, Heidelberg
pB_MHC	Dr. Viacheslav O Nikolaev, Würzburg
p_XProt	Jack Fransen, Nijmegen, Niederlande

2.1.5 Zellen und Zellkulturmedien

PAN-biotech (Aidenbach):

Dulbecco's-Modified-Eagle's-Medium (DMEM), 4,5 % Glukose;

Dulbecco's-Modified-Eagle's-Medium, 1 % Glukose

Ham's F12 Medium;

Glutamin; Penicillin/Streptomycin; Trypsin/ EDTA; PBS;

Lonza (Köln):

Human-Umbilical-Vein-Endothelial-Cells (HUVECs);

Komplettmedium für Endothelzellen (EBM-2);

PromoCell GmbH (Heidelberg):

Human-Dermal-Microvascular-Endothelial-Cells (HDMECs);

2.1.6 Mauslinien

Tie2-Epac2	diese Arbeit
Tie2-GFP	The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)
Tie2-Cre	Prof. Michaela Kuhn, Würzburg
CAG-CAT-Epac	Kathrin von Hayn, Würzburg

2.1.7 Software

Adobe Photoshop CS4 (München)
 CLAMPEX 9.0 (Axon Instruments, Foster City, CA)
 iCycler iQ real time detection software (Bio-Rad, München)
 Metafluor (Visitron Systems, Puchheim)
 Origin 6.1 (Northampton, MA, USA)
 Prism 4.0 software (San Diego, CA, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli*

E. coli Bakterien (DH5 α ; Stratagene, La Jolla, CA, USA) wurden auf einer LB-Agarplatte (LB: Luria-Bertani) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie gepickt und in 10 ml LB-Medium als Vorkultur über Nacht bei 37°C in einem Rotationsschüttler (180 rpm) hochgezogen. 4 ml dieser Vorkultur wurden dann in 250 ml LB-Medium bis zu einer optischen Dichte von 0,4 (550 nm) bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Dann wurden die Bakterien durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 5000 rpm geerntet und das Bakterienpellet in 10 ml eiskaltem TBS resuspendiert. Nach einer Inkubation von 1-2 h auf Eis wurden die Bakterien aliquotiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt (Chung *et al.*, 1989).

LB-Medium (autoklaviert):	1 % (M/V) Trypton 0,5 % (M/V) Hefeextrakt 1 % (M/V) NaCl H ₂ O
Agarplatten:	1,5 % (M/V) Agar in LB-Medium
TBS (sterilfiltriert):	10 % (M/V) PEG3000 5 % (V/V) DMSO 20 mM MgCl ₂ LB-Medium pH 6,5

elongiert wurde. Für die Durchführung wurden Thermocycler der Firma Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA) verwendet.

PCR-Ansatz:

- ~ 200 ng Plasmid-DNA
- 0,5 μ M Vorwärtsprimer
- 0,5 μ M Rückwärtsprimer
- 300 μ M dNTPs
- 1x Taq-Polymerase-Puffer
- 1 U Taq-Polymerase
- ad 100 μ l H₂O

2.2.1.5 Agarosegelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA, die durch eine PCR oder einen Restriktionsverdau erhalten wurde, dienten in der Regel 1 %ige Agarosegele, die 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid enthielten. Zur Erhöhung der Dichte, wurde der DNA-Lösung Ladepuffer zugegeben, bevor die Taschen des Agarosegels beladen wurden. Als Größenstandard wurden 0,3 μ g eines 1 kb-Markers verwendet. Die Auftrennung der DNA-Fragmente durch Elektrophorese erfolgte bei Spannungen von 8 bis 12 V/cm Trennstrecke in TAE-Laufpuffer. Durch Einlagerung von Ethidiumbromid in die DNA kann diese bei einer Anregung mit 265 nm sichtbar gemacht werden.

50x TAE-Puffer:

- 10 mM EDTA
- 50 mM (CH₃COO)Na
- 400 mM Tris-HCl, pH 8

Ladepuffer:

- 0,25 % (M/V) Bromphenolblau
- 50 % (V/V) Glycerin
- 50 % (V/V) H₂O

2.2.1.6 Klonierung verschiedener Plasmide

Zur Klonierung von pcDNA3_CaM wurden jeweils 7 μ g von pcDNA3 (-) und pET3a_CaM mit jeweils 2,5 μ l der Restriktionsenzyme XbaI und BamHI unter Verwendung des vom Hersteller empfohlenen Puffers über Nacht bei 37°C verdaut. Die gewünschten Fragmente wurden durch eine Auftrennung über ein 1 %iges Agarosegel und eine anschließende

Aufreinigung aus dem Gel mit Hilfe des QIAquick-Gel-Extraction-Kit (Qiagen) erhalten. Dabei wurde der linearisierte Vektor in 50 μl H₂O und CaM in 25 μl H₂O von den Säulen eluiert. Zur Klonierung von CaM in den linearisierten Vektor pcDNA3 wurden verschiedene Ligationsansätze pipettiert und diese über Nacht bei 14°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde jeweils der gesamte Ligationsansatz in *E. coli* transformiert und der Transformationsansatz auf LB-Platten plus Ampicillin ausplattiert. Einzelne Kolonien wurden gepickt und die Plasmid-DNA mit dem Qiagen Plasmid-DNA-Purification-Kit nach Angaben des Herstellers amplifiziert (Qiagen Plasmid-Mini-Kit). Durch einen Restriktionsverdau mit entsprechenden Enzymen konnten positive Klone identifiziert werden, deren Plasmid-DNA in einem größeren Maßstab präpariert (Qiagen Plasmid-Midi-Kit) und schließlich sequenziert wurde (MWG biotech GmbH, Martinsried).

Ligationsansätze:

	Vektor	CaM	T4-DNA Ligase	10x Ligasepuffer	H ₂ O
I	1 μl	5 μl	1 μl	1,5 μl	6,5 μl
II	1 μl	10 μl	1 μl	1,5 μl	1,5 μl

Zur Klonierung von pTie2_Epac2, das schließlich zur Generierung transgener Mäuse als linearisiertes Konstrukt in Maus-Eizellen injiziert wurde, wurden Epac2-camps und eine SV40pA-Sequenz in den Vektor pTie2_P/E kloniert. Das Plasmid pTie2_P/E enthält den endothelspezifischen Tie2-Promotor und ein Enhancerelement aus dem ersten Intron des *TIE2*-Gens, das für eine verstärkte Transkription des Transgens (hier Epac2-camps) sorgt (Schläger *et al.*, 1997). Epac2-camps und die SV40pA-Sequenz wurden zwischen den Tie2-Promotor und das Enhancerelement eingefügt.

Um mehrere Restriktionsenzyme zur Klonierung verwenden zu können, musste ein Oligolinker in das Plasmid eingefügt werden. Zuerst wurde pTie2_P/E mit ClaI und SpeI linearisiert und das aufgereinigte Konstrukt in 50 μl Elutionspuffer aufgenommen. Durch den ClaI/SpeI-Verdau wurde auch der Tie2-Promoter ausgeschnitten und musste deshalb später wieder eingefügt werden. Nun wurde die Linkersequenz über Oligonukleotide eingefügt. Dazu wurden jeweils 25 μl der 100 μM Oligonukleotide Tie2_linker vorwärts und Tie2_linker rückwärts für 20 min bei 65°C inkubiert. Die dabei erfolgte Hybridisierung von Tie2_linker vorwärts und Tie2_linker rückwärts erzeugte Überhänge der ClaI- und der SpeI-

Schnittstelle, sodass die hybridisierten Oligonukleotide durch Ligation in den linearisierten Vektor eingefügt werden konnten. Über den Oligolinker wurden eine SmaI- und eine NheI-Schnittstelle in das Plasmid eingefügt, die nachfolgend verwendet wurden, um den Tie2-Promotor, Epac2-camps und SV40pA in den Vektor einzufügen.

Zuerst wurde über NheI/SpeI die SV40pA-Sequenz eingefügt. Die SV40pA-Sequenz mit den entsprechenden Schnittstellen wurde über eine PCR erzeugt. Als Template-DNA wurde das Plasmid pB_MHC verwendet. Das aufgereinigte Fragment und der Klonierungsvektor wurden mit NheI und SpeI verdaut und schließlich in 25 µl (SV40pA) bzw. 40 µl (Vektor) Elutionspuffer aufbewahrt. SV40pA wurde in einem 6-fachen bzw. 12-fachen Überschuss in den Vektor ligiert (20 min bei Raumtemperatur).

Anschließend wurden positive Klone identifiziert und deren Plasmid-DNA nachfolgend für die Insertion des Tie2-Promotors verwendet. Dazu wurde der Vektor mit ClaI und SmaI verdaut, aufgereinigt und in 50 µl Elutionspuffer aufgenommen. Außerdem wurde der Tie2-Promotor mit Hilfe der Restriktionsenzyme ClaI und SmaI aus pTie2_P/E ausgeschnitten, aufgereinigt und ebenso in 50 µl Elutionspuffer aufbewahrt. Bei der Ligation (20 min bei Raumtemperatur) wurde der Tie2-Promotor im Überschuss (3x, 6x oder 12x) eingesetzt.

Abschließend wurde Epac2-camps über SmaI und NheI in den Vektor eingefügt. Die Sequenz mit den entsprechenden Schnittstellen wurde über eine PCR erzeugt. Als template-DNA diente pcDNA3_Epac2. Epac1-camps konnte nicht eingefügt werden, da sich in dessen Sequenz eine SmaI-Schnittstelle befindet. Ein nachfolgender Restriktionsverdau des PCR-Produktes und des Vektors mit SmaI und NheI und die anschließende Ligation lieferte schließlich das Plasmid pTie2_Epac2.

Primer

Tie2_linker_vorwärts	5'-CGATAAACCCGGGAAAGCTAGCAAAAAA-3'
Tie2_linker_rückwärts	5'-CTAGTTTTTTTGCTAGCTTTCCCGGGTTTAT-3'
SV40_NheI_vorwärts	5'-AAAGCTAGCGGCGCCCCAGCTTGGATCTTTGTGAAG-3'
SV40_SpeI_rückwärts	5'-AAAAGCTAGTGGATCCAGACATGA-3'
Epac2_SmaI_vorwärts	5'-AAACCCGGGATGGTGAGCAAGGGCGAG-3'
Epac2_NheI_rückwärts	5'-AAAGCTAGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'

2.2.2 Generierung transgener Mäuse mit endothelspezifischer Expression von Epac-camps

2.2.2.1 Präparation des DNA-Konstrukts für die Mikroinjektion in Maus-Eizellen

Zur Mikroinjektion in Maus-Eizellen (Pronukleus-Injektion) wurden 40 µg von pTie2_Epac2 zur Linearisierung über Nacht mit ClaI und SacII verdaut und das linearisierte Konstrukt anschließend über Agarosegelelektrophorese (1 % Agarose) präpariert. Beim Ausschneiden der entsprechenden Bande aus dem Gel wurde darauf geachtet, die DNA nur möglichst kurz dem UV-Licht auszusetzen um Strangbrüche zu vermeiden. Die linearisierte DNA wurde dann mit 200 µl sterilem TE-Puffer und unter Verwendung zweier Säulen des Qiagen Gel-Extraction-Kits von den Säulen eluiert. Nun wurde über ein Agarosegel (1 % Agarose) eine erste Konzentrationsabschätzung vorgenommen. Dazu wurde das Eluat 1:10 vorverdünnt und davon 10, 5, 3 und 1 µl parallel zu einem Standard mit einer Konzentration von 2 ng/µl aufgetragen. Für die folgende Dialyse wurde die DNA auf eine Konzentration >10 ng/µl vorverdünnt. Bei der Dialyse selbst kommt es zu einer Verdünnung von 1:2. Zwei Sterilfilter wurden mit jeweils 10 ml sterilem TE-Puffer vorgespült, dann die vorverdünnte DNA mit einer 1 ml-Spritze langsam durch die beiden Filter durchgedrückt. Anschließend wurden die Dialysekammern mit einer Kanüle beladen und viermal in je 500 ml sterilem TE-Puffer dialysiert, davon dreimal für 2 h bei Raumtemperatur und einmal über Nacht bei 4°C. Nach dem Entladen der Dialysekammer mit einer Kanüle wurden 6, 4, 3, 2 und 1 µl des Dialysats parallel zur Standard-DNA (2 ng/µl; 6, 4, 3, 2, 1 µl) auf ein Agarosegel aufgetragen um die Konzentration zu bestimmen. Das Dialysat wurde auf eine Endkonzentration von 1-5 ng/µl verdünnt und bei -20°C bis zur Mikroinjektion aufbewahrt.

TE-Puffer (steril):

Aqua ad injectabilia

10 mM Tris pH 7,4 (sterilfiltriert)

100 µM EDTA (sterilfiltriert)

2.2.2.2 Präparation genomischer DNA und Genotypisierung der Mäuse

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde eine Schwanzspitzenbiopsie vorgenommen. Die Schwanzspitze wurde über Nacht in 200 ml Lysispuffer und 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) bei 55°C unter starkem Schütteln verdaut. Am folgenden Tag wurden die Proben nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (2 min bei 13000 rpm) für 10 min auf 95°C erhitzt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 8 min bei 13000 rpm befand sich die genomische DNA im

Die PCR lief nach folgendem Programm ab: Nach einem Denaturierungsschritt bei 94°C für 3 min, wurden 30 Zyklen bestehend aus jeweils 20 s bei 94°C, 20 s bei 55°C und 40 s bei 72°C, durchgeführt, gefolgt von einer finalen Elongationsphase von 7 min bei 72°C. Die PCR-Ansätze wurden anschließend mit 1x Ladepuffer versetzt und auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt.

2.2.2.3 Kreuzung der Linien CAG-CAT-Epac und Tie2-Cre und Genotypisierung der Nachkommen

Eine weitere Möglichkeit transgene Mäuse mit einer endothelspezifischen Expression von Epac-camps zu generieren, war die Verwendung eines Cre-Rekombinase/loxP-Ansatzes. Dazu wurden Tiere der transgenen Mauslinien CAG-CAT-Epac (K von Hayn, Würzburg) und Tie2-Cre (Prof. M Kuhn, Würzburg) gekreuzt (Kawamoto *et al.*, 2000; Kisanuki *et al.*, 2001).

Zur Genotypisierung der Nachkommen wurde genomische DNA aus der Schwanzspitze präpariert und eine PCR durchgeführt. Durch die Verwendung CAG-CAT-Epac- und Tie2-Cre-spezifischer Primer wurde getestet, welche Nachkommen beide transgene Allele erhalten haben.

	Primer	Fragment
CAG-CAT-Epac_vorwärts	5'-AAGGGTTCCGGATCCAAGC-3'	
CAG-CAT-Epac_rückwärts	5'-TTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'	800 bp
Tie2-Cre_vorwärts	5'-CGCATAACCAGTGAAACAGCATTGC-3'	
Tie2-Cre_rückwärts	5'-CCCTGTGCTCAGACAGAAATGAGA-3'	550 bp

Der PCR-Ansatz und das PCR-Programm wurden analog der Genotypisierung der Tie2-Epac2 Mäuse erstellt (siehe 2.2.2.2).

2.2.2.4 Präparation von pulmonären Endothelzellen aus transgenen Mäusen

Die Präparation pulmonärer Endothelzellen aus transgenen Mäusen erfolgte mit Unterstützung von Birgit Gaßner (Institut für Physiologie, Universität Würzburg). Präparierte Lungenteile wurden mechanisch mit einer Schere zerkleinert, bevor sie in eine vorgewärmte Kollagenase-Lösung (0,1 % Kollagenase in Dulbecco's-Modified-Eagle's-Medium, DMEM)

gegeben und 1 h bei 37°C verdaut wurden. Die verdaute Lunge wurde danach 12x mit einer stumpfen, großen Kanüle und einer 20 ml Spritze vorsichtig aufgezogen und die Zellsuspension anschließend durch ein Metallsieb (Maschengröße: 150 µM) in ein 50 ml-Röhrchen gefiltert. Die gefilterte Suspension wurde dann für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in Kompletmedium aufgenommen und in mit Gelatine beschichtete (0,1 % Gelatine in H₂O) Flaschen ausgesät (Lunge einer Maus in eine T75-Flasche). Die Zellen wurden bei 5 % CO₂ und 37°C kultiviert. Am folgenden Tag wurde die Flasche 10x mit Medium gespült und kräftig gegen die Hand geklopft um Blutzellen und abgestorbene Zellen abzulösen. Nach Absaugen des alten Mediums wurde erneut 5x mit frischem Medium gespült und danach frisches Kompletmedium zugegeben. Das Kompletmedium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Nach etwa 5 Tagen wurde eine erste Selektion mit Antikörper-beschichteten Kügelchen (Dynabeads) durchgeführt. Hierfür wurden etwa zwei Millionen Dynabeads (Schaf anti-Ratte) mit 5 µl endothelspezifischen Antikörper (Ratte anti-Maus CD102) in 500 µl PBS/ 2 % FCS vermischt, und für 2 h bei 4°C rotierend inkubiert. Mit Hilfe eines Magnetständers wurden die Beads anschließend 3x mit PBS/ 2 % FCS gewaschen und schließlich in 500 µl PBS/ 2 % FCS aufgenommen. Die Zellen in den Flaschen wurden 5 min auf Eis gelagert bevor die Antikörper-beschichteten Beads zugegeben wurden. Danach wurden die Zellen 1 h bei 4°C mit den Beads inkubiert. Dann wurde das Medium und nicht haftende Beads abgesaugt, die Zellen durch Inkubation mit Trypsin abgelöst und in ein Röhrchen gegeben. Mit Hilfe eines Magnetständers wurden die an Dynabeads gebundenen Endothelzellen von Fibroblasten und anderen Zellen abgetrennt. Die so selektionierten Endothelzellen wurden erneut in Kompletmedium in Gelatine-beschichtete Flaschen ausgesät. Etwa am zwölften Tag nach der Präparation wurde die Selektion wiederholt und die Endothelzellen schließlich auf Gelatine- oder Fibronectin-beschichtete Glasplättchen zur Mikroskopie ausgesät.

Kompletmedium:

- 36,8 % (V/V) DMEM, 1 % Glukose
- 36,8 % (V/V) Ham's F12
- 16,5 % (V/V) FCS
- 10 % (V/V) L-Glutamin
- 0.1 mg/ml Streptomycin
- 100 U/ml Penicillin
- 100 µg/ml Heparin
- 75 µg/ml Endothelial-Cell-Growth-Supplement

2.2.2.5 Präparation des Musculus Cremaster aus transgenen Mäusen

Um eine eventuelle Expression von Epac-camps im Endothel in intakten Gefäßen eines Gewebes zu überprüfen wurde der sehr dünne Musculus Cremaster präpariert. Die Präparation des Musculus Cremaster aus transgenen Mäusen wurde, wie von Baez (1973) beschrieben, durch Barbara Schreier (Institut für Physiologie, Universität Würzburg) durchgeführt.

2.2.3 Zellkultur und Zelltransfektionen

Human-Umbilical-Vein-Endothelial-Cells (HUVECs) und Human-Dermal-Microvascular-Endothelial-Cells (HDMECs) wurden in Kompletmedium (EBM-2) bei 5 % CO₂ und 37°C gehalten. Sie wurden zweimal die Woche 1:3 gesplittet und etwa 12 Passagen kultiviert. Mit Hilfe der Amaxa Nucleofector Technologie wurden die Zellen nach Angabe des Herstellers mit Plasmid-DNA transfiziert (Basic-Nucleofector-Kit-For-Primary-Endothelial-Cells; Programm M-03). Dabei wurden 5×10^5 HUVECs/ HDMECs mit maximal 3 µg DNA transfiziert. Die Transfektion der HUVECs/ HDMECs mit dem Plasmid für die Expression von Epac1-camps (Nikolaev *et al.*, 2004) mithilfe dieser Elektroporation erzielte Transfektions-Effizienzen von über 50 %. Für nachfolgende FRET-Messungen wurden die HUVECs/ HDMECs auf Fibronectin-beschichtete Glasplättchen (Human-Plasma-Fibronectin-Purified-Protein) ausgesät. Die FRET-Messungen wurden 24 h nach der Transfektion durchgeführt. Etwa 1 h vor den FRET-Messungen wurde dem Medium 0,5 U/ml Adenosindeaminase zugesetzt.

siRNA (Non-Targeting-siRNA, Human-AC5-siRNA und Human-AC6-siRNA), die jeweils aus einem Pool von vier unabhängigen siRNA-Molekülen (siGENOME SMARTpool) besteht, wurde 72 h vor FRET-Messungen transfiziert. Für die Transfektion wurde Lipofectamin 2000 nach Angabe des Herstellers verwendet. 70 %-konfluente HUVECs wurden in einer 5 cm Kulturschale mit insgesamt 600 pmol siRNA (Non-Targeting-siRNA oder AC5- und AC6-siRNA zusammen) transfiziert. Dazu wurden 30 µl einer 20 µM siRNA-Lösung 1:10 mit OptiMEM I verdünnt, außerdem wurden 20 µl Lipofectamin 2000 in 300 µl OptiMEM I aufgenommen und beide Ansätze für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie zusammenpipettiert wurden. Nach einer weiteren Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur wurde der Ansatz tropfenweise auf den Zellen verteilt und Medium bis zu einem Endvolumen von 6 ml zugegeben. Nach 6 h wurde das Medium mit der Transfektionslösung abgenommen und neues Medium zugegeben. Zwei Tage nach der

siRNA-Transfektion wurden die Zellen für eine FRET-Messung mit Epac1-camps wie oben beschrieben transfiziert.

HEK-tsA 201 Zellen wurden in Dulbecco's-Modified-Eagle's-Medium (DMEM), dem 2 mM Glutamin, 10 % (V/V) FCS, 0.1 mg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin zugesetzt wurde, bei 5 % CO₂ gehalten. HEK-tsA 201 Zellen wurden mit Hilfe von Polyethyleneimine (PEI) transfiziert. Der Transfektionsansatz, bestehend aus 2 µg DNA und 12,5 µg PEI, wurde in 625 µl DMEM gelöst und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor er auf Zellen in einer 5 cm Schale, die etwa 70 % konfluent waren, gegeben wurde. Am nächsten Morgen wurde das Transfektionsmedium durch frisches DMEM ersetzt.

2.2.4 Reverse Transkriptase-PCR und Real-Time-PCR

Um eine siRNA-vermittelte Herunterregulierung der AC5- und/oder AC6-mRNA zu überprüfen wurde aus siRNA-transfizierten HUVECs RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben (Reverse Transkriptase-PCR: RT-PCR) und die relativen mRNA-Mengen schließlich durch eine quantitative Real-Time-PCR ermittelt.

Zur Fällung von RNA wurden die HUVECs einer konfluenten 5 cm Schale, die entweder mit Non-Targeting-siRNA oder einer Mischung aus AC5- und AC6-siRNA transfiziert wurden, mit 1,5 ml peqGOLD TriFast abgelöst und die Zellsuspension 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, währenddessen die Suspension immer wieder geschüttelt wurde. Danach wurde 300 µl Chlorophorm zugegeben, 15 s geschüttelt und anschließend 8 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem 5-minütigem Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm waren zwei Phasen erkennbar, von denen die obere in ein neues Reagenzgefäß pipettiert und mit 500 µl Isopropanol versehen wurde. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 10 min und danach eine Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 14000 rpm. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit jeweils 500 µl Ethanol gewaschen und anschließend für 5 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Schließlich wurde das RNA-Pellet in 20 µl RNase-freiem H₂O resuspendiert und die Konzentration durch Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt. Eine Absorption von 1 entsprach einer Konzentration von 40 ng/µl RNA.

Nun wurde durch eine RT-PCR die RNA in cDNA umgeschrieben. Für jede siRNA-Transfektion (Non-Targeting- bzw. AC5/AC6-siRNA) und für jeden Transfektionstag (n=3) wurden jeweils 5 RT-Ansätze angesetzt. Dazu wurde je 1 µg RNA in 9 µl RNase-freiem H₂O aufgenommen, 2,5 µM Oligo-dTTP und 0,5 mM dNTPs zugegeben und der Ansatz für 10 min bei 70°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde der RT-Mix zugegeben (Endvolumen: 20 µl). Die Transkription durch die Superscript Reverse Transkriptase erfolgte

GAPDH vorwärts 5'-CCAGGCGCCCAATACG-3'
 rückwärts 5'-CCACATCGCTCAGACACCAT-3'

Die Real-Time-PCR lief nach folgendem Programm ab: auf einen 2-minütigen Denaturierungsschritt folgten 40 Zyklen mit einer Denaturierung bei 94°C für 15 s, einer Primerbindungsphase bei 56°C für 30 s und einer Verlängerungsphase bei 72°C für 40 s.

Durch Anwendung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode (Livak & Schmittgen, 2001) wurde jeweils die Veränderung der AC5 bzw. AC6 Transkripte nach siRNA-Transfektion auf die GAPDH Transkripte normalisiert und relativ zu den Transkripten der Kontrollzellen dargestellt.

2.2.5 Fluoreszenzmessungen

2.2.5.1 *In vitro*-Kalibrierung von Epac1-camps

Die *in vitro* Kalibrierung von Epac1-camps wurde mit Hilfe von Lysaten transfizierter HEK-293T Zellen durchgeführt. 40 h nach der Transfektion mit Epac1-camps wurden die HEK-293T Zellen dreimal mit PBS gespült und in hypotonen Lysepuffer (5 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7,4) aufgenommen. Die suspendierten Zellen wurden danach zusätzlich mechanisch mit Hilfe eines Ultraturrax-Gerätes zerstört (20 s) und die Membranen und Organellen 20 min bei 278835 x g abzentrifugiert. Nun wurde der Überstand verwendet, um Fluoreszenz-Emissionsspektren in einem Bereich von 460-550 nm bei einer Anregungswellenlänge von 436 nm mit dem Fluoreszenz-Spektrometer LS50B (PerkinElmer Life Sciences, Waltham, MA, USA) aufzunehmen. Es wurden die Fluoreszenzspektren ohne cAMP und nach Zugabe verschiedener cAMP-Konzentrationen gemessen. Die jeweils maximalen Signale der CFP-(F_{CFP}) und YFP-(F_{YFP}) Emissionen wurden bestimmt, und jeweils F_{YFP}/F_{CFP} und $\Delta F_{YFP}/F_{CFP}$ (relativ zum basalen F_{YFP}/F_{CFP} ohne cAMP-Zugabe) errechnet. Mit Hilfe des Software Programms Prism 4.0 wurde [cAMP] gegenüber $\Delta F_{YFP}/F_{CFP}$ in Prozent des maximalen $\Delta F_{YFP}/F_{CFP}$ dargestellt.

2.2.5.2 FRET-Messungen in lebenden Zellen

Konfluente, mit Epac1-camps transfizierte HUVECs, die auf einem mit Fibronectin beschichteten Glasplättchen ausgesät wurden, wurden für FRET-Messungen auf einem 63x Öl-Immersion-Objektiv eines invertierten Axiovert 200 Mikroskopes (Zeiss, Jena) platziert. Zur Anregung wurde eine Polychrom IV-Lichtquelle und zur Aufnahme der Emissionen ein Dual-Emission-photometrisches System verwendet (TILL Photonics, Gräfelfing). Die Belichtungszeit betrug in der Regel 50 ms bei einer Frequenz von 1 Hz. Einzelne Epac1-camps-exprimierende Zellen wurden mit einer Wellenlänge von 436 ± 10 nm angeregt (Filter:

bei einer Frequenz von 1 Hz. Fluo-4 wird mit 490 nm angeregt (exciter ET470/40x, dichroic T495LP), und die Emission einzelner Zellen bei 535 ± 15 nm (DCLP 505 nm) detektiert. Die Intensität der Fluoreszenz wird bei Ca^{2+} -Bindung erhöht.

Für die Ca^{2+} -Messungen mit Fura-2 (AM) wurden HUVECs auf Fibronektin-beschichteten Glasplättchen zweimal mit PBS gespült und danach 60 min mit 2 μM Fura-2 (AM) bei 37°C inkubiert. Nach einem erneuten Waschgang wurden die Zellen 45 min im Dunkeln bei Raumtemperatur in PBS inkubiert. Bis zur Messung wurden die HUVECs dann in serumfreien Medium bei 37°C aufbewahrt. Die Ca^{2+} -Messungen mit Fura-2 wurden ebenfalls an einem invertierten Axiovert 200 Mikroskop (Zeiss, Jena) durchgeführt. Dabei wurden Abbildungen der Zellen mit Hilfe einer CoolSNAP-HQ CCD-Kamera (Zeiss, Jena) aufgenommen und die Bilddaten mit Metafluor (Visitron Systems, Puchheim) ausgewertet. Die Zellen wurden abwechselnd mit 340 nm bzw. 380 nm (400 DLCP; D 510/80; AHF Analystechnik AG, Tübingen) durch einen Monochromator (Polychrome IV, TILL-Photonics, Garching) angeregt. Die Anregung erfolgte jede Sekunde für jeweils 100 ms. Ein intrazelluläres Ca^{2+} -Signal führt zu einem Anstieg der ratiometrischen Emission (Anregung bei 340 nm / Anregung bei 380 nm).

2.2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.2.6.1 Herstellung von Zellmembranen und Zelllysaten zur Western Blot-Analyse

Zum Nachweis der membranständigen AC5 und AC6 im Western Blot wurden die Zellmembranen von transfizierten HEK-tsA 201 Zellen oder von HUVECs präpariert. Dazu wurden die Zellen einer jeweils dicht bewachsenen 5 cm Schale mit Trypsin abgelöst. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min bei 100 g) zur Ernte der Zellen, wurden diese in je 200 μl hypotonen Lysepuffer aufgenommen. Es folgten ein dreimaliges Gefrieren in flüssigem N_2 und eine anschließende mechanische Zerkleinerung der Zellfragmente durch Auf- und Abpipettieren der Suspension durch eine enge Kanüle. Um die Zellkerne abzutrennen wurde die Suspension anschließend 10 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der die Membranen enthält, wurde schließlich mithilfe eines Ultraschallstab homogenisiert und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt. Die Methode nach Bradford basiert auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine und auf der darauffolgenden Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm. Es wurde jeweils die Absorption von 20 μl der Membransuspension in 1 ml Bradford-Reagenz bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Kalibrierungsgerade mit BSA berechnet.

Hypotoner Lysepuffer: 2 mM EDTA
 5 mM Tris
 pH 7,4

Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben 5 min bei Raumtemperatur mit 1,5 % (M/V) SDS und 1,5 % (V/V) β -Mercaptoethanol inkubiert, danach mit 8,5 % Ladebuffer versetzt und schließlich für 10 min bei 60°C hitzedenaturiert.

Ladebuffer: 0,25 % (M/V) Bromphenolblau
 50 % (V/V) Glycerin
 50 % (V/V) H₂O

Um eine effiziente Inhibierung von G_i durch PTX zu bestätigen wurde durch eine Western Blot-Analyse die G_i-vermittelte Phosphorylierung von ERK überprüft. Hierfür wurden HUVEC-Lysate verwendet. Eine definierte Zahl an HUVECs wurde in mehrere Schalen einer 12 well-Platte ausgesät und die Zellen für 6 h in Medium ohne Serum und sonstige Zusätze wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren jeweils mit oder ohne PTX (0,2 mg/ml) gehalten. Dann wurden die Zellen in jeweils 300 μ l Lysepuffer aufgenommen, die Suspensionen mit dem Ultraschallstab behandelt und die so homogenisierten Proben zur Denaturierung der Proteine für 10 min auf 60°C erhitzt.

Lysepuffer: Roti-load
 50 mM NaF
 5 mM Na₄P₂O₇
 0,1 mM Na₃VO₄
 1 mM PMSF
 0,06 mg/ml benzamidin

2.2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von Proteinen nach dem Molekulargewicht verwendet. Dabei wurden die durch das SDS denaturierten Proteine zuerst in einem niedrig-prozentigen Sammelgel (5 %) bei 80 V

sie für 20 min mit 10 % normalen Esel-Serum geblockt wurden. Die Zellen wurden über Nacht bei 4°C mit dem Erst-Antikörper (Ziege anti humanes VE-Cadherin, 1:100 in PBS) inkubiert, dann dreimal mit PBS gespült, bevor sie mit dem Cy3-gekoppelten Zweit-Antikörper (Esel anti-Ziege IgG, 1:600) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die fixierten Zellen mit Mowiol eingedeckt um ein Austrocknen zu vermeiden, und die VE-Cadherin-Verteilung der Zellen an einem Leica SP5 Konfokalmikroskop untersucht.

2.2.7 Datenauswertung und statistische Analysen

Die Intensitäten der Fluoreszenzen wurden mit dem Softwareprogramm CLAMPEX 9.0 (Axon Instruments, Foster City, CA) ermittelt. Ratiometrische Berechnungen wurden mit Hilfe von Origin 6.1 (Northampton, MA, USA) durchgeführt, und für statistische Analysen wurde Prism 4.0 (San Diego, CA, USA) verwendet. Alle Werte sind als Mittelwert±Standardfehler dargestellt. Um zwei unabhängige Gruppen zu vergleichen, wurde der Student's unpaired t Test angewandt und Differenzen galten bei einem Wert von $p < 0,05$ (two-tailed) als signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Thrombin verursacht die transiente Abnahme einer erhöhten cAMP-Konzentration im Zellkultursystem

Die Permeabilität des Endothels wird maßgeblich durch die sekundären Botenstoffe Ca^{2+} und cAMP reguliert. Während cAMP die Aufrechterhaltung der endothelialen Barriere unterstützt, führt Ca^{2+} zu einem Permeabilitätsanstieg. Da Ca^{2+} - und cAMP-Signale sich auch gegenseitig regulieren, war es das Ziel dieser Studie den Einfluss eines Thrombin-induzierten Ca^{2+} -Signals auf den cAMP-Spiegel und das zeitliche Muster dieser Signale zu untersuchen. Dazu wurden Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und [cAMP] (intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bzw. cAMP-Konzentration) in Echtzeit in lebenden Endothelzellen unter Anwendung des Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffs Fluo-4 und des FRET-basierten cAMP-Sensors Epac1-camps gemessen.

Da Permeabilitätsmessungen zeigten, dass erhöhte cAMP-Spiegel einen Thrombin-induzierten Permeabilitätsanstieg zwar verminderten und zeitlich verkürzten, jedoch einen initialen Permeabilitätsanstieg nicht vollständig verhindern konnten (Fukuhara *et al.*, 2005; Qiao *et al.*, 2003), sollte überprüft werden, ob Thrombin-induzierte Ca^{2+} -Signale eventuell zu einer Verringerung einer vorher erhöhten [cAMP] führen und so einen initialen Permeabilitätsanstieg verursachen können. Durch die FRET-basierte Echtzeitmessung sollte auch erstmals die Kinetik einer Ca^{2+} -induzierten [cAMP]-Änderung bestimmt werden. Deshalb wurden die Endothelzellen zunächst mit dem β -adrenergen Agonisten Isoproterenol vorstimuliert, um die [cAMP] durch die G_s -Aktivierung zu erhöhen, und dann die Auswirkungen einer folgenden, zusätzlichen Stimulation mit Thrombin auf die [cAMP] untersucht.

3.1.1 Thrombin führt in mikro- und makrovaskulären Endothelzellen zu einer transienten Abnahme eines erhöhten cAMP-Spiegels

Da gezeigt wurde, dass Endothelzellen unterschiedlichen vaskulären Ursprungs unterschiedlich auf Thrombin reagieren (Cioffi *et al.*, 2002), wurde der Einfluss von Thrombin auf eine erhöhte [cAMP] zunächst sowohl in mikrovaskulären als auch in makrovaskulären Endothelzellen untersucht. Deshalb wurden Human-Dermal-Microvascular-Endothelial-Cells (HDMECs; Baumer *et al.*, 2008 bzw. 2009) und Human-Umbilical-Vein-Endothelial-Cells (HUVECs; Bunday & Insel, 2003) mit Epac1-camps transfiziert. Um nicht in den Sättigungsbereich des cAMP-Sensors Epac1-camps zu gelangen, wurden die Zellen mit einer Konzentration des β -adrenergen Agonisten Isoproterenol stimuliert, die zu einer etwa halbmaximalen Änderung des ratiometrischen FRET-Signals führt. Zur Erstellung einer

Konzentrations-Wirkungskurve für Isoproterenol (Abb. 7) wurden Epac1-camps-transfizierte HUVECs mit ansteigenden Konzentrationen an Isoproterenol stimuliert und die jeweilige Änderung des ratiometrischen FRET-Signals ($\Delta FRET$) gegenüber der maximalen Änderung des ratiometrischen FRET-Signals ($\Delta FRET_{max}$) ermittelt.

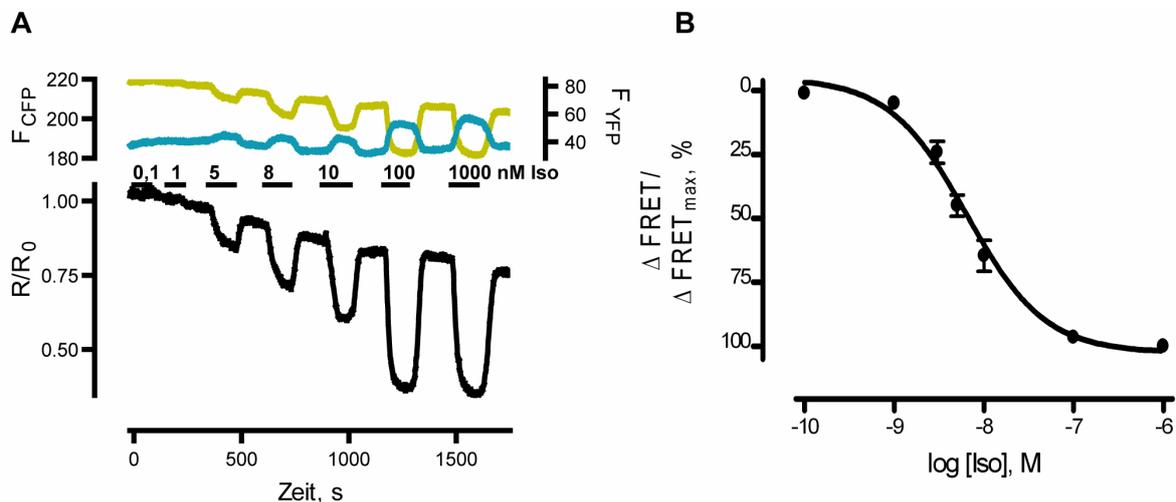


Abb. 7: Isoproterenol-Konzentrations-abhängige Änderungen des ratiometrischen FRET-Signals

Einzelne HUVECs, die Epac1-camps exprimierten, wurden mit steigenden Konzentrationen an Isoproterenol stimuliert (Beispielzelle, A). Dies führte konzentrationsabhängig zu einer Abnahme von F_{YFP} (gelb), einer Zunahme von F_{CFP} (cyan) und somit zu einer Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals R/R_0 (schwarz). Die Erstellung einer Konzentrations-Wirkungskurve (B) ergab einen EC_{50} von $8,1 \pm 1,2$ nM Isoproterenol ($n=9$).

Die Stimulation einzelner Zellen mit Isoproterenol führte konzentrationsabhängig zu einer Abnahme der YFP-Emission (F_{YFP}) und einem Anstieg der CFP-Emission (F_{CFP}) und somit zu einer Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals (R). Das ratiometrische FRET-Signal wurde in allen folgenden Versuchen auf das Signal zum Zeitpunkt 0 s (R_0) normalisiert (vgl. 2.2.5.2) und wird fortan als R/R_0 bezeichnet (Abb. 7A). Eine Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals korreliert aufgrund der Konformationsänderung von Epac1-camps mit einer Zunahme der [cAMP] (vgl. 1.4). Mit Hilfe der Konzentrations-Wirkungskurve für Isoproterenol (Abb. 7B) wurde eine halbmaximal effektive Konzentration (EC_{50}) von $8,1 \pm 1,2$ nM Isoproterenol ermittelt ($n=9$). Deshalb wurden in den folgenden Experimenten einzelne HDEMCS bzw. HUVECs mit 10 nM Isoproterenol vorstimuliert, um die [cAMP] zu erhöhen. Sobald das ratiometrische FRET-Signal nach dieser Vorstimulation mit Isoproterenol stabil und damit die [cAMP] konstant blieb, wurde die entsprechende Zelle zusätzlich mit Thrombin stimuliert (10 U/ml).

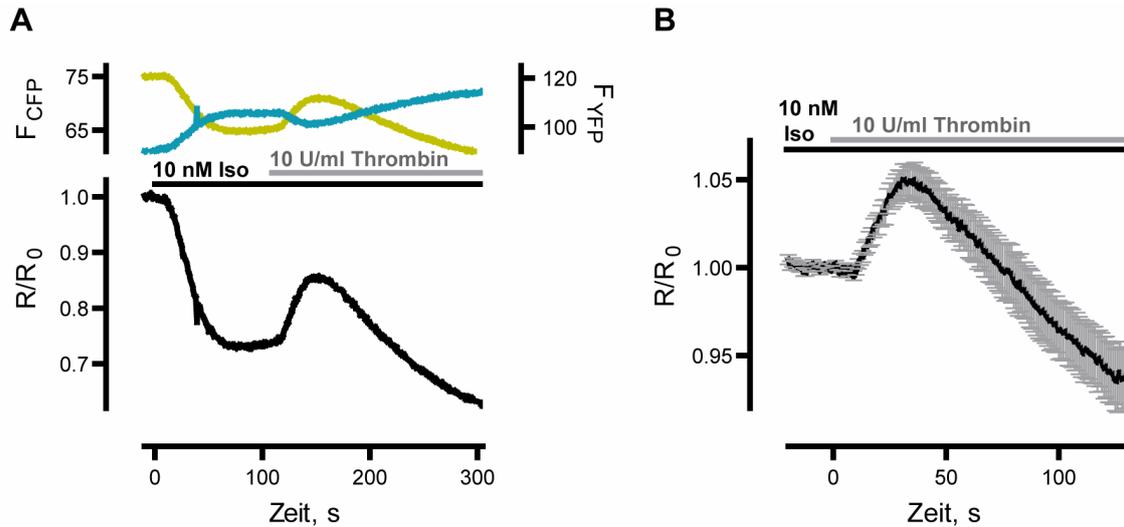


Abb. 8: Thrombin induziert in HDMECs die transiente Abnahme einer erhöhten [cAMP]

Einzelne HDMECs wurden mit Isoproterenol (10 nM) vorstimuliert um die [cAMP] zu erhöhen. Dies führte zu einer Abnahme von F_{YFP} (gelb) und einer Zunahme von F_{CFP} (cyan) und somit zu einer Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals (R/R_0). Eine folgende zusätzliche Stimulation mit Thrombin führte zu einer transienten Zunahme von R/R_0 (Beispielmessung, A). R/R_0 erreichte durchschnittlich etwa 30 s nach Thrombin-Zugabe ein Maximum und fiel dann wieder ab (B, gemittelte Daten aus 18 Einzelmessungen).

Die Stimulation einzelner Endothelzellen (HDMECs und HUVECs) mit Isoproterenol (10 nM) führte zu einer Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals, was gleichbedeutend mit einer Zunahme der [cAMP] ist (Abb. 8A und Abb. 9). Eine zusätzliche Stimulation dieser Zellen mit Thrombin (10 U/ml) führte sowohl in HDMECs (Abb. 8A) als auch in HUVECs (repräsentatives Beispiel, Abb. 9) zu einem transienten Anstieg des ratiometrischen FRET-Signal und somit zu einer transienten Abnahme der [cAMP]. In HDMECs erreichte die durch Thrombin verringerte [cAMP] durchschnittlich nach etwa 30 s einen minimalen Wert (Abb. 8B; n=18).

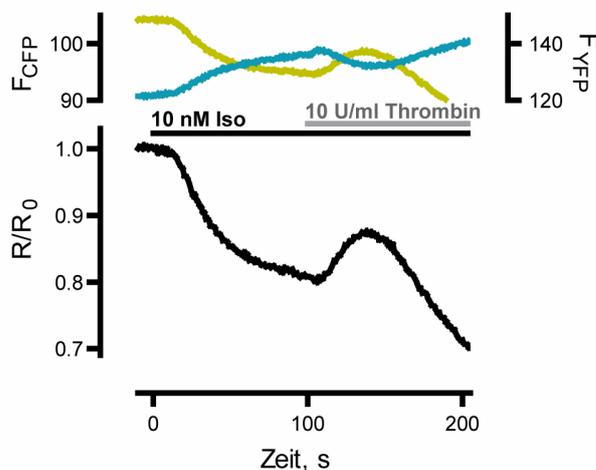


Abb. 9: Thrombin führt in HUVECs zu einer transienten Abnahme der [cAMP]

Einzelne HUVECs wurden mit Isoproterenol (10 nM) vorstimuliert, um die [cAMP] zu erhöhen. Bindung von cAMP an Epac1-camps führt zu einer Abnahme von F_{YFP} , einer Zunahme von F_{CFP} und somit zu einer Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals (R/R_0). Eine zusätzliche Stimulation mit Thrombin führte zu einer transienten Zunahme von R/R_0 .

Thrombin induziert also sowohl in mikrovaskulären (HDMECs) als auch in makrovaskulären (HUVECs) Endothelzellen die transiente Abnahme einer erhöhten [cAMP], die nach etwa 30 s eine minimale Konzentration erreicht (siehe auch Abb. 10).

3.1.2 Dem Thrombin-induzierten maximalen Anstieg der intrazellulären $[Ca^{2+}]_i$ folgt zeitlich verzögert die maximale Abnahme der [cAMP]

Um den zeitlichen Zusammenhang zwischen Ca^{2+} - und cAMP-Signalen zu charakterisieren, wurden HUVECs in einem weiteren Experiment mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fluo-4 beladen. Bei einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ bewirkt die Bindung von Ca^{2+} an Fluo-4 einen Anstieg der Fluo-4-Emission (siehe 2.2.5.3).

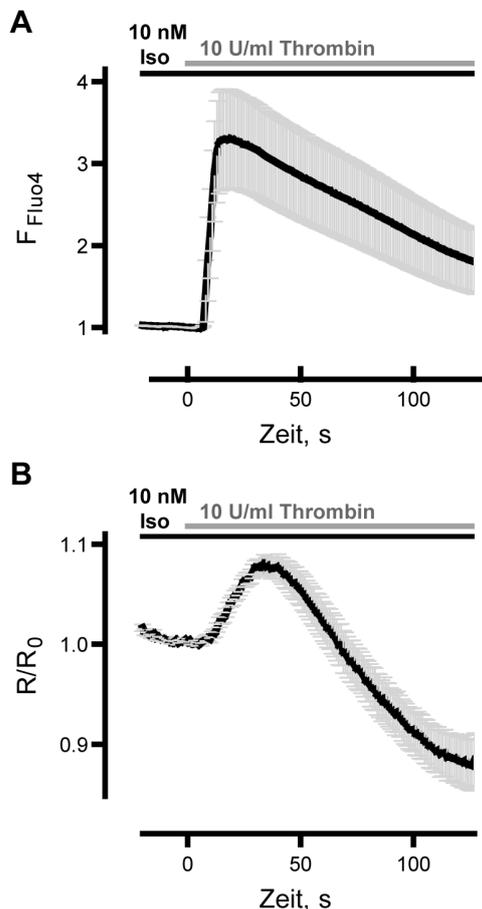


Abb. 10: Thrombin führt zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ und einer zeitlich verzögerten, transienten Abnahme der [cAMP] in HUVECs

In Fluo-4-beladenen HUVECs (A; gemittelte Daten aus 13 Einzelmessungen) führte die Stimulation mit Thrombin (10 U/ml) zu einem Ca^{2+} -bedingten Anstieg der Fluo-4-Emission, der nach durchschnittlich etwa 13 s ein Maximum erreichte.

FRET-Messungen an einzelnen HUVECs, die Epac1-camps exprimierten (B; gemittelt aus 14 Einzelmessungen), zeigten nach einer Vorstimulation mit Isoproterenol (10 nM) eine Thrombin-vermittelte, transiente Zunahme des ratiometrischen FRET-Signals (R/R_0) mit einem maximalen Wert nach durchschnittlich etwa 30 s.

Die mit Fluo-4-beladenen HUVECs wurden analog zu den FRET-Experimenten mit Isoproterenol (10 nM) vorstimuliert. Dies führte zu keinem detektierbaren $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg (Abb. 10A). Die zusätzliche Stimulation mit Thrombin (10 U/ml) verursachte jedoch ein Ca^{2+} -Signal, das nach durchschnittlich etwa 13 s ein Maximum erreichte und danach langsam wieder abfiel (n=13).

Der gemittelte, zeitliche Verlauf der FRET-Experimente (Abb. 10B; n=14) zeigte, dass nach einer Isoproterenol-Vorstimulation (10 nM) eine erhöhte [cAMP], ähnlich wie bei HDMECs (Abb. 8B), etwa 30 s nach der Stimulation mit Thrombin (10 U/ml) einen minimalen Wert erreicht, bevor die Konzentration wieder ansteigt. Der Vergleich der Kinetiken der Ca^{2+} - und cAMP-Signale verdeutlichte, dass das Maximum der [cAMP]-Abnahme gegenüber dem maximalen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ zeitlich verzögert war.

3.1.3 Die Thrombin-induzierte Abnahme der [cAMP] beruht nicht auf einer $G_{i/o}$ -vermittelten Hemmung von Adenylatzyklen

Der Protease-Activated-Receptor 1 (PAR1), der durch Thrombin stimuliert wird (siehe 1.3), aktiviert nicht nur das G_q -Protein, das über IP_3 einen Anstieg der intrazellulären $[Ca^{2+}]_i$ verursacht, sondern möglicherweise auch das G_i -Protein, das Adenylatzyklen hemmt (Manolopoulos *et al.*, 1997). Um zu überprüfen, ob eine $G_{i/o}$ -vermittelte Inhibierung von Adenylatzyklen die transiente Abnahme der [cAMP] verursacht, wurden die FRET-Experimente nach Inkubation der HUVECs mit Pertussis Toxin (PTX; 0,2 mg/ml, >6 h) wiederholt. PTX ist ein Hemmstoff des G_i -Proteins. Die Inkubation mit PTX hatte jedoch keinen Einfluss auf die Thrombin-induzierte Abnahme der [cAMP], wie eine Beispielmessung in Abb. 11A zeigt.

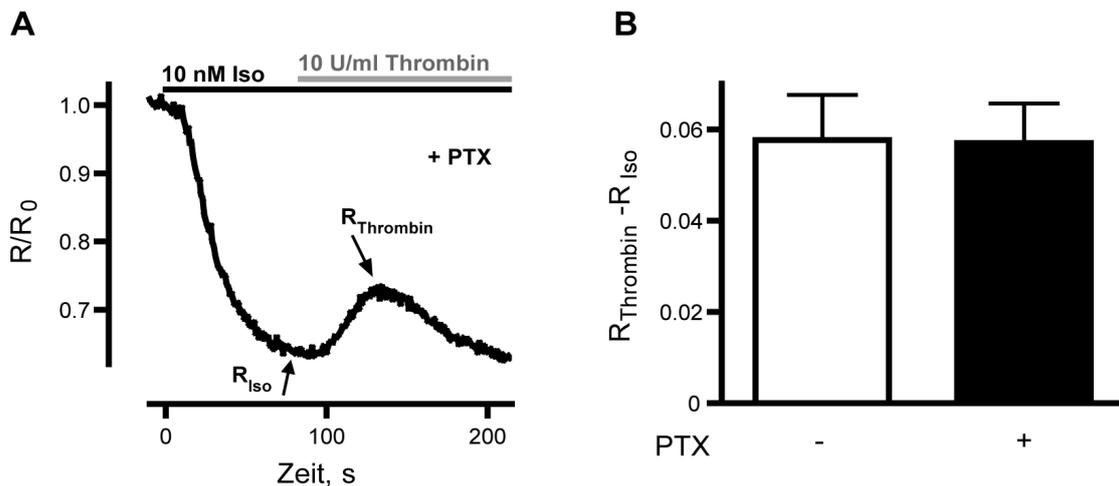


Abb. 11: Die Hemmung von G_i durch PTX hat keinen Einfluss auf die Thrombin-vermittelte Abnahme der [cAMP]

Auch in HUVECs, die mit PTX inkubiert wurden, führte Thrombin (10 U/ml) nach einer Vorstimulation mit Isoproterenol (10 nM) zu einer transienten Zunahme des ratiometrischen FRET-Signals (R/R_0) (Beispielmessung A). Zur Quantifizierung wurden jeweils R_{Iso} und $R_{Thrombin}$ bestimmt. Nach einer Inkubation mit PTX ist $R_{Thrombin} - R_{Iso}$ nicht signifikant unterschiedlich zu $R_{Thrombin} - R_{Iso}$ in Kontrollzellen (B; n=10).

Zum statistischen Vergleich der Experimente mit bzw. ohne PTX-Behandlung wurden jeweils das ratiometrische FRET-Signal nach der Isoproterenol-Stimulation (R_{Iso}) und das ratiometrische FRET-Signal 30 s nach der Thrombin-Stimulation (R_{Thrombin} ; entsprechend dem durchschnittlichen Zeitpunkt, an dem R/R_0 einen maximalen Wert erreichte) bestimmt, und die Differenz ($R_{\text{Thrombin}}-R_{\text{Iso}}$) gebildet. $R_{\text{Thrombin}}-R_{\text{Iso}}$ betrug für Kontrollzellen $0,057\pm 0,008$ und für PTX-behandelte Zellen $0,058\pm 0,010$ (jeweils $n=10$). Die mittlere Thrombin-induzierte Änderung des ratiometrischen FRET-Signals ($R_{\text{Thrombin}}-R_{\text{Iso}}$), mit bzw. ohne Behandlung der Zellen mit PTX, war somit nicht signifikant verschieden (Abb. 11B). Die Behandlung der HUVECs mit PTX hatte außerdem keinen Einfluss auf das Ausmaß der Änderung des ratiometrischen FRET-Signals nach der Vorstimulation mit Isoproterenol ($R_{\text{iso}}-R_0$). $R_{\text{iso}}-R_0$ betrug durchschnittlich $-0,266\pm 0,040$ ($n=10$) bei Kontrollzellen und $-0,259\pm 0,030$ ($n=10$) bei PTX-behandelten Zellen.

Um zu testen, ob die Inkubation der HUVECs mit PTX (0,2 mg/ml, >6 h) tatsächlich zu einer Inhibierung von G_i führte, wurde der Einfluss der PTX-Inkubation auf die G_i -abhängige Phosphorylierung der ERK (Extracellular-Signal-Regulated-Protein-Kinase) mittels Western Blot untersucht (Abb. 12; Montiel *et al.*, 2006).

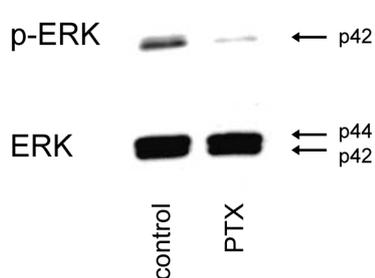


Abb. 12: PTX inhibiert die Phosphorylierung der ERK

Western Blot-Analysen zeigten, dass PTX die Phosphorylierung der ERK inhibiert (hier ein repräsentatives Beispiel). In PTX-behandelten HUVECs war ERK schwächer phosphoryliert als in nicht behandelten Kontrollzellen ($26,7\pm 5,4\%$; $n=3$). Als Ladekontrolle wurde ERK mit einem ERK-spezifischen Antikörper detektiert.

Die Analyse der Banden-Intensität ergab, dass die Phosphorylierung der ERK in PTX-behandelten HUVECs gegenüber Kontrollzellen reduziert war ($26,7\pm 5,4\%$; $n=3$). Um die Protein-Beladung des SDS-Gels zu überprüfen, wurde die ERK mit einem ERK-spezifischen Antikörper auf der Western Blot-Membran detektiert, nachdem der pERK-spezifische Antikörper entfernt wurde (siehe Abb. 12). Die schwächere Phosphorylierung der ERK nach einer Inkubation der HUVECs mit PTX bestätigt, dass G_i durch die Inkubation mit PTX (0,2 mg/ml, >6 h) wirksam inhibiert wurde.

3.1.4 Die Thrombin-induzierte, transiente Abnahme der [cAMP] ist Ca^{2+} -abhängig

Um zu überprüfen, ob die Thrombin-induzierte Abnahme der [cAMP] durch einen G_q -vermittelten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verursacht wird, wurde zunächst die Wirkung eines Ca^{2+} -Ionophors (A23187, 1 μM) auf einen erhöhten cAMP-Spiegel untersucht. Dazu wurde zuerst Forskolin (3 μM), das Adenylatzyklasen direkt aktiviert, zugegeben und nach Erreichen einer konstanten [cAMP] das Ca^{2+} -Ionophor A23187 (1 μM) auf die HUVECs appliziert. Aufgrund der lipophilen Eigenschaften von Forskolin und A23187 binden diese eventuell an die Schläuche des Superfusionssystems. Da deshalb die Zugabe einer definierten Konzentration des Forskolin bzw. A23187 nicht gesichert war, wurden diese nicht, wie in den anderen Experimenten, mit Hilfe des Superfusionssystems, sondern mit einer Pipette zugegeben.

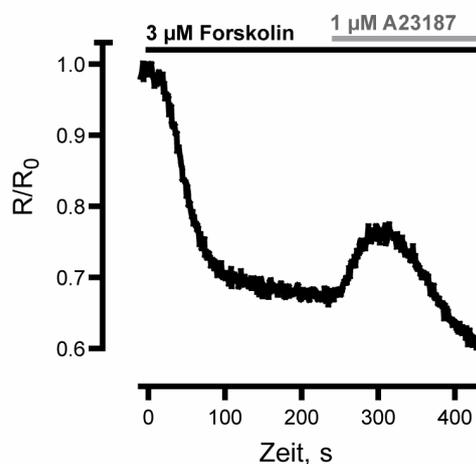


Abb. 13: Das Ca^{2+} -Ionophor A23187 führt zu einer transienten Abnahme der [cAMP]

Einzelne HUVECs wurden mit Forskolin (3 μM) vorstimuliert, um Adenylatzyklasen direkt zu aktivieren (repräsentatives Beispiel). Nach der dadurch verursachten Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals (R/R_0), bewirkte die zusätzliche Stimulation mit A23187 (1 μM) eine transiente Zunahme des ratiometrischen FRET-Signals (R/R_0).

Nach der Forskolin-Applikation (3 μM) nahm das ratiometrische FRET-Signal (R/R_0) ab und reflektierte damit eine [cAMP]-Zunahme. Der durch das Ionophor hervorgerufene Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führte ebenso wie Thrombin zu einer transienten Zunahme des ratiometrischen FRET-Signals (R/R_0) und somit zu einer transienten Abnahme der [cAMP] (Abb. 13). Dies war ein erster Hinweis auf einen Ca^{2+} -vermittelten Effekt auf die [cAMP]. Um zu untersuchen, ob ein durch Thrombin induzierter Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ die [cAMP]-Abnahme verursacht, wurde intrazelluläres Ca^{2+} mit Hilfe von BAPTA, das mit Ca^{2+} einen Komplex bildet, gebunden. Die Inkubation der HUVECs mit 100 μM BAPTA-AM, einer Konzentration, die zu einer vollständigen Ca^{2+} -Komplexierung führt, beeinflusste allerdings die Konformation von Epac1-camps so sehr, dass kein weiterer Abfall des ratiometrischen FRET-Signals nach einer Isoproterenol-Stimulation detektiert werden konnte (nicht gezeigt). Deshalb wurden die HUVECs in den folgenden Experimenten jeweils 30 min mit 10 μM BAPTA-AM vorinkubiert. Ca^{2+} -Messungen mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fura-2 in HUVECs zeigten,

dass die Inkubation mit 10 μM BAPTA-AM zu einer weitgehenden Aufhebung des Thrombin-vermittelten Anstiegs der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt (Abb. 14B im Vergleich zur Kontrolle Abb. 14A).

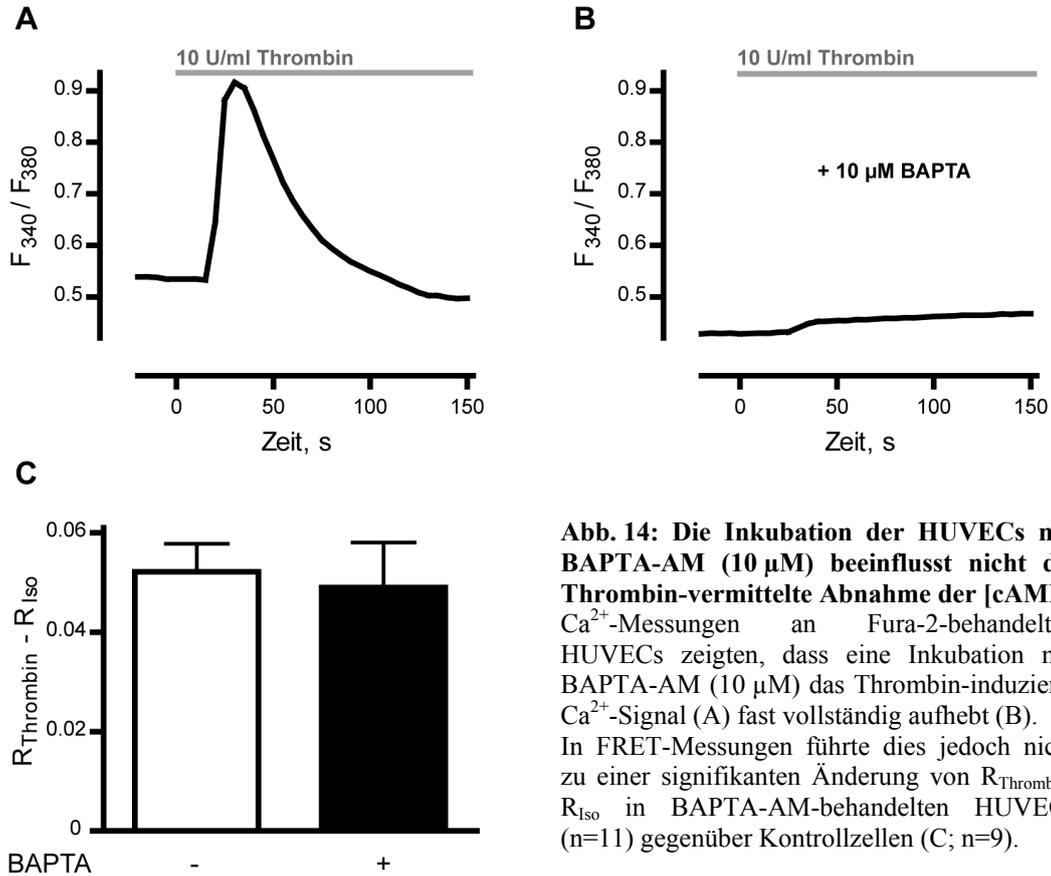


Abb. 14: Die Inkubation der HUVECs mit BAPTA-AM (10 μM) beeinflusst nicht die Thrombin-vermittelte Abnahme der [cAMP] Ca^{2+} -Messungen an Fura-2-behandelten HUVECs zeigten, dass eine Inkubation mit BAPTA-AM (10 μM) das Thrombin-induzierte Ca^{2+} -Signal (A) fast vollständig aufhebt (B). In FRET-Messungen führte dies jedoch nicht zu einer signifikanten Änderung von $R_{\text{Thrombin}} - R_{\text{Iso}}$ in BAPTA-AM-behandelten HUVECs (n=11) gegenüber Kontrollzellen (C; n=9).

Trotz der Inkubation mit BAPTA-AM ist ein zwar geringer, aber lange anhaltender Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ detektierbar (Abb. 14B), der einen kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum widerspiegeln könnte (siehe 1.2). Die FRET-Messungen mit Epac1-camps in BAPTA-AM-behandelten HUVECs ergaben keinen signifikanten Unterschied in der Thrombin-induzierten Änderung des ratiometrischen FRET-Signals ($R_{\text{Thrombin}} - R_{\text{Iso}}$; n=11) im Vergleich zu Kontrollzellen (n=9; Abb. 14C). Um einen kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom zu unterbinden, wurde eine externe Lösung ohne Ca^{2+} hergestellt, die zusätzlich EGTA (5 mM) enthielt, um restliches Ca^{2+} zu komplexieren, und schließlich die FRET-Messungen mit PTX-behandelten HUVECs wiederholt. Die Inkubation der HUVECs mit PTX hatte, wie schon erwähnt, keinen Einfluss auf die Thrombin-induzierte [cAMP]-Abnahme (siehe Abb. 11).

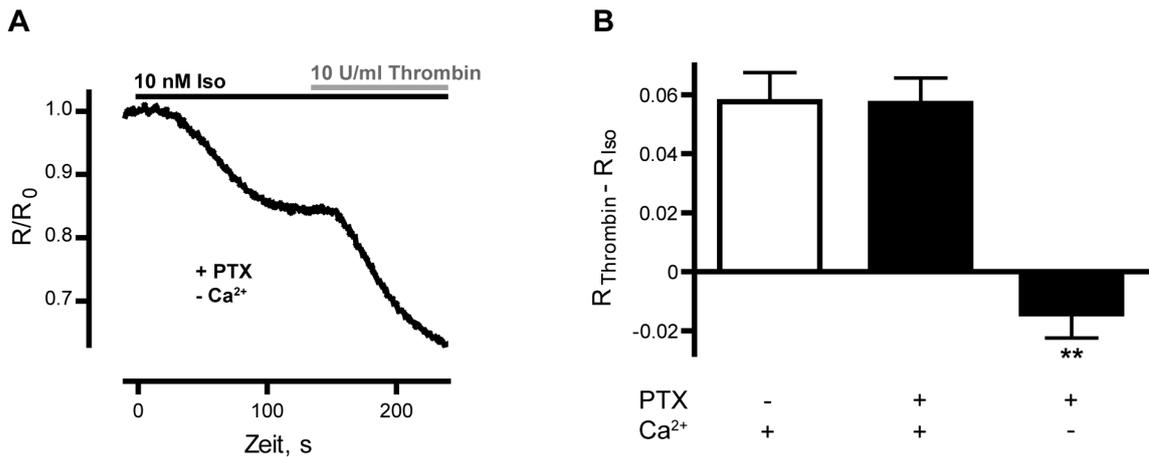


Abb. 15: Thrombin führt zu einem Anstieg der [cAMP] bei Messungen in EGTA-gepufferter, Ca²⁺-freier, externer Lösung

Wie die Beispielmessung (A) zeigt, resultierte Thrombin bei PTX-behandelten HUVECs, die mit Ca²⁺-freier externer Lösung gespült wurden, im Gegensatz zu PTX-inkubierten Kontrollzellen, in einem weiteren Abfall des ratiometrischen FRET-Signals (R/R₀). Während PTX alleine keinen Einfluss auf R_{Thrombin}-R_{Iso} hatte (B), führte die Wegnahme von extrazellulärem Ca²⁺ zu einer signifikanten Änderung (p<0,01; n=13).

Wie die Beispielmessung (Abb. 15A) zeigt, führte, nach einer Vorstimulation der Zellen mit Isoproterenol (10 nM), die zusätzliche Stimulation mit Thrombin (10 U/ml) zu einer weiteren Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals (R/R₀) und somit zu einem Anstieg der [cAMP]. Durch die Bestimmung der Werte von R_{Thrombin}, 30 s nach der Thrombin-Zugabe, ergaben sich so negative Werte für R_{Thrombin}-R_{Iso}. Die Änderung des Thrombin-vermittelten ratiometrischen FRET-Signals (R_{Thrombin}-R_{Iso}) in PTX-behandelten HUVECs in externer Lösung ohne Ca²⁺ (n=13) war signifikant verschieden im Vergleich zu PTX-behandelten Kontrollzellen (p<0,01; Abb. 15B; n=10). Allerdings beeinflusste der externe Puffer ohne Ca²⁺ das Ausmaß der Isoproterenol-induzierten Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals (R_{Iso}-R₀). In Kontrollzellen bzw. PTX-behandelten Kontrollzellen betrug R_{Iso}-R₀ -0,266±0,040 (n=10) bzw. -0,259±0,030 (n=10; vgl. 3.1.3). Bei FRET-Messungen in externer Lösung ohne Ca²⁺ betrug R_{Iso}-R₀ dagegen nur -0,171±0,025 (n=13) und ist signifikant verschieden gegenüber Kontrollbedingungen (p<0,05). Dies bedeutet, dass die Versuchsbedingungen nicht exakt gleich sind. Die Messungen in Ca²⁺-freier externer Lösung zeigten jedoch deutlich, dass unter diesen Bedingungen keine Thrombin-induzierte Abnahme der [cAMP] auftritt, sondern Thrombin zu einem [cAMP]-Anstieg führt.

3.1.5 Die durch Ca^{2+} und CaM regulierte PDE1 ist nicht maßgeblich an der Thrombin-vermittelten Abnahme der [cAMP] beteiligt

Um zu testen, ob eine Ca^{2+} -vermittelte Aktivierung der PDE1 die Hydrolyse von cAMP verursachte (siehe 1.2), und dies eventuell zur Abnahme der [cAMP] führte, wurden HUVECs 30 min mit dem selektiven PDE1-Inhibitor 8MM-IBMX (50 μM) inkubiert. Danach wurden FRET-Messungen in Gegenwart von 8MM-IBMX (50 μM) durchgeführt, wobei die Adenylatzyklasen mit Forskolin (3 μM) direkt aktiviert wurden, bevor das Ca^{2+} -Ionophor A23187 (1 μM) zupipettiert wurde (vgl. Abb. 13).

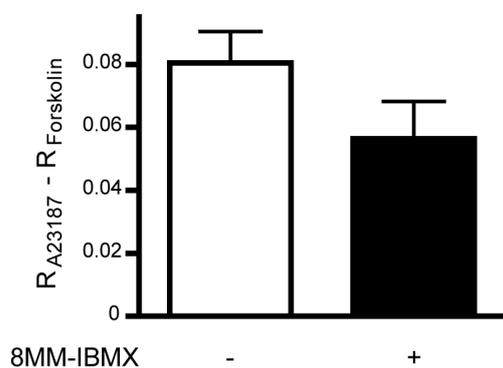


Abb. 16: Die Ca^{2+} -regulierte PDE1 ist nicht maßgeblich an der Abnahme der [cAMP] beteiligt

Eine Inkubation von HUVECs mit dem selektiven PDE1-Inhibitor 8MM-IBMX (50 μM) führte nach einer Vorstimulation mit Forskolin (3 μM) und anschließender Addition des Ca^{2+} -Ionophors A23187 (1 μM) nicht zu einer signifikanten Änderung von $R_{\text{A23187}} - R_{\text{Forskolin}}$ im Vergleich zu Kontrollzellen.

Die Auswertung der FRET-Experimente ergab, dass $R_{\text{A23187}} - R_{\text{Forskolin}}$ bei 8MM-IBMX-behandelten Zellen ($0,056 \pm 0,012$, $n=8$) und unbehandelten Kontrollzellen ($0,080 \pm 0,010$, $n=10$; Abb. 16) nicht signifikant verschieden war. Die Inkubation der HUVECs mit 8MM-IBMX hatte außerdem keine Auswirkungen auf das basale ratiometrische FRET-Signal vor einer Stimulation ($1,69 \pm 0,14$) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen ($1,63 \pm 0,15$), und die Forskolin-induzierte Änderung des ratiometrischen FRET-Signals ($R_{\text{Forskolin}} - R_0$) war ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich in 8MM-IBMX-behandelten Zellen ($-0,342 \pm 0,020$, $n=8$) und Kontrollzellen ($-0,306 \pm 0,017$, $n=10$).

Die Funktionalität des PDE1-Inhibitors 8MM-IBMX wurde mit Hilfe primärer Glattmuskelzellen aus der Maus überprüft. Für Glattmuskelzellen wurde gezeigt, dass sie die PDE1 exprimieren (Mercapide *et al.*, 1999; Rybalkin *et al.*, 2002). Die akute Zugabe von 8MM-IBMX zu transfizierten Glattmuskelzellen (Epac1-camps) verursachte eine Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals und somit eine Zunahme der [cAMP] (Daten von Kathrin von Hayn). Dadurch wurde die Funktionalität des PDE1-Inhibitors bestätigt, und eine maßgebliche Beteiligung der PDE1 an der beobachteten Abnahme der [cAMP] in HUVECs ausgeschlossen.

3.1.6 *in vitro*- und *in vivo*-Kalibrierung von Epac1-camps zur Bestimmung der [cAMP] in lebenden Zellen

Da es sich bei Epac1-camps um einen monomolekularen cAMP-Sensor handelt, kann die absolute [cAMP] abhängig von der Änderung des ratiometrischen FRET-Signals bestimmt werden. Deshalb wurde zuerst eine *in vitro*-Kalibrierung von Epac1-camps basierend auf der [cAMP] durchgeführt. Dazu wurden Lysate von transfizierten HEK-tsA 201-Zellen verwendet, und jeweils die Änderung des ratiometrischen FRET-Signals (Δ FRET) bezogen auf die maximale Änderung (Δ FRET_{max}) für verschiedene cAMP-Konzentrationen bestimmt. Diese *in vitro*-Kalibrierung ergab einen EC₅₀-Wert von 1,5 μ M (Abb. 17, links; vgl. Nikolaev *et al.*, 2004).

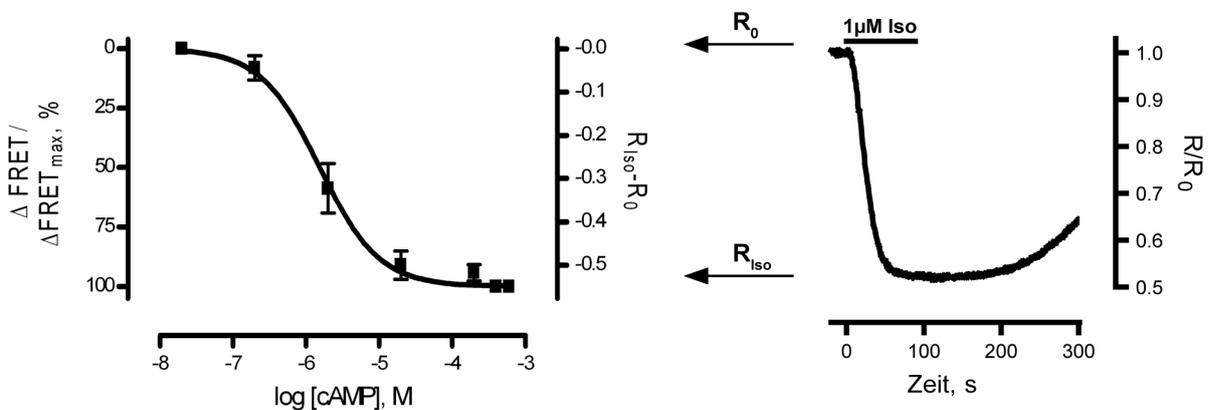


Abb. 17: Kalibrierung der Änderungen des ratiometrischen FRET-Signals von Epac1-camps auf die [cAMP]

Eine *in vitro*-Konzentrations-Wirkungskurve (links) wurde verwendet, um die [cAMP] in lebenden Zellen abzuschätzen. Unter der Annahme, dass unter basalen Bedingungen die [cAMP] < 10 nM ist (R_0), und dass nach einer Stimulation mit 1 μ M Isoproterenol (R_{Iso} , rechts: repräsentatives Experiment), die zu einer Sättigung des Sensors führt, die [cAMP] > 100 μ M ist, wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve mit $R_{\text{Iso}}-R_0$ -Werten von 0 bis -0,55 erstellt (durchschnittlicher Wert aus 16 Experimenten).

Um mit Hilfe dieser *in vitro*-Kalibrierung und den gemessenen Änderungen des ratiometrischen FRET-Signals in intakten Zellen verlässliche Werte für die [cAMP] zu erhalten, mussten zwei Annahmen gemacht werden: Zum einen wurde davon ausgegangen, dass die [cAMP] in den Zellen im ruhenden Zustand weniger als 10 nM betrug (vgl. *in vitro*-Konzentrations-Wirkungskurve von Epac1-camps), da das basale ratiometrische FRET-Signal (R_0) beim Spülen mit externer Lösung stabil blieb. Die zweite Annahme war, dass nach einer maximalen Stimulation der Zellen mit Isoproterenol (1 μ M) die [cAMP] mehr als 100 μ M betrug, da das ratiometrische FRET-Signal nach dieser Stimulation (R_{Iso}) ein stabiles

Minimum erreichte und die Kinetik der Signal-Auswaschung für eine Sättigung des Sensors sprach (Abb. 17, rechts: repräsentatives Experiment).

Die Analyse mehrerer FRET-Experimente von HUVECs, die nach einer Stimulation mit 1 μ M Isoproterenol ein stabiles, minimales ratiometrisches FRET-Signal erreichten, ergab für $R_{\text{Iso}}-R_0$ einen durchschnittlichen Wert von $-0,55 \pm 0,01$ ($n=16$). Deshalb wurde eine *in vivo*-Kalibrierung von Epac1-camps erstellt, die von 0 bis $-0,55$ ($R_{\text{Iso}}-R$) reicht (Abb. 17, links, rechte Y-Achse). Basierend auf dieser *in vivo*-Kalibrierung wurde in den folgenden Experimenten die [cAMP] berechnet.

3.1.7 Die transiente Abnahme der [cAMP] wird durch die Regulation von Adenylatzyklen beeinflusst

Ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kann Adenylatzyklen sowohl aktivieren (AC1, AC8), als auch hemmen (AC5, AC6; Cooper, 2003). Falls die Thrombin-vermittelte Abnahme der [cAMP] durch eine Ca^{2+} -vermittelte Regulation von Adenylatzyklen verursacht wird, sollte die Transfektion von Ca^{2+} -regulierten oder Ca^{2+} -unabhängigen Adenylatzyklen die Thrombin-induzierte [cAMP]-Änderung beeinflussen. Deshalb wurden HUVECs mit Plasmiden für die Expression der Ca^{2+} -inhibierten AC6 oder der Ca^{2+} -unabhängigen AC4 transfiziert. Die Abbildung 18 zeigt jeweils ein repräsentatives Experiment einzelner HUVECs, die die AC6 (A) oder die AC4 (B) exogen exprimierten.

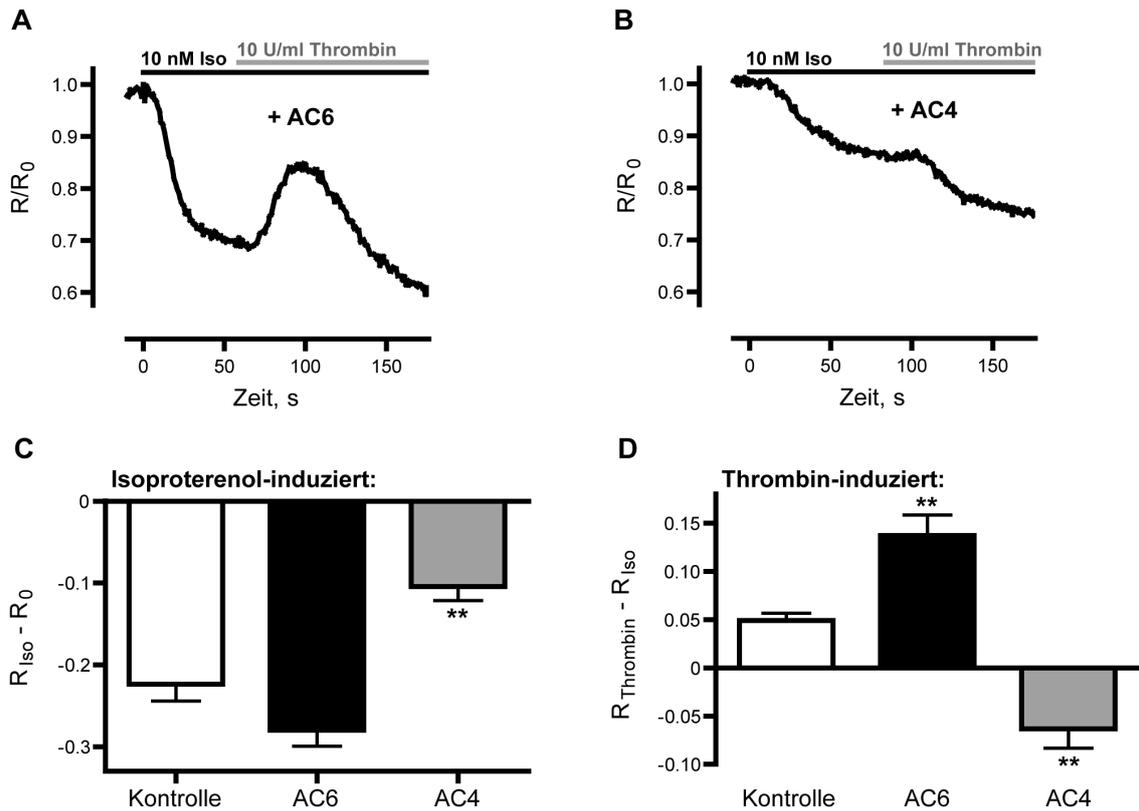


Abb. 18: Die Transfektion der AC6 oder AC4 beeinflusst Isoproterenol- und Thrombin-induzierte Änderungen der [cAMP]

Die Transfektion der Ca^{2+} -inhibierten AC6 (repräsentatives Experiment; A) führte zu einer verstärkten Isoproterenol-induzierten Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals ($R_{\text{Iso}}-R_0$; C) und einer signifikant verstärkten Thrombin-induzierten Zunahme des ratiometrischen FRET-Signals ($R_{\text{Thrombin}}-R_{\text{Iso}}$; D). Die Transfektion der Ca^{2+} -unabhängigen AC4 (repräsentatives Experiment; B) resultierte in einer signifikant verringerten Isoproterenol-induzierten Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals ($R_{\text{Iso}}-R_0$; C) und einer Thrombin-induzierten Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals ($R_{\text{Thrombin}}-R_{\text{Iso}}$; D).

Die Transfektion der durch Ca^{2+} inhibierten AC6 resultierte in einer leicht verstärkten, Isoproterenol-induzierten Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals ($R_{\text{Iso}}-R_0$; Abb. 18C). Außerdem war die Thrombin-induzierte Zunahme des ratiometrischen FRET-Signals ($R_{\text{Thrombin}}-R_{\text{Iso}}$) signifikant verstärkt im Vergleich zu Kontrollzellen ($n=17$; Abb. 18D). Die Transfektion der Ca^{2+} -unabhängigen AC4 führte hingegen, nach einer Stimulation mit Isoproterenol (10 nM), zu einer erniedrigten Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals ($R_{\text{Iso}}-R_0$; Abb. 18C), die signifikant verschieden zu $R_{\text{Iso}}-R_0$ in Kontrollzellen war, und außerdem zu einer Thrombin-induzierten Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals, wie in der Beispielmessung (Abb. 18B) dargestellt. Die Bestimmung der Werte von R_{Thrombin} , 30 s nach Zugabe von Thrombin, ergab deshalb negative Werte für $R_{\text{Thrombin}}-R_{\text{Iso}}$ ($n=15$; Abb. 18D). Während Thrombin also bei der Transfektion der Ca^{2+} -inhibierten AC6 zu einer

verstärkten Abnahme der [cAMP] führte, verursachte es bei der Transfektion der Ca²⁺-unabhängigen AC4 einen [cAMP]-Anstieg.

Nun wurde mit Hilfe der *in vivo*-Kalibrierung von Epac1-camps (siehe 3.1.5; Abb. 17) jeweils die [cAMP] in Kontrollzellen oder AC6- bzw. AC4-transfizierten Zellen nach der Stimulation mit Isoproterenol (10 nM) ermittelt und die jeweiligen Änderungen der [cAMP] nach einer zusätzlichen Stimulation mit Thrombin (10 U/ml) berechnet (Abb. 19).

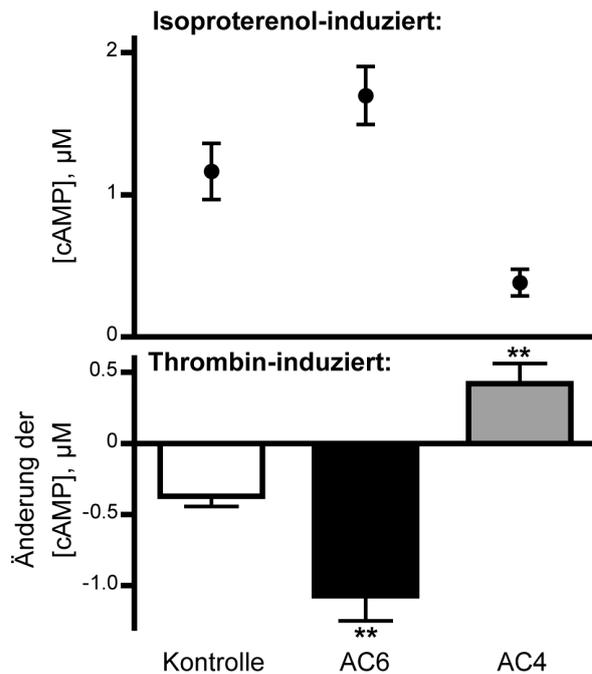


Abb. 19: Berechnung der [cAMP] aufgrund der Änderungen des ratiometrischen FRET-Signals

Mit Hilfe der Kalibrierung von Epac1-camps (Abb. 17) wurde die [cAMP] in Kontrollzellen und in AC6- oder AC4-transfizierten HUVECs nach einer Stimulation mit Isoproterenol (10 nM, oben), und die jeweilige Änderung der [cAMP] nach einer zusätzlichen Stimulation mit Thrombin (10 U/ml, unten) bestimmt. In AC6- und AC4-transfizierten Zellen waren die Thrombin-erzeugten Änderungen der [cAMP] jeweils signifikant unterschiedlich gegenüber Kontrollzellen ($p < 0,01$).

In Kontrollzellen stieg die [cAMP] durch Isoproterenol auf $1,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$ an und wurde durch Thrombin um $0,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ($n=17$) verringert. In AC6-transfizierten HUVECs wurde die [cAMP] nach der Isoproterenol-Stimulation auf eine Konzentration von $1,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$ erhöht und durch Thrombin um $1,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ($n=17$) erniedrigt. Dagegen stieg in AC4-transfizierten Zellen die [cAMP] durch die Isoproterenol-Stimulation auf nur $0,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$ an und nahm durch Thrombin um weitere $0,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ($n=15$) zu (30 s nach Thrombin-Gabe). Die jeweiligen Thrombin-induzierten Änderungen der [cAMP] in AC6- und AC4-transfizierten Zellen waren signifikant unterschiedlich gegenüber Kontrollzellen ($p < 0,01$; Abb. 19). Die Thrombin-induzierte Änderung der [cAMP] ist also von der exogenen Expression des jeweiligen AC-Subtyps abhängig.

3.1.8 Die Herunterregulierung der dominanten Adenylatzyklase 6 resultiert in einer Aufhebung der transienten [cAMP]-Abnahme

Um eine mögliche Beteiligung der durch Ca^{2+} direkt inhibierten AC5 und AC6 an der beobachteten Abnahme der [cAMP] zu überprüfen (vgl. 1.2), wurden diese Adenylatzyklasen mit Hilfe spezifischer siRNA-Pools herunterreguliert. Hierfür wurden die HUVECs entweder mit einer Kontroll-siRNA (Non-Targeting-siRNA) oder mit AC5- und AC6-spezifischer siRNA transfiziert. Die HUVECs bildeten auch nach der zweifachen Transfektion (siRNA-Transfektion drei Tage, und Transfektion von Epac1-camps einen Tag vor der FRET-Messung, siehe 2.2.3) eine dichte Zellschicht mit Zell-Zell-Kontakten, wie eine Immunfärbung von VE-Cadherin (Abb. 20, vgl. 1.1) in doppelt transfizierten HUVECs (B) im Vergleich zu nicht transfizierten Kontrollzellen (A) zeigt.

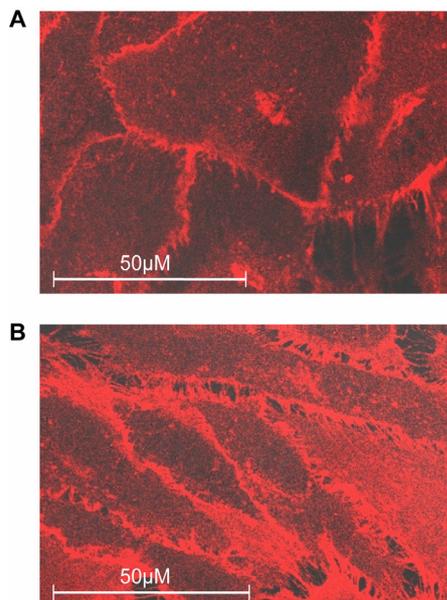


Abb. 20: Verteilung von VE-Cadherin in HUVECs

Eine Immunfärbung von nicht transfizierten (A) und mit siRNA und Plasmid transfizierten HUVECs (B) mit einem humanen VE-Cadherin-Antikörper zeigte, dass zweifach transfizierte HUVECs ähnlich wie nicht transfizierte Zellen dichte Zellschichten mit einer typischen VE-Cadherin-Verteilung an interzellulären Junctions ausbilden.

Durch die Western Blot-Analyse mit einem anti-AC5/6-Antikörper sollte zunächst überprüft werden, ob durch die transfizierte siRNA die Expression von AC5 und AC6 verringert wurde. Dieser Antikörper erwies sich jedoch als nicht sensitiv genug, um die AC5 und AC6 und deren eventuell verringerte Expression in Membranpräparationen zu detektieren (Abb. 21).

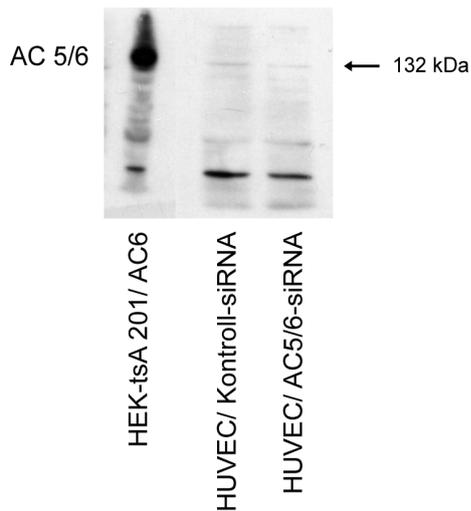


Abb. 21: Expression von AC5 und AC6 in HUVECs

Mit Hilfe des anti-AC5/6-Antikörpers konnte in transfizierten HEK-tsA 201-Zellen eine Überexpression der AC6 nachgewiesen werden. Aber der Antikörper war nicht ausreichend sensitiv, um endogen exprimierte AC5 und AC6 bzw. deren verringerte Expression nach Transfektion spezifischer siRNA-Pools zu detektieren.

Deshalb wurde eine Real-Time-PCR durchgeführt, um jeweils die AC5- und AC6-Transkripte (mRNA) vor und nach einer siRNA-Transfektion quantitativ zu analysieren. Die GAPDH-mRNA diente dabei jeweils als interne Referenz. Eine Auswertung der Real-Time-PCR-Daten durch die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ergab, dass die AC6-mRNA in HUVECs, die mit der AC5/6-siRNA transfiziert wurden, gegenüber HUVECs, die mit der Kontroll-siRNA (Non-Targeting-siRNA) transfiziert wurden, signifikant erniedrigt war (Abb. 22; $p < 0,01$; $n=3$). Die Menge der AC5-Transkripte war hingegen zu gering ($< 0,05\%$ der AC6-mRNA), um eine siRNA-vermittelte Herunterregulierung nachweisen zu können. Dies stimmt mit Real-Time-PCR-Daten von Bunday & Insel (2003) überein, die ebenfalls nur eine geringe Anzahl von AC5-Transkripten im Vergleich zu AC6-Transkripten nachweisen konnten.

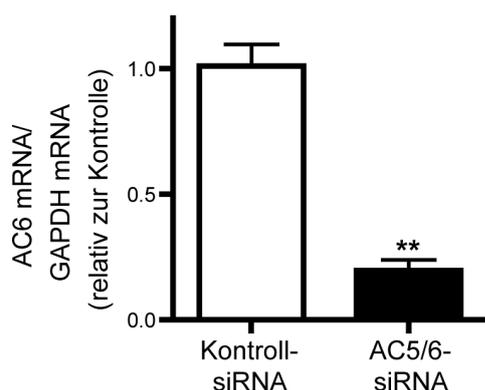


Abb. 22: Quantitative Analyse der AC6-mRNA durch Real-Time-PCR

AC6-Transkripte von HUVECs, die entweder mit Kontroll-siRNA oder AC5/6-siRNA transfiziert wurden, wurden durch eine Real-Time-PCR-Analyse quantifiziert und jeweils auf GAPDH-Transkripte normalisiert. Die Auswertung der Real-Time-PCR-Daten zeigte, dass AC6-Transkripte in AC5/6-siRNA-transfizierten Zellen gegenüber Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, signifikant reduziert waren ($p < 0,01$; $n=3$).

FRET-Messungen mit HUVECs, die mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurden, zeigten, dass die Thrombin-vermittelte, transiente Zunahme des ratiometrischen FRET-Signals (R/R_0) bzw. die transiente Abnahme der [cAMP] nicht durch die Transfektion der siRNA beeinflusst wurde (repräsentatives Beispiel, Abb. 23A). Die Transfektion der AC5/6-siRNA resultierte

jedoch in einer völligen Aufhebung der Thrombin-vermittelten Zunahme des ratiometrischen FRET-Signals (R/R_0) bzw. der Abnahme der [cAMP] und führte stattdessen zu einer weiteren [cAMP]-Zunahme (repräsentatives Experiment, Abb. 23B).

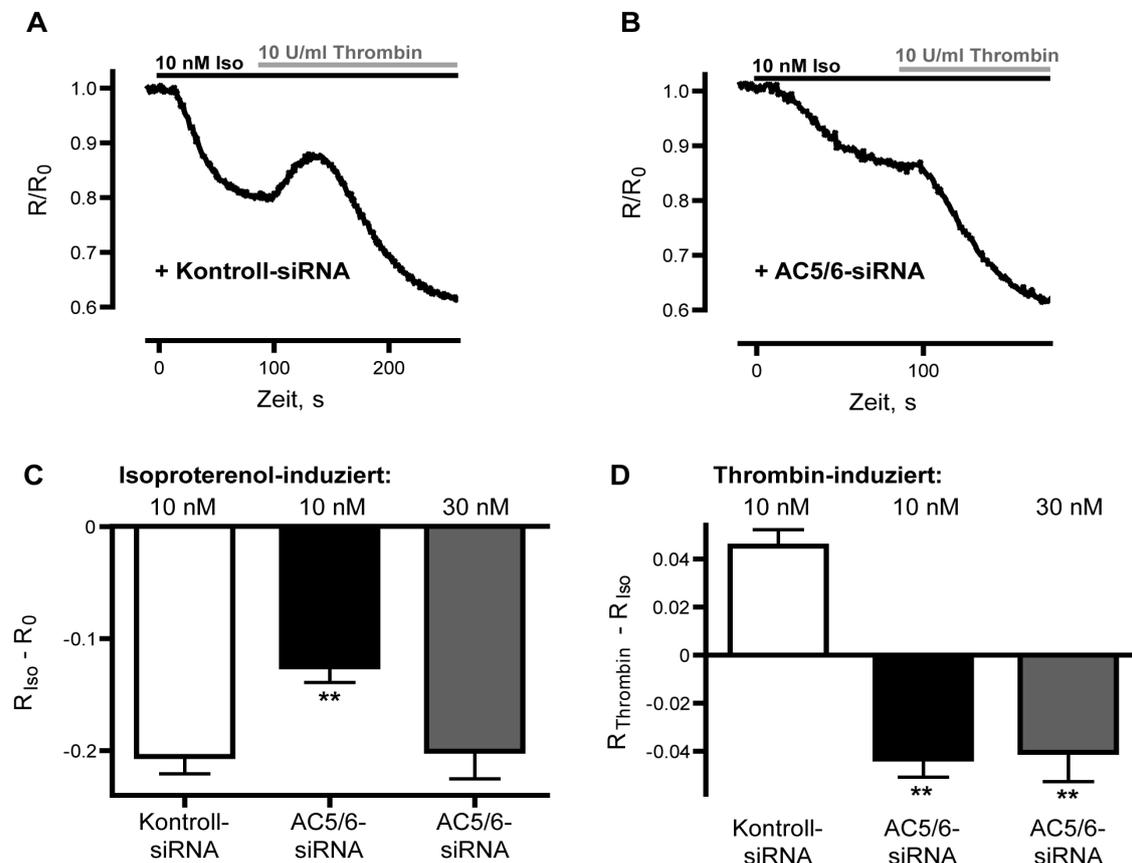


Abb. 23: Herunterregulierung der AC6 durch AC5/6-siRNA führt nach einer Isoproterenol-Vorstimulation zu einer Thrombin-vermittelten [cAMP]-Zunahme

Die Transfektion der Kontroll-siRNA beeinflusst nicht die Thrombin-induzierte Zunahme des ratiometrischen FRET-Signals (repräsentatives Experiment, A). Durch die Transfektion der HUVECs mit AC5/6-siRNA wird dieser Effekt aufgehoben und es kommt stattdessen zu einer Thrombin-vermittelten Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals (repräsentatives Beispiel, B). Außerdem führte die Herunterregulierung der AC6 zu einer Erniedrigung von $R_{Iso} - R_0$ nach Stimulation mit Isoproterenol (10 nM), die signifikant verschieden im Vergleich zu Kontrollzellen war. Nach Stimulation mit einer höheren Konzentration an Isoproterenol (30 nM) wurden jedoch ähnliche Werte wie bei Kontrollzellen erreicht (C). $R_{Thrombin} - R_{Iso}$ war in AC5/6-siRNA-transfizierten HUVECs signifikant erniedrigt gegenüber HUVECs, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden (D), da Thrombin in diesen Zellen zu einer Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals führte.

Außerdem resultierte die Herunterregulierung der AC6-mRNA in einer erniedrigten Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals ($R_{Iso} - R_0$) nach der Stimulation der HUVECs mit Isoproterenol (10 nM), die gegenüber Kontrollzellen signifikant verschieden war (Abb. 23C; $p < 0,01$). Dies konnte jedoch durch eine Stimulation der AC5/6-siRNA-transfizierten Zellen mit einer erhöhten Isoproterenol-Konzentration (30 nM) kompensiert werden. Trotzdem führte die zusätzliche Gabe von Thrombin (10 U/ml) zu einer weiteren Abnahme des

ratiometrischen FRET-Signals (R/R_0). Deshalb ergab die Auswertung der R_{Thrombin} -Werte, 30 s nach der Zugabe von Thrombin, negative Werte für $R_{\text{Thrombin}}-R_{\text{Iso}}$ nach einer Vorstimulation AC5/6-siRNA-transfizierter HUVECs mit Isoproterenol (10 nM bzw. 30 nM; Abb. 23D). Durch die Herunterregulierung der dominanten AC6 in HUVECs wurde also die Thrombin-vermittelte Abnahme der [cAMP] aufgehoben und stattdessen ein Thrombin-vermittelter Anstieg der [cAMP] beobachtet.

Mit Hilfe der *in vivo*-Kalibrierung von Epac1-camps (Abb. 17) wurde die [cAMP] jeweils nach der Isoproterenol-Stimulation und die darauf folgende Änderung der [cAMP] nach der zusätzlichen Gabe von Thrombin bestimmt (Abb. 24).

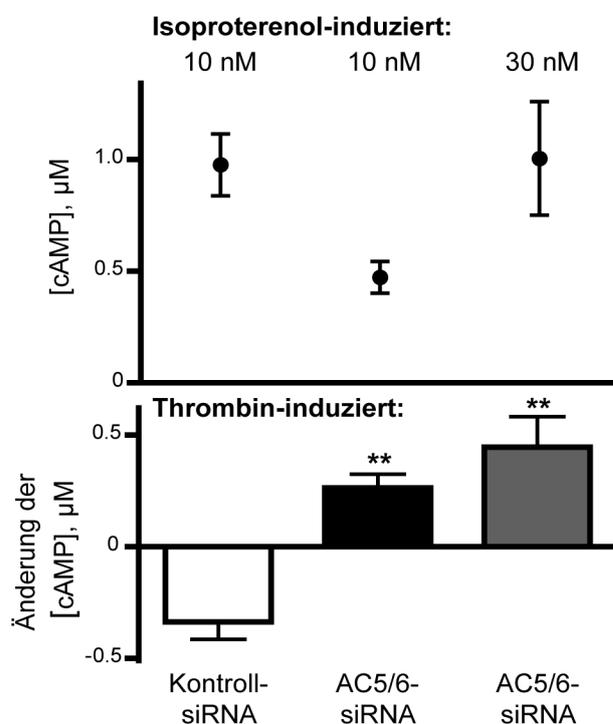


Abb. 24: Berechnung der [cAMP] aufgrund der Änderungen des ratiometrischen FRET-Signals
 Mit Hilfe der Kalibrierung von Epac1-camps (Abb. 17) wurden, aufgrund der Änderungen des ratiometrischen FRET-Signals, die [cAMP] und die Änderungen der [cAMP] nach der Stimulation mit Isoproterenol (10 nM bzw. 30 nM, oben) und Thrombin (10 U/ml, unten) bestimmt.

In HUVECs, die mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurden, stieg die [cAMP] nach der Isoproterenol-Stimulation (10 nM) auf $1,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ($n=22$) an und wurde durch Thrombin (10 U/ml) um $0,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$ reduziert. In AC5/6-siRNA-transfizierten Zellen stieg die [cAMP] nach einer Stimulation mit 10 nM Isoproterenol auf $0,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ($n=23$) an und nach einer Stimulation mit 30 nM Isoproterenol auf $1,0 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ($n=12$). Die zusätzliche Stimulation mit Thrombin (10 U/ml) führte zu einem weiteren Anstieg der [cAMP] um $0,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (10 nM Isoproterenol) bzw. $0,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (30 nM Isoproterenol). Diese Thrombin-induzierten Änderungen der [cAMP] waren signifikant unterschiedlich zur Änderung der [cAMP] in Kontrollzellen ($p < 0,01$; Abb. 24).

Zusammenfassend führte eine Stimulation mit Thrombin in HUVECs zur transienten Abnahme einer erhöhten [cAMP]. Diese Thrombin-induzierte Abnahme der [cAMP] beruht nicht auf der Aktivierung von G_i und einer G_i -vermittelten Hemmung von Adenylatzyklen, sondern auf einer direkten Inhibierung der AC6 durch Ca^{2+} .

3.2 Thrombin führt zu einem zeitlich verzögerten Anstieg der [cAMP]

3.2.1 Eine niedrige [cAMP] steigt nach der Stimulation mit Thrombin an

Der Thrombin-induzierten Abnahme einer erhöhten [cAMP] folgte zeitlich verzögert eine Zunahme der [cAMP] (siehe Abb. 10B), die vor allem deutlich sichtbar wurde, wenn die Thrombin-vermittelte [cAMP]-Abnahme durch Entfernung des extrazellulären Ca^{2+} (siehe Abb. 15A), durch Transfektion der AC4 (siehe Abb. 18B) oder durch Herunterregulierung der AC6 (siehe Abb. 23B) verhindert wurde. Wurden die HUVECs nicht mit Isoproterenol vorstimuliert, sodass die [cAMP] in den Zellen niedrig war, führte die Stimulation mit Thrombin (10 U/ml) zu einer Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals (R/R_0) und somit ebenfalls zu einer Zunahme der [cAMP] (Abb. 25).

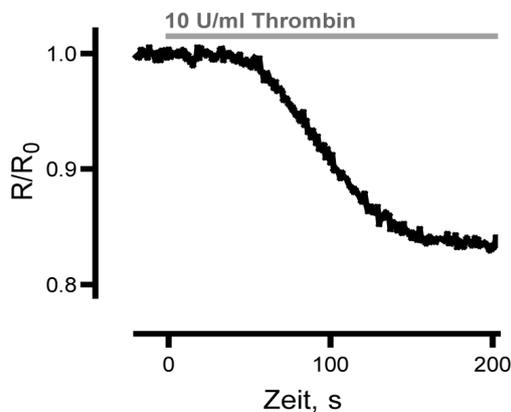


Abb. 25: Thrombin führt zur Zunahme einer niedrigen [cAMP]

Die direkte Stimulation der HUVECs mit Thrombin (10 U/ml) führte zu einer zeitlich verzögerten Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals (R/R_0) und somit zu einem Anstieg der [cAMP].

3.2.2 Der Thrombin-vermittelte [cAMP]-Anstieg ist Ca^{2+} -abhängig

Durch eine Vorinkubation der HUVECs mit BAPTA-AM, das Ca^{2+} im Zytosol komplexiert, wurde untersucht, ob die Thrombin-induzierte Zunahme der [cAMP] Ca^{2+} -abhängig verläuft. Die Vorinkubation der Zellen mit BAPTA-AM (10 μM) führte zu einer nahezu vollständigen Aufhebung des Thrombin-vermittelten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs, wie Messungen mit Fura-2-beladenen HUVECs zeigten (siehe Abb. 14). Nach der 30-minütigen Inkubation der HUVECs mit BAPTA-AM (10 μM) war die Thrombin-induzierte Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals ($R_{\text{Thrombin}}-R_0$) bzw. der [cAMP]-Anstieg signifikant erniedrigt gegenüber Kontrollzellen (Abb. 26A; $p < 0,05$; $n=14$). Des Weiteren war die Thrombin-vermittelte Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals ($R_{\text{Thrombin}}-R_0$) bei einer Durchführung der FRET-Messungen in Ca^{2+} -freier und EGTA-gepufferter, externer Lösung signifikant erniedrigt im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 26B; $p < 0,05$; $n=16$).

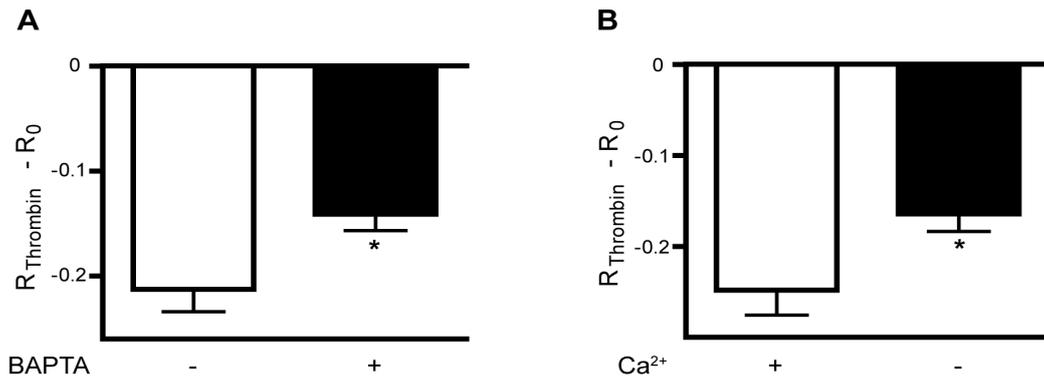


Abb. 26: Der Thrombin-induzierte Anstieg der [cAMP] ist von einem Ca^{2+} -Signal abhängig
 Die Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals ($R_{\text{Thrombin}} - R_0$) nach der Stimulation mit Thrombin (10 U/ml) wurde durch eine Vorinkubation der HUVECs mit BAPTA-AM (10 μM) signifikant gegenüber Kontrollzellen erniedrigt (A; $p < 0,05$; $n = 14$). FRET-Messungen in Ca^{2+} -freier, EGTA-gepufferter, externer Lösung führten ebenfalls zu einer Erniedrigung von $R_{\text{Thrombin}} - R_0$ in HUVECs, die signifikant im Vergleich zu Kontrollzellen war (B; $p < 0,05$; $n = 16$).

Die intrazelluläre Komplexierung von Ca^{2+} durch BAPTA oder die Entfernung von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum resultierte also in einem verringerten [cAMP]-Anstieg.

Zur Messung der Kinetik des Ca^{2+} -Signals nach der Stimulation der HUVECs mit Thrombin (10 U/ml) wurden diese mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fluo-4 markiert (vgl. 3.1.2).

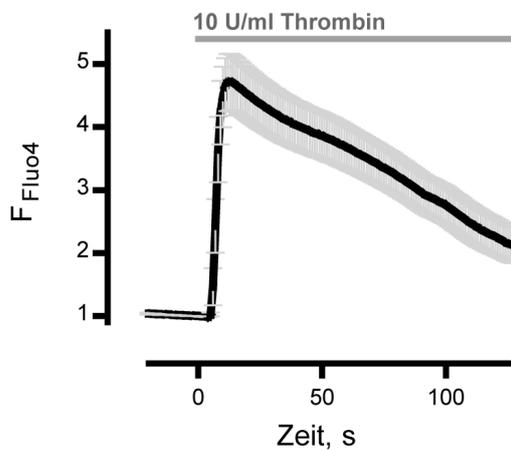


Abb. 27: Thrombin führt rasch zu einem Ca^{2+} -Signal
 HUVECs wurden mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fluo-4 markiert und mit Thrombin stimuliert (10 U/ml). Die normalisierten und gemittelten Fluo-4-Intensitäten zeigten etwa 12 s nach der Thrombin-Stimulation einen maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg und eine darauf folgende langsame Abnahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Die normalisierten und gemittelten Fluo-4-Intensitäten ergaben etwa 12 s nach der Thrombin-Stimulation einen maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg, gefolgt von einer langsamen Abnahme des Signals (Abb. 27; $n = 14$; vgl. Abb. 10).

3.2.3 Der Thrombin-vermittelte Anstieg der [cAMP] beruht nicht auf einer Calmodulin-abhängigen Aktivierung der AC8

Ein Ca^{2+} -vermittelter Anstieg der [cAMP] kann potentiell auf einer Ca^{2+} - und Calmodulin (CaM)-abhängigen Aktivierung der AC1 oder AC8 beruhen (vgl. 1.2). Um dies zu überprüfen, wurden HUVECs zunächst, zusätzlich zu Epac1-camps, mit einem Plasmid für die exogene Expression der AC8 transfiziert. Nun resultierte die Stimulation mit Thrombin (10 U/ml) in einem raschen und sehr starken Abfall des ratiometrischen FRET-Signals, sodass die Grenze des Messbereichs von Epac1-camps beinahe erreicht wurde (nicht gezeigt). Auch die Stimulation der AC8-transfizierten Zellen mit 0,5 U/ml Thrombin führte zu einem starken Abfall des ratiometrischen FRET-Signals (R/R_0 ; Beispielmessung in Abb. 28B). Im Gegensatz zu Kontrollzellen, die mit 10 U/ml Thrombin stimuliert wurden (Abb. 28A), war die Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals (R/R_0) nach der Auswaschung von Thrombin reversibel.

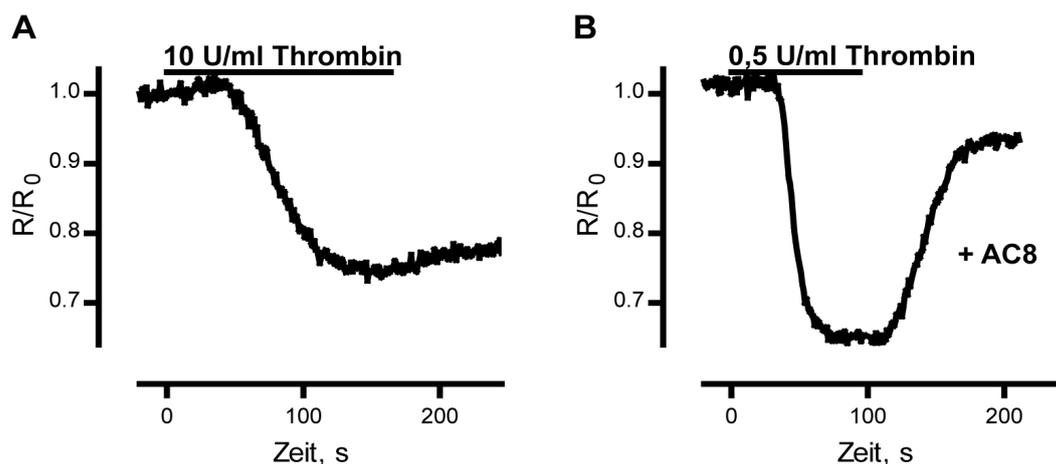


Abb. 28: Die exogene Expression der AC8 führt zu einer verstärkten Zunahme der [cAMP]
Die Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals (R/R_0) erfolgte bei exogener Expression der AC8 (Beispielmessung B) nach einer Stimulation mit 0,5 U/ml Thrombin verstärkt im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit 10 U/ml Thrombin stimuliert wurden (Beispielmessung A). Außerdem war der Thrombin-induzierte Abfall des ratiometrischen FRET-Signals in AC8-transfizierten Zellen (B) reversibel, nachdem Thrombin durch Spülung mit externer Lösung ausgewaschen wurde.

Die Transfektion der HUVECs mit Calmodulin (CaM) führte, im Vergleich zu Kontrollbedingungen, zu keiner verstärkten Thrombin-induzierten (10 U/ml) Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals ($R_{\text{Thrombin}}-R_0$; $n=16$; Abb. 29A). Auch in HUVECs, die exogen die AC8 exprimierten, resultierte die zusätzliche Transfektion von CaM nicht in einer verstärkten Thrombin-induzierten (0,5 U/ml) Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals ($R_{\text{Thrombin}}-R_0$) gegenüber Kontrollbedingungen ($n=15$; Abb. 29B). Die Transfektion der

dominant-negativen Mutante CaM12 beeinflusste jedoch die Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals in AC8-exprimierenden Zellen (Abb. 29B). Bei dieser Mutante sind zwei der vier Ca^{2+} -Bindestellen des Calmodulins mutiert, sodass an diesen beiden Bindestellen kein Ca^{2+} mehr gebunden werden kann. Über die zwei verbliebenen Ca^{2+} -Bindestellen konkurriert CaM12 jedoch noch mit endogenem Calmodulin um die Bindung an die AC8. CaM12 kann also noch an die AC8 binden, diese jedoch aufgrund der zwei fehlenden Ca^{2+} -Bindestellen nicht aktivieren (Simpson *et al.*, 2006). Die Transfektion der Mutante CaM12 führte in AC8-exprimierenden Zellen nach der Stimulation mit Thrombin (0,5 U/ml) zu einem stark verringerten Abfall des ratiometrischen FRET-Signals ($R_{\text{Thrombin}}-R_0$; Abb. 29B) bzw. zu einem sehr geringen [cAMP]-Anstieg. Die Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals ($R_{\text{Thrombin}}-R_0$) war im Vergleich zu Kontrollzellen, die CaM exogen exprimierten, signifikant erniedrigt ($p < 0,01$; $n=15$). Dagegen hatte die Transfektion der Mutante CaM12 keinen Einfluß auf das Ausmaß des [cAMP]-Anstiegs in HUVECs, die nicht mit der AC8 transfiziert wurden. Die Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals ($R_{\text{Thrombin}}-R_0$) war vergleichbar mit der Abnahme in CaM-transfizierten Zellen (Abb. 29A; $n=16$). Deshalb ist die Ca^{2+} - und CaM-abhängige Aktivierung der AC8 in HUVECs vermutlich nicht maßgeblich am beobachteten Thrombin-induzierten [cAMP]-Anstieg beteiligt.

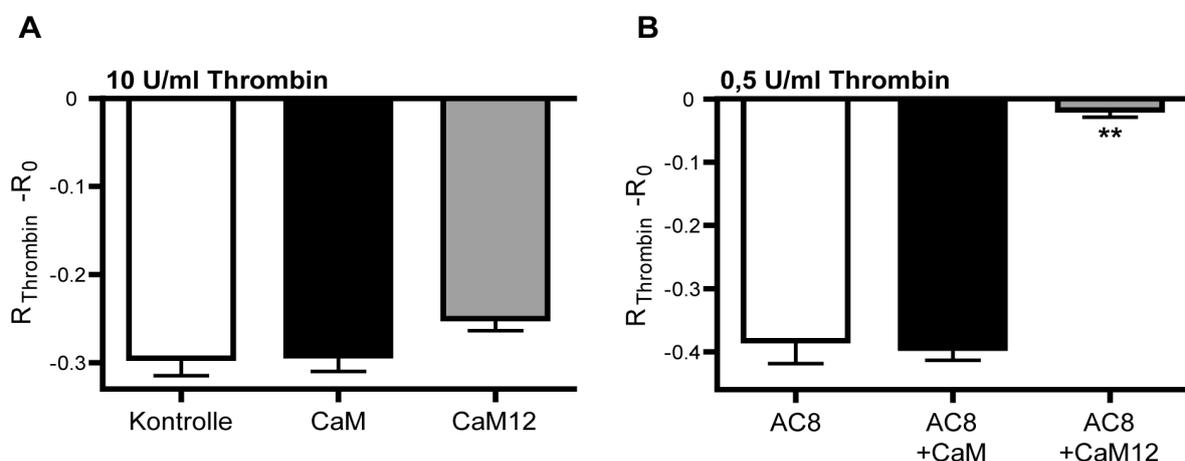


Abb. 29: Der Thrombin-vermittelte Anstieg der [cAMP] verläuft Calmodulin-unabhängig

In HUVECs bewirkte weder die Transfektion von CaM noch die Transfektion der Mutante CaM12 nach der Stimulation mit Thrombin (10 U/ml) eine signifikante Änderung des ratiometrischen FRET-Signals ($R_{\text{Thrombin}}-R_0$) im Vergleich zu Kontrollzellen (A; $n=16$).

Bei der exogenen Expression der AC8 resultierte die Stimulation der HUVECs mit 0,5 U/ml Thrombin in einer starken Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals ($R_{\text{Thrombin}}-R_0$), die der Abnahme nach der zusätzlichen Transfektion von CaM vergleichbar war ($n=15$). Bei der Transfektion der Mutante CaM12 war $R_{\text{Thrombin}}-R_0$ nach der Stimulation mit 0,5 U/ml Thrombin signifikant gegenüber Kontrollzellen verringert (B; $p < 0,01$; $n=15$).

3.2.4 Thrombin verursacht eine Aktivierung der Phospholipase A₂

Thrombin aktiviert in Endothelzellen weder über G_s noch über Ca²⁺ direkt Adenylatzyklasten. Da Thrombin aber in Endothelzellen die Bildung von Prostazyklin veranlasst, welches wiederum G_s-gekoppelte Prostazyklin-Rezeptoren stimulieren kann (Weksler *et al.*, 1978; Wheeler-Jones, 2008), wurde im Folgenden untersucht, ob die Synthese von Prostazyklin und die nachfolgende Aktivierung von Prostazyklin-Rezeptoren am Thrombin-vermittelten Anstieg der [cAMP] in HUVECs beteiligt ist.

Die Synthese von Prostazyklin und anderen Prostaglandinen wird unter anderem durch eine zytosolische Form der Phospholipase A₂ (cPLA₂) initiiert, die Arachidonsäure aus Phospholipiden der Zellmembran freisetzt. Die Arachidonsäure wird durch die Zyklooxygenasen (COX) 1 und 2 zu Prostaglandin H₂ und durch die Prostazyklinsynthase schließlich zu Prostazyklin konvertiert, welches schließlich aus dem Endothel sezerniert wird (Jaffe *et al.*, 1987; Wheeler-Jones, 2008).

Um eine mögliche Beteiligung der Ca²⁺-abhängigen cPLA₂ an dem beobachteten Anstieg der [cAMP] zu überprüfen, wurden HUVECs mit MAFP (5,8,11,14- Eicosatetraenyl-Methylester-Phosphonofluoridic-Acid; 100 µM), einem Hemmstoff aller zytosolischen PLA₂ (cPLA₂ und Ca²⁺-unabhängige iPLA₂), für mindestens 10 min vorinkubiert.

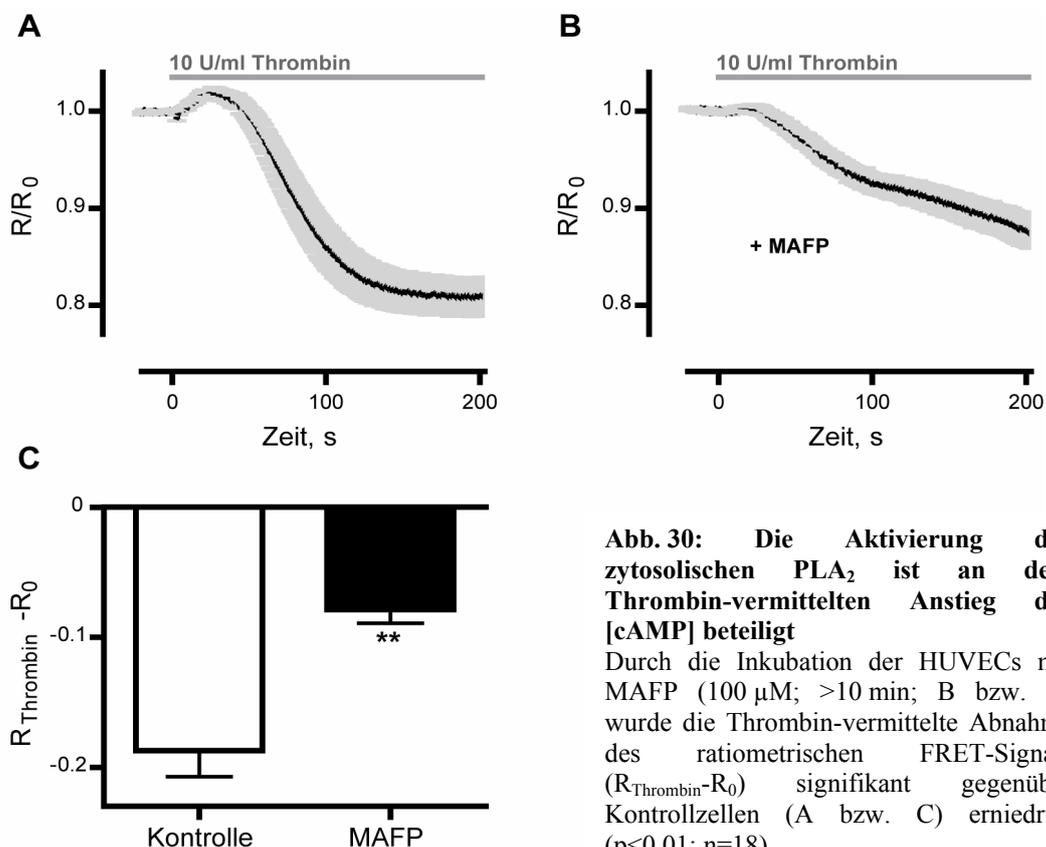


Abb. 30: Die Aktivierung der zytosolischen PLA₂ ist an dem Thrombin-vermittelten Anstieg der [cAMP] beteiligt

Durch die Inkubation der HUVECs mit MAFP (100 µM; >10 min; B bzw. C) wurde die Thrombin-vermittelte Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals (R_{Thrombin}-R₀) signifikant gegenüber Kontrollzellen (A bzw. C) erniedrigt (p<0,01; n=18).

Der zeitliche Verlauf der FRET-Experimente (R/R_0 ; $n=18$) ohne (A) bzw. mit MAFP (B) wurde jeweils gemittelt (Abb. 30). Zum statistischen Vergleich wurden die $R_{\text{Thrombin}}-R_0$ -Werte bestimmt, bei denen das ratiometrische FRET-Signal (R/R_0) einen konstanten Wert erreichte (A: 150 s) bzw. sich die Kinetik der Abnahme änderte (B: 130 s). Durch die Inkubation der HUVECs mit MAFP (100 μM) wurde die Thrombin-vermittelte Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals ($R_{\text{Thrombin}}-R_0$) bzw. der Anstieg der [cAMP] im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant reduziert (Abb. 30C; $p<0,01$; $n=18$).

3.2.5 Der Anstieg der [cAMP] wird durch die Hemmung der Zyklooxygenasen verringert

Um den Einfluss der Zyklooxygenasen (COX1 und COX2), die die Synthese von Prostaglandin H2 aus Arachidonsäure katalysieren, auf den Thrombin-induzierten [cAMP]-Anstieg in HUVECs zu untersuchen, wurden diese mit verschiedenen Hemmstoffen inhibiert. Die Zellen wurden zum einen mit Indomethacin (100 μM ; >1 h; hemmt COX1 und COX2), zum anderen mit Acetylsalicylsäure (1 mM, >30 min; hemmt COX1 und COX2) inkubiert.

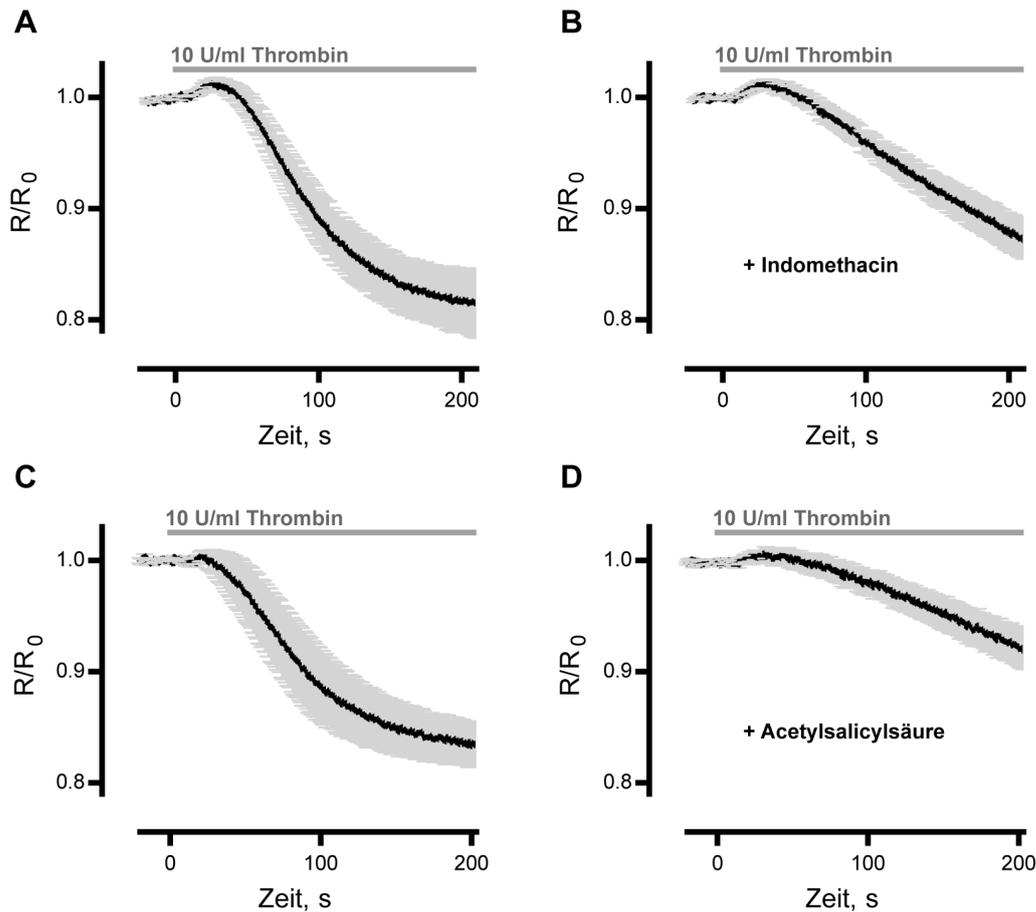


Abb. 31: Die Hemmung der COX durch Indomethacin oder Acetylsalicylsäure führt zu einer deutlich verlangsamteten Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals

Die Inkubation mit Indomethacin (100 μ M; B) oder Acetylsalicylsäure (1 mM; D) beeinflusste die Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals (R/R_0) nach einer Stimulation der HUVECs mit Thrombin (10 U/ml) im Vergleich zu Kontrollzellen (A bzw. C). Die Kinetik der Abnahme von R/R_0 war jeweils gegenüber Kontrollzellen verlangsamt.

Die Inkubation mit Indomethacin führte zu einem gegenüber den Kontrollzellen (n=15; Abb. 31A) verlangsamteten und stetigen Abfall des ratiometrischen FRET-Signals nach der Thrombin-Stimulation (R/R_0 ; n=16; B). Ebenso bewirkte die Inkubation der HUVECs mit Acetylsalicylsäure eine gegenüber Kontrollzellen (n=12; Abb. 31C) deutlich verlangsamtete Kinetik der Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals (R/R_0) nach der Stimulation mit Thrombin (10 U/ml; n=12; Abb. 31D). Außerdem fand auch diese Abnahme stetig statt. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Thrombin über die Aktivierung der zytosolischen PLA₂ und die nachfolgende Synthese von Prostazyklin, unter anderem durch die Aktivität der Zyklooxygenasen, zu einem Anstieg der [cAMP] führt.

3.2.6 Thrombin verursacht auch eine cAMP-unspezifische Änderung des ratiometrischen FRET-Signals

Willemse *et al.* (2007) berichteten, dass [ATP]-Schwankungen in Zellen bei allen FRET-Sensoren, die CFP und YFP als Donor- bzw. Akzeptorfluorophor verwenden, unspezifische Änderungen des ratiometrischen FRET-Signals verursachen können. Dies wurde deutlich, als ATP auch bei dem so genannten XProt-Sensor, der keine ATP-Bindestelle besitzt, konzentrationsabhängig zu Änderungen des ratiometrischen FRET-Signals führte. Der XProt-Sensor besteht aus einer Spaltstelle für die Protease Xa, die zwischen einem CFP und einem YFP lokalisiert ist. Mit Hilfe dieses Sensors sollten minimale und maximale ratiometrische FRET-Signale bestimmt werden.

Um zu testen, ob auch die Stimulation mit Thrombin zu einer unspezifischen, also cAMP-unabhängigen Änderung des ratiometrischen FRET-Signals in HUVECs führt, wurden diese mit dem XProt-Sensor transfiziert.

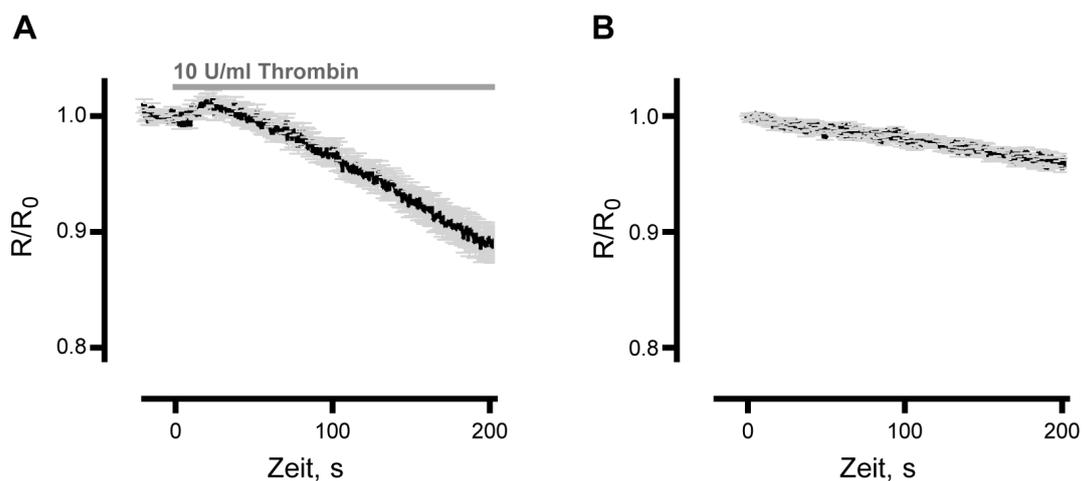


Abb. 32: Thrombin führt in HUVECs, die den XProt-Sensor exprimieren, zu einer Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals

Die Stimulation mit Thrombin (10 U/ml) verursacht auch in HUVECs, die den cAMP-unspezifischen XProt-Sensor exprimieren, eine langsame und stetige Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals (R/R_0 ; A, $n=19$). Diese langsame Abnahme beruht nicht nur auf einem Bleichen der Fluorophore (B, $n=10$).

Die Stimulation mit Thrombin (10 U/ml) resultierte in einer langsamen und stetigen Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals (R/R_0 ; Abb. 32A; $n=19$), vergleichbar der Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals nach der Thrombin-Stimulation von HUVECs, die mit Epac1-camps transfiziert und mit Indomethacin oder Acetylsalicylsäure inkubiert wurden (Abb. 31B bzw. D). Bleichexperimente (Abb. 32B; $n=10$) von HUVECs, die mit dem XProt-Sensor transfiziert wurden, zeigten, dass die stetige Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals

nicht nur durch ein Bleichen der Fluorophore bedingt ist, sondern durch die Stimulation mit Thrombin induziert wird. Es ist jedoch ein klarer Unterschied zu Messungen mit Epac1-camps unter Kontrollbedingungen erkennbar, da Thrombin in Epac1-camps-transfizierten HUVECs zu einer schnelleren Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals und einer Plateauphase nach etwa 140 s führt (Abb. 31A bzw. C). Die langsame und stetige Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals in HUVECs, die mit Indomethacin oder Acetylsalicylsäure inkubiert wurden, könnte deshalb auch cAMP-unspezifisch sein.

3.2.7 Der Prostazyklin-Rezeptor ist am Thrombin-induzierten Anstieg der [cAMP] beteiligt

Um die Relevanz des Prostazyklin-Rezeptors am Thrombin-vermittelten Anstieg der [cAMP] zu untersuchen, wurden HUVECs direkt mit dem relativ stabilen Prostazyklin-Analogen Carbaprostazyklin (10 μ M) stimuliert. Dies resultierte in einem relativ schnellen Abfall des ratiometrischen FRET-Signals (R/R_0) bzw. Anstieg der [cAMP] (Abb. 33; n=8).

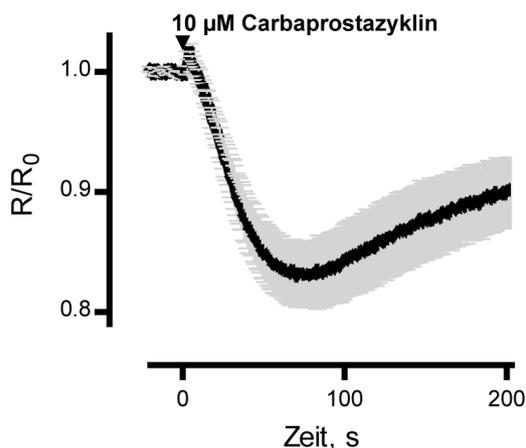


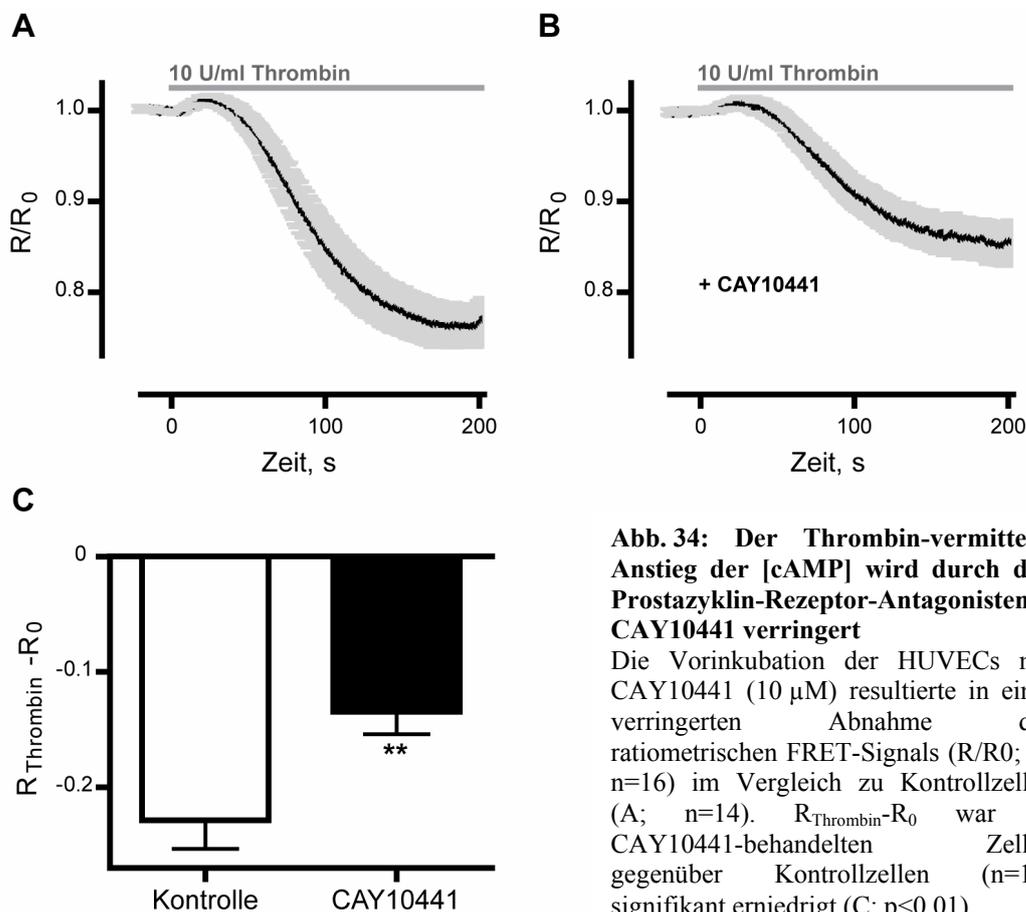
Abb. 33: Carbaprostazyklin führt in HUVECs zu einem raschen Anstieg der [cAMP]

Nach der Zugabe von Prostazyklin (10 μ M) folgte nach etwa 5 s der Abfall des ratiometrischen FRET-Signals (R/R_0) in HUVECs (n=8).

Die Carbaprostazyklin-induzierte Änderung des gemittelten ratiometrischen FRET-Signals ($R_{\text{Carbaprostazyklin}} - R_0$) betrug $-0,17 \pm 0,03$ (n=8) und ist somit mit der Änderung des ratiometrischen FRET-Signals nach einer Stimulation mit Thrombin vergleichbar ($R_{\text{Thrombin}} - R_0$, vgl. Abb. 30C, Kontrolle). Der Anstieg der [cAMP] erfolgte bereits nach etwa 5 s, wobei Carbaprostazyklin, im Unterschied zu Thrombin, nicht über das Perfusionssystem superfundiert, sondern per Hand zupipettiert wurde. Auch wenn die Kinetiken deshalb nicht direkt verglichen werden können, ist ein klarer Unterschied zwischen dem [cAMP]-Anstieg nach direkter Stimulation des Prostazyklin-Rezeptors mit Carbaprostazyklin (beginnend nach etwa 5 s) und dem [cAMP]-Anstieg nach einer Stimulation mit Thrombin und einer eventuell nachfolgenden Prostazyklinbildung (beginnend nach etwa 40 s; vgl. Abb. 25), erkennbar. Der

[cAMP]-Anstieg war, im Gegensatz zu einer Thrombin-Stimulation (vgl. Abb. 30A), nach der Stimulation mit Carbaprostazyklin teilweise reversibel, das heißt die [cAMP] nahm mit der Zeit wieder etwas ab. Dies liegt möglicherweise daran, dass Carbaprostazyklin (10 μ M) einmalig zupipettiert wurde, während Prostazyklin, bei der Superfusion der Zellen mit Thrombin, ständig neu gebildet wird.

Außerdem wurde die Wirkung eines Prostazyklin-Rezeptor-Antagonisten (CAY10441, Synonym: RO1138452) auf den Thrombin-vermittelten Anstieg der [cAMP] untersucht, um die Relevanz des Prostazyklin-Rezeptors direkt zu testen. Dazu wurde CAY10441 (10 μ M) in die externe Lösung der FRET-Messung vorgelegt, bevor die HUVECs mit Thrombin (10 U/ml) stimuliert wurden.



Die Vorinkubation der HUVECs mit CAY10441 (10 μ M) resultierte in einem deutlich verringerten Anstieg der [cAMP], wie die gemittelten ratiometrischen FRET-Signale (R/R₀) der Zellen ohne bzw. mit CAY10441 jeweils zeigen (Abb. 34A bzw. B). R_{Thrombin}-R₀ war zu dem Zeitpunkt, als das ratiometrische FRET-Signal (R/R₀) ein stabiles Plateau erreichte, bei einer Vorinkubation von HUVECs mit dem Prostazyklin-Rezeptor-Antagonisten CAY10441

(n=16) signifikant gegenüber Kontrollzellen (n=14) verringert (Abb. 34C). Dies weist darauf hin, dass eine Thrombin-vermittelte Stimulation des Prostazyklin-Rezeptors zum beobachteten [cAMP]-Anstieg führt.

3.2.8 Bestimmung der [cAMP] in HUVECs nach der Stimulation mit Thrombin

Mit Hilfe der erstellten *in vivo*-Kalibrierungskurve von Epac1-camps (siehe 3.1.6) wurde der durchschnittliche [cAMP]-Anstieg 160 s nach der Stimulation von HUVECs mit Thrombin (10 U/ml) errechnet. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die [cAMP] vor der Stimulation weniger als 10 nM in den Zellen beträgt. Es wurden sämtliche Kontrollexperimente (3.2.2-3.2.7) in die Auswertung einbezogen. Thrombin verursacht demnach einen [cAMP]-Anstieg von weniger als 10 nM auf $1,04 \pm 0,10 \mu\text{M}$ (n=53). Berücksichtigt man bei der Berechnung der [cAMP] jedoch die cAMP-unspezifische Änderung des ratiometrischen FRET-Signals nach einer Stimulation mit Thrombin, die bei FRET-Messungen mit dem XProt-Sensor auftrat, so ergibt sich ein [cAMP]-Anstieg auf $0,63 \pm 0,08 \mu\text{M}$ (n=53). Die [cAMP] wurde dabei aus den $R_{\text{Thrombin}}-R_0$ -Werten nach der Subtraktion des durchschnittlichen $R_{\text{Thrombin}}-R_0$ -Werts aus den Messungen mit dem XProt-Sensor (160 s nach der Stimulation mit Thrombin: -0,07), errechnet.

Der durch Thrombin verursachte Anstieg der [cAMP] in Endothelzellen erfolgt also über die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der cPLA₂, eine, unter anderem durch die COX vermittelte, Synthese von Prostazyklin aus Arachidonsäure, dessen Freisetzung und die Aktivierung G_s-gekoppelter Prostazyklin-Rezeptoren von Endothelzellen, gefolgt schließlich von der Aktivierung von Adenylatzyklasen durch G_s. Ist die im Endothel dominante AC6 bereits aktiviert, wie zum Beispiel nach einer Stimulation der Zellen mit Isoproterenol, verursacht Thrombin über eine direkt durch Ca^{2+} vermittelte Inhibierung der AC6 eine transiente Abnahme der [cAMP], der zeitlich verzögert der Prostazyklin-abhängige Anstieg der [cAMP] folgt.

3.3 Expression von Epac-camps im Endothel transgener Mäuse

Die FRET-basierten Echtzeitmessungen der [cAMP]-Änderungen im Zellkultursystem stellen einen bedeutenden Fortschritt gegenüber den herkömmlichen immunbiologischen Analysen dar. Dennoch wird gerade die Physiologie der Endothelzellen im Gefäß stark von Faktoren aus der unmittelbaren Umgebung beeinflusst. Deshalb ist die Messung der [cAMP]-Änderungen in Endothelzellen, die sich innerhalb eines Gewebes befinden, von sehr großer Bedeutung. Der FRET-basierte cAMP-Sensor Epac1-camps ist nach einer Transfektion der Plasmid-DNA in den Zellen genetisch codiert und wird in Folge als Protein exprimiert. Durch die Integration der entsprechenden DNA-Sequenz ins Genom der Maus, können daher transgene Tiere generiert werden, die in ihren Zellen Epac1-camps exprimieren. Ziel dieser Arbeit war es, transgene Mäuse mit einer ausschließlichen Expression von Epac-camps in Endothelzellen zu generieren.

3.3.1 Generierung der Mauslinie Tie2-Epac2

Für eine Endothel-spezifische Expression des FRET-Sensors wurde Epac2-camps unter Kontrolle des Tie2-Promotors (Tie2: Angiopietinrezeptor) als Transgen in das Genom eingefügt. Der cAMP-Sensor Epac2-camps wurde anstelle von Epac1-camps verwendet, da die Klonierung von Tie2-Epac1 aufgrund fehlender Restriktionsstellen technisch nicht möglich war. Dieser Sensor ist identisch wie Epac1-camps aufgebaut, benutzt jedoch die cAMP-Bindedomäne des Epac2-Proteins. Im Vergleich zu Epac1-camps besitzt Epac2-camps eine höhere Affinität für cAMP (etwa 2,5-fach), aber eine etwas geringere Signalamplitude und langsamere Aktivierungskinetik (Nikolaev *et al.*, 2004).

Wie unter 2.2.1.6 beschrieben, wurde das Plasmid pTie2-Epac2 kloniert, das Konstrukt anschließend linearisiert und gereinigt (siehe 2.2.2.1), in Maus-Eizellen injiziert (Pronukleus-Injektion) und diese dann scheinträchtigen Ammentieren eingesetzt. Die Genotypisierung der Nachkommen erfolgte durch die Vervielfältigung des Epac2-camps-Transgens aus genomischer DNA, die aus einer Schwanzbiopsie gewonnen wurde (siehe 2.2.2.2). Durch die PCR mit Transgen-spezifischen Primern wurden vier transgene Tiere detektiert (Abb. 35). Als Kontrolle für eine erfolgreiche Präparation genomischer DNA wurde parallel eine PCR zur Vervielfältigung des Bereichs eines Wildtypgens (Sp) durchgeführt (siehe 2.2.2.2).

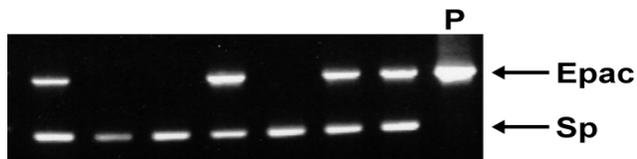


Abb. 35: Genotypisierung der Nachkommen aus der Pronukleus-Injektion von Tie2-Epac2

Aus genomischer DNA der Nachkommen wurden mit Hilfe Transgen-spezifischer Primer (Epac) vier transgene Nachkommen identifiziert, die somit Epac2-camps in ihr Genom eingebaut haben. Das Plasmid pcDNA3-Epac (P) diente als Positivkontrolle der PCR. Eine Kontroll-PCR mit Sp-spezifischen Primern diente dem Nachweis einer erfolgreichen Präparation genomischer DNA.

Zur Überprüfung des jeweiligen Expressionsgrads des FRET-Sensors Epac2-camps in den transgenen Tieren, wurden eine Präparation des Musculus Cremaster von jeweils einem transgenen Nachkommen der Ursprungstiere durchgeführt und die Gefäße dieses Muskels hinsichtlich der Intensität der Fluoreszenz untersucht.

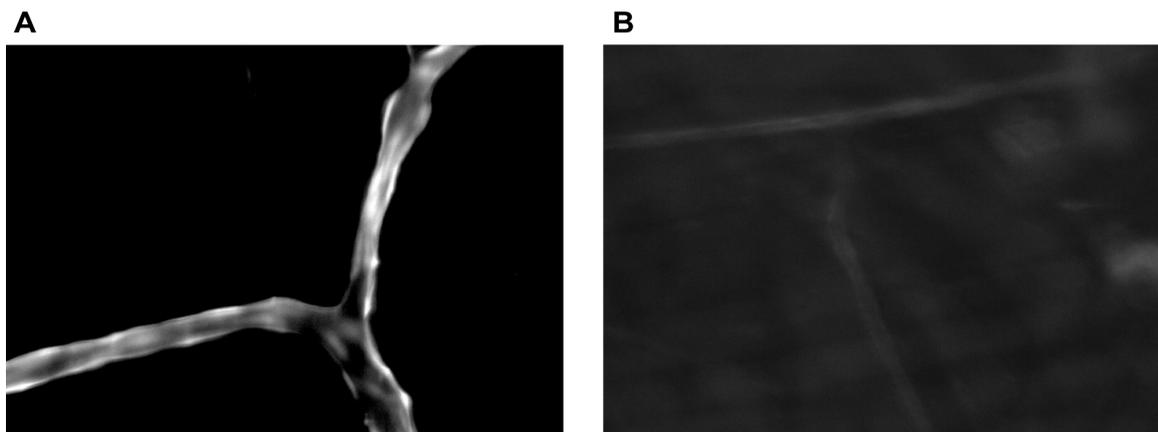


Abb. 36: Präparation des Musculus Cremaster aus transgenen Mäusen

In den Gefäßen des Musculus Cremaster aus Tie2-GFP-Mäusen war die Expression von GFP deutlich zu sehen (A). Bei den Nachkommen aller vier transgenen Tie2-Epac2-Linien (repräsentatives Beispiel: B) war die Fluoreszenz der Gefäße sehr schwach und in etwa mit der Autofluoreszenz der Gefäße in Wildtyp-Tieren vergleichbar (nicht gezeigt).

Als Positivkontrolle fungierte dabei der Musculus Cremaster aus Mäusen der Tie2-GFP-Linie (Motoike T *et al.*, 2000), die unter dem Endothel-spezifischen Tie2-Promotor das grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimieren (Abb. 36A). Es konnte in keiner der vier transgenen Linien eine messbare Expression von Epac2-camps nachgewiesen werden (repräsentatives Beispiel; Abb. 36B).

3.3.2 Kreuzung der Mauslinien CAG-CAT-Epac und Tie2-Cre

Eine weitere Möglichkeit transgene Mäuse mit einer endothelspezifischen Expression von Epac-camps zu generieren, war die Verwendung eines Cre-Rekombinase/loxP-Ansatzes. Dazu wurden Tiere der transgenen Mauslinien CAG-CAT-Epac (von Hayn, Würzburg) und Tie2-Cre (Prof. Kuhn, Würzburg) gekreuzt (Kawamoto *et al.*, 2000; Kisanuki *et al.*, 2001). Tiere der transgenen Linie CAG-CAT-Epac exprimieren unter dem ubiquitären β -Aktin-Promotor (CAG) die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT). Das CAT-Gen ist dabei von zwei so genannten loxP-Sequenzen flankiert, sodass durch eine Rekombination der Cre-Rekombinase dieser Bereich ausgeschnitten wird, und dadurch Epac1-camps unter Kontrolle des β -Aktin-Promotors exprimiert wird (Abb. 37). Wird die Expression der Cre-Rekombinase, wie bei der Linie Tie2-Cre, durch den Endothel-spezifischen Promotor Tie2 kontrolliert, so wird Epac1-camps ausschließlich im Endothel exprimiert.

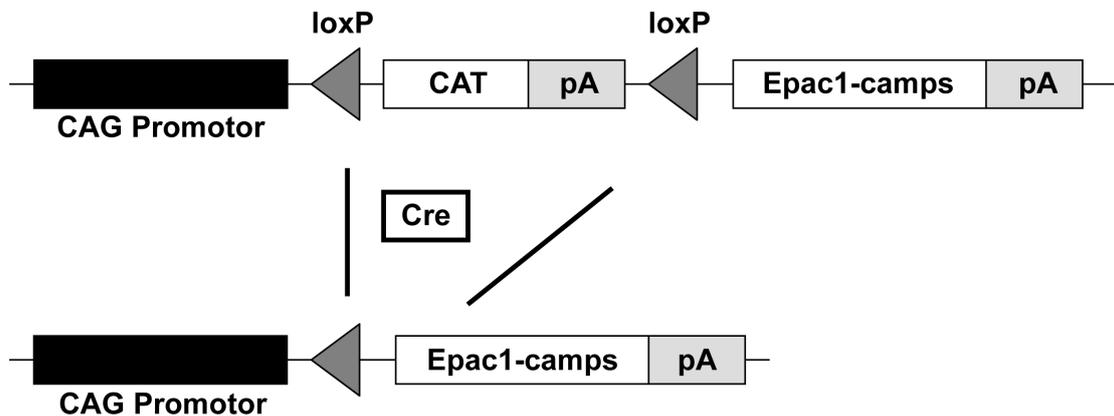


Abb. 37: Cre-Rekombinase/loxP-Ansatz zur gewebespezifischen Expression von Epac1-camps

Das loxP-flankierte CAT-Gen wird unter Kontrolle des ubiquitären β -Aktin-Promotors (CAG) exprimiert. Eine gewebespezifische Expression der Cre-Rekombinase sorgt durch Rekombination der loxP-Bereiche für ein Ausschneiden des CAT-Gens und so für eine gewebespezifische Expression von Epac1-camps.

Es wurden 12 transgene CAG-CAT-Epac-Linien, die durch eine Pronukleus-Injektion generiert wurden, hinsichtlich der Expressionsstärke von Epac1-camps untersucht. Dazu wurden vaskuläre Glattmuskelzellen aus den Tieren präpariert und mit einem Plasmid für die Cre-Rekombinase (pcDNA-Cre) transfiziert (von Hayn, Würzburg). Es wurde nur bei Zellen aus einer Linie eine schwache Expression von Epac1-camps detektiert. Diese Linie wurde mit der Tie2-Cre-Linie gekreuzt.

Zur Genotypisierung der Nachkommen aus der Kreuzung der heterozygoten Linien CAG-CAT-Epac und Tie2-Cre wurde genomische DNA aus der Schwanzspitze präpariert und eine

PCR durchgeführt. Durch die Verwendung Epac1-camps- und Tie2-Cre-spezifischer Primer wurde überprüft, welche Nachkommen beide transgene Allele erhalten haben (siehe 2.2.2.3; Abb. 38).

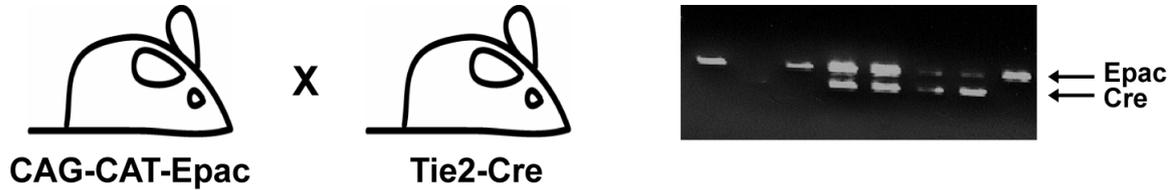


Abb. 38: Kreuzung der Mauslinien CAG-CAT-Epac und Tie2-Cre

Die Genotypisierung durch eine PCR mit Epac1-camps- bzw. Tie2-Cre-spezifischen Primern zeigte, welche Nachkommen aus der Kreuzung der heterozygoten Linien CAG-CAT-Epac und Tie2-Cre beide transgene Allele besitzen.

Schließlich wurden pulmonäre Endothelzellen aus doppelt transgenen Nachkommen präpariert (siehe 2.2.2.4) und die Expressionsstärke und Funktionalität des Sensors Epac1-camps überprüft (Abb. 39).

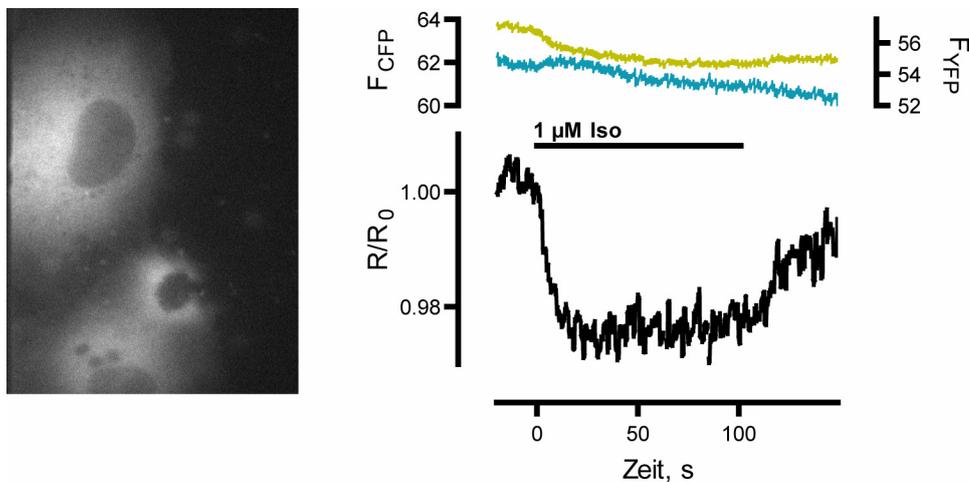


Abb. 39: Test von Epac1-camps in pulmonären Endothelzellen aus transgenen Mäusen

Pulmonäre Endothelzellen exprimierten den FRET-Sensor Epac1-camps. Die Emissionen von CFP (F_{CFP}) und YFP (F_{YFP}) waren zwar relativ niedrig, die Stimulation einer Endothelzelle mit Isoproterenol ($1 \mu\text{M}$) resultierte aber in einer Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals (R/R_0).

Es konnte eine Expression von Epac1-camps detektiert werden, und die Stimulation einer Endothelzelle mit Isoproterenol ($1 \mu\text{M}$) führte auch zu einer Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals (R/R_0 ; Abb. 39). Dies zeigte, dass die gewebespezifische Expression von Epac1-camps mit Hilfe des Cre-Rekombinase/loxP-Ansatzes prinzipiell funktioniert.

Allerdings war die Expression dieser Linie nicht ausreichend, um mit Hilfe eines Zwei-Photonen-Mikroskops cAMP-Messungen in Endothelzellen, die sich innerhalb eines Gewebes befinden, durchzuführen. Deshalb müssen in Zukunft weitere CAG-CAT-Epac-Linien generiert werden, oder eventuell ein anderer, ubiquitärer und starker Promotor anstatt des β -Aktin-Promotors verwendet werden, um einen höheren Expressionsgrad von Epac1-camps zu erzielen.

4 Diskussion

Ca²⁺- und cAMP-Signale sind entscheidend an der Regulation der endothelialen Barrierefunktion beteiligt. Während ein Anstieg der intrazellulären [Ca²⁺] die Permeabilität des Endothels für Makromoleküle und Flüssigkeit erhöht, sorgt ein lokaler Anstieg der [cAMP] durch eine gesteigerte Adhäsion der Zellen für eine Aufrechterhaltung der Barriere. Es ist bekannt, dass Thrombin die Permeabilität des Endothels erhöht. Dies geschieht nicht nur über einen Anstieg der intrazellulären [Ca²⁺] und eine Ca²⁺-vermittelte Kontraktion der Endothelzellen, sondern vermutlich auch über eine Erniedrigung der [cAMP] (Mehta & Malik, 2006; Michel & Curry, 1999). Eine Thrombin-induzierte Abnahme der [cAMP] wurde bisher nur in immunbiologischen Analysen nachgewiesen. Da Ca²⁺- und cAMP-Signale jedoch zeitlich und räumlich sehr komplex ablaufen und sich auch gegenseitig regulieren, war es das Ziel dieser Studie, Thrombin-induzierte Ca²⁺-Signale und deren Einfluss auf die [cAMP] in Echtzeit und mit hoher zeitlicher Auflösung in lebenden Zellen zu untersuchen. Dazu wurden HUVECs mit dem FRET-basierten cAMP-Sensor Epac1-camps transfiziert. Für eine spätere Untersuchung der cAMP-Signale innerhalb eines vaskulären Gewebes oder *in vivo* wurden transgene Mäuse generiert, die diesen Sensor in Endothelzellen exprimieren.

4.1 Thrombin bewirkt die transiente Abnahme einer erhöhten [cAMP] und einen zeitlich verzögerten [cAMP]-Anstieg

Die Stimulation von HUVECs mit Thrombin (10 U/ml) führt zu einem raschen Ca²⁺-Signal mit einer maximalen Ca²⁺-Konzentration nach etwa 13 s und einer darauf folgenden langsamen Abnahme der [Ca²⁺] (siehe Abb. 10A und Abb. 27). Überraschenderweise reagierten HUVECs, deren cAMP-Level niedrig war (<10 nM), etwa 40 s nach Beginn der Thrombin-Stimulation (siehe Abb. 25) mit einem [cAMP]-Anstieg. Waren die cAMP-Level der HUVECs zum Zeitpunkt der Thrombin-Gabe bereits durch eine Vorstimulation mit Isoproterenol (10 nM) erhöht, so konnte zuerst eine Abnahme der [cAMP] beobachtet werden, der aber zeitlich verzögert ebenso ein [cAMP]-Anstieg folgte (siehe Abb. 10B).

Durch die Stimulation β -adrenerger Rezeptoren mit 10 nM Isoproterenol fällt das ratiometrische FRET-Signal (R/R₀) etwa auf einen halbmaximalen Wert bezüglich des maximalen Messbereichs von Epac1-camps (siehe Abb. 7). Um die [cAMP] und Thrombin-induzierte Änderungen der [cAMP] in einzelnen Zellen abschätzen zu können, wurden die Änderungen des ratiometrischen FRET-Signals *in vivo* mit einer *in vitro* Kalibrierung von Epac1-camps verglichen (siehe Abb. 17). Die Übertragung der *in vitro* [cAMP] auf eine *in vivo* [cAMP] beruhte dabei auf zwei Annahmen: Erstens wurde davon ausgegangen, dass die

[cAMP] in einer ruhenden Zelle nach der Superfusion mit externem Puffer weniger als 10 nM beträgt, und zweitens wurde angenommen, dass die [cAMP] nach der Stimulation mit 1 μ M Isoproterenol, die zu einer Sättigung des Sensors Epac1-camps führt, auf mehr als 100 μ M ansteigt (siehe Beispielmessung Abb. 17).

Die Stimulation der HUVECs mit 10 nM Isoproterenol führte zu einem durchschnittlichen Anstieg der [cAMP] auf durchschnittlich 1,2 μ M (siehe Abb. 19, Kontrolle). Diese Konzentration liegt im optimalen Messbereich von Epac1-camps (EC_{50} : 1,5 μ M, siehe Abb. 17), sodass sowohl eine Thrombin-induzierte Abnahme also auch eine Zunahme der [cAMP] gut untersucht werden konnten. Durch die zusätzliche Stimulation der HUVECs mit Thrombin (10 U/ml) wurden die erhöhten cAMP-Level (1,2 μ M) zunächst um durchschnittlich 0,4 μ M erniedrigt (siehe Abb. 19, Kontrolle). Diese Abnahme ist in etwa mit den Ergebnissen aus Enzym-immunbiologischen *in vitro* Untersuchungen an PMVECs und HDMECs vergleichbar. In PMVECs verursachte Thrombin nach einer Vorinkubation der Zellen mit dem PDE4-Hemmstoff Rolipram eine [cAMP]-Abnahme um etwa 50 % (Cioffi *et al.*, 2002). In HDMECs nahm die [cAMP] bei einer Inkubation mit Thrombin um ca. 40 % ab (Baumer *et al.*, 2008). Die hohe zeitliche Auflösung der Echtzeitmessungen mit Epac1-camps zeigte jedoch, dass Thrombin in HUVECs (siehe Abb. 9) und HDMECs (siehe Abb. 8) zu einer transienten Abnahme der [cAMP] führt: Nach etwa 30 s erreichte die [cAMP] einen minimalen Wert und stieg danach wieder an (siehe Abb. 8B und 10B). Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der herkömmlichen immunbiologischen Analysen, in denen die Abnahme der [cAMP] in PMVECs nach einer 5-minütigen Inkubation mit Thrombin (Cioffi *et al.*, 2002), und in HDMECs sogar erst nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten (Baumer *et al.*, 2008) detektiert wurde. Allerdings lassen sich immunbiologische Analysen nicht direkt mit FRET-basierten Echtzeitmessungen vergleichen. In den immunbiologischen Analysen wird die totale [cAMP] eines Zell-Lysats relativ zum Proteingehalt oder der Zellzahl bestimmt. Da das exakte zytosolische Volumen einer Zelle schwierig zu bestimmen ist, ermöglichen diese Analysen keine Angabe absoluter [cAMP]. Deshalb ist es schwierig, kleine Veränderungen der [cAMP] genau und mit hoher zeitlicher Auflösung zu detektieren. In FRET-basierten Analysen hingegen werden Veränderungen der [cAMP] in einzelnen lebenden Zellen, die sich innerhalb einer dichten Zellschicht befinden, in Echtzeit gemessen. Die Verwendung eines schnellen Superfusionssystems erlaubt die kontrollierte Applikation von Thrombin, sodass das exakte Zeitfenster der Thrombin-induzierten [cAMP]-Veränderungen detektiert werden kann. Außerdem kann mit Hilfe der *in vitro* Kalibrierung

von Epac1-camps und den gemessenen Änderungen des ratiometrischen FRET-Signals die [cAMP] abgeschätzt werden.

In Permeabilitätsstudien wurde bereits nach 30 s eine Thrombin-induzierte Abnahme der elektrischen Impedanz einer dichten Zellschicht boviner PAECs oder PVMECs gemessen (Tirupathi *et al.*, 1992). Auch die maximale transendotheliale Durchgangsrate von Albumin durch eine dichte Zellschicht boviner PAECs trat innerhalb von 2 min nach einer Thrombinstimulation auf (Lum *et al.*, 1992). Diese Ergebnisse setzen eine schnelle Ca^{2+} -vermittelte Regulation von cAMP-Signalen voraus, wie sie in der vorliegenden Studie detektiert wurde. Allerdings hielt der Thrombin-induzierte Anstieg der endothelialen Permeabilität ein bis zwei Stunden an (Baumer *et al.*, 2009; Tirupathi *et al.*, 1992), bevor der Ausgangszustand wiederhergestellt wurde. Da die [cAMP] in der Echtzeitmessung während der Thrombingabe nur transient abnahm und schon nach 30 s wieder anstieg, stellt sich die Frage, wie und ob es unter diesen Bedingungen zu einer lang anhaltenden Permeabilitätserrhöhung kommt. Zahlreiche Studien zeigten, dass erhöhte cAMP-Spiegel, wie zum Beispiel nach einer Vorbehandlung der Endothelzellen mit Forskolin, einen Thrombin- oder Histamin-induzierten Anstieg der Permeabilität vollständig verhinderten (Baumer *et al.*, 2009; Carson *et al.*, 1989; Garcia *et al.*, 1995; Tirupathi *et al.*, 1992). Auch die exogene Expression der durch Ca^{2+} aktivierten AC8 (siehe 1.2) in PMVECs verhinderte fast vollständig die Thrombin-induzierte Bildung von interzellulären Lücken (Cioffi *et al.*, 2002). Andere Studien beobachteten jedoch, dass cAMP einen Thrombin-induzierten Permeabilitätsanstieg nicht verhindert, sondern nur dessen Ausmaß vermindert (Fukuhara *et al.*, 2005; Qiao *et al.*, 2003). Moy *et al.* (1998) zeigten, dass ein vorausgehender [cAMP]-Anstieg in HUVECs nach Aktivierung der ACs durch Forskolin eine Thrombin-induzierte Phosphorylierung der MLC nicht verhinderte, und deshalb trotz einer erhöhten [cAMP] eine MLC-abhängige Spannung aufgebaut wurde, die letztendlich zu einem Permeabilitätsanstieg führte. Allerdings wurde die Regenerationszeit bis zur Wiederherstellung der Barriere drastisch, nämlich von 60 min auf 10 min, verkürzt. Deshalb ist anzunehmen, dass die durch Thrombin hervorgerufene transiente Abnahme eines durch Isoproterenol erhöhten cAMP-Levels, die in der vorliegenden Studie beobachtet wurde, diese initiale Permeabilitätserrhöhung unterstützt. Sie resultiert jedoch vermutlich nicht in einer anhaltenden Erhöhung der Permeabilität.

Überraschenderweise zeigten die FRET-basierten Echtzeitmessungen der [cAMP], dass der Thrombin-induzierten, transienten Abnahme der [cAMP] ein [cAMP]-Anstieg folgt, der außerdem auch dann auftrat, wenn die [cAMP] zuvor nicht durch Isoproterenol oder Forskolin

erhöht wurde (siehe Abb. 25). Trotzdem verursacht Thrombin eine Permeabilitätssteigerung, wie Messungen des transendothelialen elektrischen Widerstands oder der transendothelialen Durchgangsraten für Albumin bestätigten (Lum *et al.*, 1992; Tirupathi *et al.*, 1992). Entweder ist der Thrombin-induzierte Anstieg der [cAMP] zu gering, um die Thrombin-vermittelte Kontraktion der Endothelzellen zu verhindern, oder diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse sind in den unterschiedlichen Versuchsaufbauten begründet. Auch bei HDMECs, bei denen Thrombin in den FRET-Messungen zu einem zeitlich verzögerten Anstieg der [cAMP] führt (siehe Abb. 8), verursachte Thrombin eine Abnahme des transendothelialen elektrischen Widerstands einer dichten Zellschicht, die auf einer Elektrode kultiviert wurde (Baumer *et al.*, 2009). Um die physiologische Relevanz des Thrombin-vermittelten [cAMP]-Anstiegs letztlich zu überprüfen, müssen in Zukunft *in vivo* FRET-Messungen durchgeführt werden. Es besteht die Möglichkeit, mittels Einzel-Kapillar-Perfusionstechnik die vaskuläre Permeabilität zum Beispiel in Mikrogefäßen des Mesenteriums *in vivo* zu messen (Schlegel *et al.*, 2009). Mit Hilfe einer transgenen Maus, die Epac1-camps im Endothel exprimiert, könnten unter vergleichbaren Versuchsbedingungen mit einem Zwei-Photonen-Mikroskop Thrombin-induzierte [cAMP]-Änderungen *in vivo* bestimmt werden. Die FRET-Messungen an pulmonären Endothelzellen aus den in dieser Arbeit generierten transgenen Mäusen zeigten, dass Epac1-camps bei Anwendung des Cre-Rekombinase/loxP-Ansatzes funktionell in Endothelzellen exprimiert wurde (siehe Abb. 39). Die Expression von Epac1-camps im Endothel der transgenen Mäuse, die aus der Kreuzung der Linien CAG-CAT-Epac und Tie2-Cre entstanden, war jedoch nicht ausreichend, um FRET-Messungen innerhalb eines Gewebes durchzuführen. Deshalb müssen in Zukunft, eventuell unter Verwendung von anderen starken und ubiquitären Promotoren anstatt des β -Aktin-Promotors (CAG), weitere transgene Linien mit einer stärkeren Expression von Epac1-camps generiert werden.

4.2 Thrombin führt zu einer Ca^{2+} -abhängigen Hemmung der dominanten AC6

Für den Thrombin-Rezeptor PAR1 ist eine Kopplung an G_q , $G_{12/13}$ und das PTX-sensitive G_i -Protein beschrieben (McLaughlin *et al.*, 2005; Vandenbroucke *et al.*, 2008). Manolopoulos *et al.* (1997) begründeten eine Thrombin-induzierte Abnahme eines erhöhten cAMP-Niveaus in mikrovaskulären Endothelzellen aus dem Nebennierenmark der Ratte mit einer G_i -vermittelten Hemmung von Adenylatzyklasen, da eine Inkubation der Zellen mit PTX die inhibitorische Wirkung von Thrombin auf [cAMP] aufhob, während die Komplexbildung von Ca^{2+} durch BAPTA keinen Effekt zeigte. Die in den FRET-Messungen der vorliegenden Studie detektierte transiente Abnahme der [cAMP] wurde jedoch nicht durch eine Inkubation

der HUVECs mit PTX beeinflusst (siehe Abb. 11), sodass hierfür die Aktivierung von G_i vermutlich keine Rolle spielt. Die Wirksamkeit von PTX in Bezug auf die Inhibierung von G_i wurde durch die Western Blot-Analyse einer G_i -abhängigen ERK-Phosphorylierung bestätigt (siehe Abb. 12; Montiel *et al.*, 2006). Auch die Komplexierung von Ca^{2+} durch BAPTA zeigte, ähnlich wie bei Manolopoulos *et al.* (1997), keinen Effekt (siehe Abb. 14C). Die Durchführung der Messungen in Ca^{2+} -freier und EGTA-gepufferter, externer Lösung führte jedoch zu einer vollständigen Aufhebung der [cAMP]-Abnahme und verdeutlichte stattdessen einen Thrombin-induzierten [cAMP]-Anstieg (siehe Abb. 15). Des Weiteren resultierte die Applikation eines Ca^{2+} -Ionophors (A23187) bei HUVECs, die zuvor mit Forskolin behandelt wurden, ebenfalls in einer transienten Abnahme der [cAMP] (siehe Abb. 13). Dies lässt den Schluss zu, dass die Thrombin-induzierte Abnahme der [cAMP] Ca^{2+} -abhängig verläuft. Eine Beteiligung der Ca^{2+} -abhängigen PDE1 konnte ausgeschlossen werden, da der PDE1-spezifische Hemmstoff 8MM-IBMX keine signifikante Änderung bezüglich der Abnahme der [cAMP] verursachte (siehe Abb. 16). Da auch kein direkter [cAMP]-Anstieg bei akuter Zugabe von 8MM-IBMX, wie in PDE1-exprimierenden Glattmuskelzellen, beobachtet werden konnte, wird die PDE1 vermutlich in HUVECs nicht exprimiert. Auch andere Studien konnten keine PDE1-Aktivität in HUVECs feststellen (Netherton & Maurice, 2004; Seybold *et al.*, 2005).

Da Endothelzellen jedoch die direkt durch Ca^{2+} inhibierten AC5 und AC6 exprimieren (Bunday & Insel, 2003; Chetham *et al.*, 1997; Stevens *et al.*, 1995), wurde die Ca^{2+} -vermittelte Hemmung der AC5 und AC6 näher untersucht (Abb. 40).

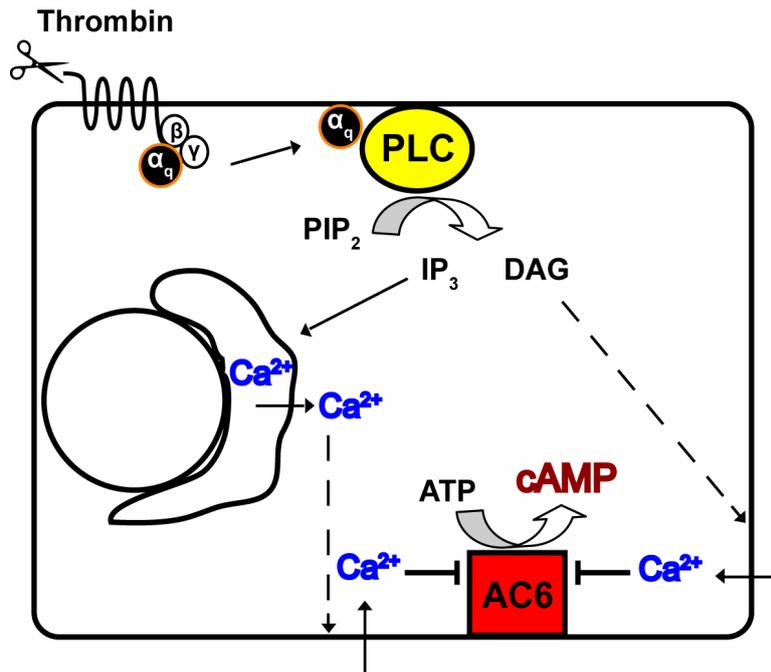


Abb. 40: Nach einer Thrombin-Stimulation wird die AC6 durch einen kapazitiven Ca²⁺-Einstrom gehemmt

Die Aktivierung des Thrombin-Rezeptors PAR1 führt zu einer G_{αq}-vermittelten Aktivierung der PLC, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. IP₃ diffundiert zum ER, woraufhin Ca²⁺ ausgeschüttet wird. Diese Ca²⁺-Freisetzung, und indirekt auch DAG, verursachen einen kapazitiven Ca²⁺-Einstrom aus dem Extrazellulärraum, der die in HUVECs dominante AC6 direkt hemmt, sodass schließlich weniger cAMP gebildet wird.

Die Ca²⁺-Messungen mit Fluo-4-markierten HUVECs zeigten, dass einem raschen Ca²⁺-Peak (15 s nach der Thrombin-Zugabe) ein langsamer Konzentrationsabfall folgte, der über 200 s anhielt (siehe Abb. 10A). Dies ist mit Ca²⁺-Messungen an Fura-2-beladenen bovinen PAECs vergleichbar (Lum *et al.*, 1992). Dieses lang anhaltende Ca²⁺-Signal stellt vermutlich den so genannten kapazitiven Ca²⁺-Einstrom dar, der durch den initialen Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER hervorgerufen wird. Dieser kapazitative Ca²⁺-Einstrom ist wirksam an der Regulation der AC5 und AC6 beteiligt (Chiono *et al.*, 1995; Fagan *et al.*, 1998). Der vollständige Verlust der Thrombin-induzierten Hemmung des cAMP-Signals bei FRET-Messungen in Ca²⁺-freier externer Lösung (siehe Abb. 15) ist somit ein Hinweis auf eine Beteiligung der AC5 und AC6. Die Transfektion der HUVECs mit der AC6 resultierte in einer signifikant verstärkten Abnahme der [cAMP] gegenüber Kontrollzellen (siehe Abb. 19). Wurden schließlich die HUVECs mit siRNA gegen die AC5 und AC6 transfiziert, so wurde die Thrombin-induzierte [cAMP]-Abnahme vollständig aufgehoben (siehe Abb. 23B). Dies ist der erste direkte Nachweis, dass Thrombin in Endothelzellen zu einer Ca²⁺-vermittelten Hemmung der AC6 führt (Abb. 40). Durch die Quantifizierung der AC5- und AC6-Transkripte anhand von Real-Time-PCR-Analysen, wurde deutlich, dass die AC6 die dominante, durch Ca²⁺ inhibierbare

Adenylatzyklase in HUVECs darstellt, während die Expression der AC5 zu vernachlässigen ist. Dies bestätigt die Ergebnisse aus Real-Time-PCR-Analysen der AC-Transkripte an HUVECs von Bunday & Insel (2003). Außerdem führte die Herunterregulierung der AC6 durch siRNA zu einer signifikant erniedrigten [cAMP]-Zunahme nach einer Stimulation der HUVECs mit 10 nM Isoproterenol im Vergleich zu Kontrollzellen (siehe Abb. 23C). Also stellt die AC6 in funktionaler Hinsicht den in HUVECs dominierenden AC-Subtyp dar. Interessanterweise resultierte auch die Transfektion der Ca^{2+} -unabhängigen AC4 in einer signifikant erniedrigten [cAMP]-Zunahme nach der Isoproterenol-Stimulation (siehe Abb. 18C) und einer vollständigen Aufhebung der Thrombin-induzierten, transienten [cAMP]-Abnahme (siehe Abb. 18B und D). Die AC4 konkurriert anscheinend in ihrer Aktivität mit der endogen exprimierten AC6, da keine Ca^{2+} -abhängige Hemmung der AC6 mehr beobachtet werden konnte. Zugleich ist sie aber weniger wirksam, sodass nach der Stimulation mit Isoproterenol weniger cAMP gebildet wurde.

Es konnte auch bei der Transfektion der AC6 kein basaler Anstieg der [cAMP] und somit keine Basalaktivität der AC6 beobachtet werden, sodass die Thrombin-induzierte Hemmung der AC6 vermutlich nur bei einer vorhergehenden Aktivierung der ACs, zum Beispiel durch Isoproterenol, von Bedeutung ist. Die Thrombin-induzierte Abnahme eines niedrigen cAMP-Levels kann aufgrund der Bindungsaffinität des FRET-Sensors nicht ausgeschlossen werden. Da die meisten durch cAMP regulierten Proteine jedoch eine [cAMP] über 100 nM benötigen, hat eine mögliche weitere Abnahme der [cAMP] vermutlich keinen Einfluss auf zelluläre Funktionen.

4.3 Thrombin verursacht die Synthese und Ausschüttung von Prostazyklin

Der transienten Abnahme erhöhter cAMP-Spiegel durch Thrombin folgte ein weiterer Anstieg der [cAMP] (siehe Abb. 25). Dieser Thrombin-vermittelte [cAMP]-Anstieg wurde durch die Transfektion der Ca^{2+} -unabhängigen AC4 (siehe Abb. 18B), durch die Messungen in Ca^{2+} -freier, EGTA-gepufferter externer Lösung (siehe Abb. 15A) und durch die Herunterregulierung der Ca^{2+} -inhibierten AC6 (siehe Abb. 23B) noch verdeutlicht. Vermutlich ist dieser [cAMP]-Anstieg auch die Ursache dafür, dass die Inhibierung der AC6 durch Ca^{2+} nur vorübergehend auftritt, da diese durch einen zeitlich verzögerten [cAMP]-Anstieg überdeckt wird. Wurden HUVECs ausschließlich mit Thrombin stimuliert, so erfolgte nach etwa 40 s ein langsamer Anstieg der [cAMP], der nach etwa 150 s maximal war (siehe Abb. 30A).

Dieser Thrombin-vermittelte [cAMP]-Anstieg ist Ca^{2+} -abhängig. Sowohl die Komplexierung des intrazellulären Ca^{2+} durch BAPTA (siehe Abb. 26A), als auch die Wegnahme von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum durch Verwendung einer Ca^{2+} -freien, EGTA-gepufferten externen Lösung (siehe Abb. 26B), resultierten in einem verringerten [cAMP]-Anstieg. Vermutlich resultiert fehlendes Ca^{2+} im Extrazellulärraum mit der Zeit in einer Verringerung der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Deswegen kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob der Thrombin-induzierte [cAMP]-Anstieg von einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch die Ausschüttung aus intrazellulären Speichern oder von einem kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom abhängt.

Bei einer exogenen Expression der AC8, die Ca^{2+} -und CaM-abhängig aktiviert wird, waren deutliche Unterschiede im Verlauf des Thrombin-vermittelten [cAMP]-Anstiegs im Vergleich zu Kontrollzellen erkennbar: Der [cAMP]-Anstieg erfolgte selbst bei einer geringeren Thrombin-Konzentration (0,5 U/ml) rascher, war stärker als in Kontrollzellen und durch Spülung mit externer Lösung reversibel (siehe Abb. 28). Außerdem wurde der Thrombin-vermittelte [cAMP]-Anstieg in AC8-exprimierenden HUVECs nach der zusätzlichen Transfektion der dominant-negativen CaM-Mutante CaM12 nahezu vollständig verhindert. In Kontrollzellen hingegen fand der [cAMP]-Anstieg unabhängig von der Expression der Mutante CaM12 statt (siehe Abb. 29). Deshalb kann unter Kontrollbedingungen die Ca^{2+} /CaM-vermittelte Stimulierung der Adenylatzyklen AC1 und AC8 ausgeschlossen werden (Cali *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 1991). Abgesehen davon, dass diese Adenylatzyklen vor allem im Gehirn exprimiert werden, würde eine Expression im Endothel den physiologischen Nutzen der Ca^{2+} -vermittelten Hemmung der AC6 aufheben. Außerdem spricht der verzögerte Beginn des [cAMP]-Anstiegs (nach etwa 40 s) und dessen langsame Kinetik gegen eine direkte Aktivierung von Adenylatzyklen.

Da Thrombin in Endothelzellen jedoch auch die Synthese von Prostazyklin veranlasst (Jaffe *et al.*, 1987; Weksler *et al.*, 1978), und der Prostazyklin-Rezeptor an das G_s -Protein gekoppelt ist, welches Adenylatzyklen stimuliert, wurde dieser Signalweg näher untersucht (Abb. 41).

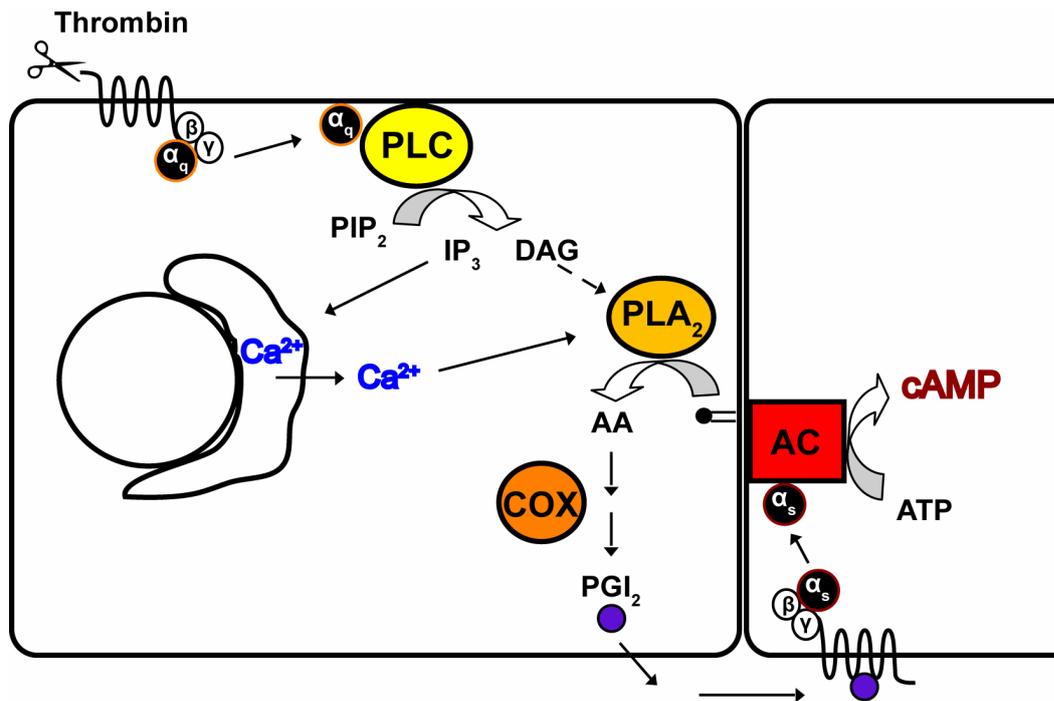


Abb. 41: Thrombin führt über die Synthese und Ausschüttung von Prostazyklin zu einem Anstieg der [cAMP]

Die IP₃-vermittelte Ausschüttung von Ca²⁺ aus dem ER aktiviert die PLA₂, die Arachidonsäure (AA) aus Phospholipiden der Membran freisetzt. DAG führt über Aktivierung der PKC indirekt auch zu einer Aktivierung der PLA₂. Die COX konvertiert Arachidonsäure zu Prostaglandin H₂ (nicht gezeigt), aus dem Prostazyklin (PGI₂) synthetisiert wird. Prostazyklin stimuliert schließlich G_s-gekoppelte Prostazyklin-Rezeptoren, sodass aktivierte Adenylatzyklasen vermehrt cAMP bilden.

Der erste Schritt der Prostazyklin-Synthese ist die Freisetzung von Arachidonsäure (AA) aus Membranphospholipiden durch die Phospholipase A₂ (PLA₂). An der Prostazyklinsynthese ist dabei vermutlich die zytosolische und Ca²⁺-abhängige Gruppe der cPLA₂ und eventuell auch die Ca²⁺-unabhängige Gruppe der iPLA₂ beteiligt, wie für humane mikrovaskuläre Blasen-Endothelzellen gezeigt wurde (Burke & Dennis, 2009; Portell *et al.*, 2006; Wheeler-Jones, 2008). Die Vorinkubation der HUVECs mit MAFP, einem Hemmstoff aller zytosolischen PLA₂ (cPLA₂ und Ca²⁺-unabhängige iPLA₂), verringerte den Thrombin-vermittelten [cAMP]-Anstieg (siehe Abb. 30C). Also verursacht Thrombin vermutlich eine Aktivierung der zytosolischen PLA₂. Die cPLA₂ wird vor allem über den IP₃-vermittelten Anstieg des intrazellulären [Ca²⁺] aktiviert. Zusätzlich sorgt DAG, das neben IP₃ durch die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat durch die PLC-β frei wird, durch die Aktivierung der PKC für eine Inaktivierung von Lipocortin, das einen Inhibitor der PLA₂ darstellt (Jaffe *et al.*, 1987). Außerdem wird die Prostazyklin-Synthese nach Wheeler-Jones (2008) auch durch eine ERK1/2-abhängige Aktivierung der cPLA₂ reguliert.

Die durch die PLA₂ freigesetzte Arachidonsäure wird durch die Cyclooxygenasen COX1 oder COX2 (akute oder länger anhaltende Prostaglandinsynthese) zu Prostaglandin H₂ konvertiert,

und schließlich Prostazyklin durch die Prostazyklinsynthese gebildet (Wheeler-Jones, 2008). Die Hemmung von COX1 und COX2 durch Indomethacin oder Acetylsalicylsäure (siehe Abb. 31B bzw. D) resultierte in einer stark verlangsamten und reduzierten Thrombin-induzierten Abnahme des ratiometrischen FRET-Signals. Dieser langsame Abfall des Signals spiegelt vermutlich eine cAMP-unabhängige Konformationsänderung des FRET-Sensors wider, da Thrombin auch bei der Verwendung eines cAMP-unabhängigen FRET-Sensors (XProt-Sensor; Willemsen *et al.*, 2007) eine sehr ähnliche Änderung des ratiometrischen FRET-Signals hervorrief (siehe Abb. 32A). Dies zeigte, dass die COX1 bzw. COX2 maßgeblich am Thrombin-induzierten [cAMP]-Anstieg beteiligt sind.

Endothelzellen exprimieren hohe Level der Prostazyklinsynthese, und Prostazyklin ist das vorrangig synthetisierte Prostaglandin in Endothelzellen (Wheeler-Jones, 2008). Weiterhin zeigten Real-Time-PCR-Daten, dass der Prostazyklinrezeptor den häufigsten G_s -gekoppelten Prostaglandinrezeptor in HUVECs darstellt (Bundey & Insel, 2006). Deshalb wurde der Prostazyklin-Rezeptor-Antagonist CAY10441 (Synonym: RO1138452; Jones *et al.*, 2006) verwendet, um die Beteiligung des Rezeptors am [cAMP]-Anstieg zu überprüfen. Die starke Verringerung des [cAMP]-Anstiegs nach der Vorinkubation der HUVECs mit CAY10441 (siehe Abb. 34C) ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Thrombin über die Synthese und Ausschüttung von Prostazyklin zu einer G_s -vermittelten Bildung von cAMP führt. Die direkte Aktivierung der Prostazyklin-Rezeptoren durch das relativ stabile Prostazyklin-Analogen Carbaprostazyklin führte bereits nach etwa 5 s zu einem, im Vergleich zur Thrombin-Stimulation, raschen [cAMP]-Anstieg (siehe Abb. 33). Die absolute Änderung des ratiometrischen FRET-Signals war dabei mit der Thrombin-induzierten Änderung (siehe Abb. 34A) vergleichbar. Dies bedeutet, dass die direkte Stimulation der Prostazyklin-Rezeptoren mit Carbaprostazyklin und die durch Thrombin induzierte Stimulation einen ähnlichen Anstieg der [cAMP] von weniger als 10 nM auf etwa 0,6 μ M (siehe 3.2.8) verursachen. Da der Thrombin-vermittelte [cAMP]-Anstieg erst nach etwa 40 s beginnt, dauert die Thrombin-induzierte Prostazyklin-Synthese und dessen Ausschüttung ungefähr 35 s. Weksler *et al.* (1978) beobachteten in einer dichten Schicht humaner Endothelzellen etwa 2 min nach einer kurzen Thrombin-Stimulation die maximale Prostazyklinsynthese. Dies korreliert mit der maximalen cAMP-Bildung etwa 150 s nach Zugabe von Thrombin in der vorliegenden Studie.

Dieser Thrombin-induzierte [cAMP]-Anstieg widerspricht, wie schon diskutiert wurde (siehe 4.1), den Ergebnissen immunbiologischer [cAMP]-Bestimmungen. Eine Studie detektierte jedoch nach einem viralen Gentransfer der AC6 in HUVECs einen gegenüber Kontrollzellen

reduzierten Thrombin-vermittelten Permeabilitätsanstieg, der auf einer Thrombin-induzierten Prostazyklinsynthese und der Aktivierung des Prostazyklinrezeptors beruhte (Bundey & Insel, 2006). Diese Studie postulierte, dass Thrombin über Prostazyklin nach dem viralen Gentransfer der AC6 in HUVECs zu einer verstärkten Bildung von cAMP führte, das schließlich den Permeabilitätsanstieg verringerte.

Wie lassen sich nun die scheinbar widersprüchlichen Wirkungen des Thrombins erklären? Einerseits ist Thrombin bei einer Gefäßverletzung entscheidend an der Koagulationskaskade beteiligt (siehe 1.3), indem es die Aktivierung und Aggregation der Blutplättchen und die Fibrinvernetzung fördert, wodurch schließlich ein Blutgerinnsel gebildet wird. Andererseits schützt Prostazyklin im Allgemeinen das Gefäßsystem, da es die Plättchenaggregation hemmt und eine Erweiterung der Blutgefäße bewirkt (Armstrong & Golan, 2005). Die bei einer Gefäßverletzung durch Thrombin induzierte Prostazyklinsynthese in benachbarten, intakten Endothelzellen stellt vermutlich eine Möglichkeit dar, die Aktivierung der Blutplättchen und die Thrombenbildung auf den Ort der Verletzung zu beschränken (Weksler *et al.*, 1978; Wheeler-Jones, 2008). Ebenso hilft eventuell der Prostazyklin-vermittelte [cAMP]-Anstieg, die Thrombin-induzierte Lückenbildung der Endothelzellen, den Anstieg der Permeabilität und letztlich eine Ödembildung in intakten Bereichen des Gefäßes zu verhindern, oder zeitlich zu beschränken.

Zusammenfassend zeigten FRET-basierte cAMP-Messungen an einzelnen lebenden Endothelzellen (HUVECs, HDMECs), dass die Stimulation mit Thrombin über einen Anstieg des intrazellulären $[Ca^{2+}]$ zu einer direkten Hemmung der dominanten AC6 und somit zu einer Abnahme der [cAMP] führt, falls die AC6 zuvor durch eine Stimulation der Zellen mit Isoproterenol aktiviert wurde. Außerdem verursacht Thrombin die Synthese und Ausschüttung von Prostazyklin, das über die Aktivierung G_s -gekoppelter Rezeptoren zu einem zeitlich verzögerten [cAMP]-Anstieg führt. Da die FRET-basierten cAMP-Messungen auch bei pulmonären Endothelzellen aus den generierten transgenen Mäusen funktionierten, werden in Zukunft noch weitere transgene Mauslinien generiert, um die Expression von Epac1-camps im Endothel zu erhöhen. Dadurch können die Thrombin-induzierten [cAMP]-Änderungen mit Hilfe eines Zwei-Photonen-Mikroskops auch im Gewebe und *in vivo* untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Das Endothel bildet eine einschichtige Zellbarriere zwischen Blut und interstitiellem Gewebe, deren Durchlässigkeit entscheidend durch die sekundären Botenstoffe Ca^{2+} und cAMP reguliert wird. Während Ca^{2+} durch eine verstärkte Kontraktion der Endothelzellen die Permeabilität erhöht, fördert cAMP die Adhäsion der Zellen und unterstützt somit die Barrierefunktion. Es ist bekannt, dass Thrombin durch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und vermutlich auch durch eine Hemmung der cAMP-Konzentration zu einer Permeabilitätserhöhung führt. Ziel dieser Arbeit war es, Thrombin-induzierte Änderungen der cAMP-Konzentration in Echtzeit in lebenden Endothelzellen mittels Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer (FRET) zu untersuchen. Hierfür wurden Human-Umbilical-Vein-Endothelial-Cells (HUVECs) mit dem FRET-basierten cAMP-Sensor Epac1-camps transfiziert. Die Bindung von cAMP an Epac1-camps führt zu einer Konformationsänderung des Sensors und damit zu einer Abschwächung des FRET. Mit Hilfe dieses Sensors kann die cAMP-Konzentration mit hoher zeitlicher Auflösung in einzelnen lebenden Zellen gemessen werden.

Untersucht wurde der Effekt von Thrombin auf die cAMP-Konzentration in Endothelzellen, deren cAMP-Konzentration durch Stimulierung endogener β -Rezeptoren erhöht war. Thrombin erniedrigte Ca^{2+} -abhängig die cAMP-Konzentration um ca. 30 %. Dieser Abfall der cAMP-Konzentration folgte zeitlich verzögert dem Thrombin-induzierten Ca^{2+} -Signal. Die cAMP-Konzentration erreichte ca. 30 s nach der Thrombinzugabe ein Minimum und stieg danach wieder an. Durch die Herunterregulierung der durch Ca^{2+} direkt inhibierten Adenylatzyklase 6 (AC6) mittels siRNA wurde die Thrombin-induzierte Abnahme der cAMP-Konzentration vollständig aufgehoben. Dies bestätigte, dass Thrombin durch die Ca^{2+} -vermittelte Inhibierung der AC6 eine Abnahme der cAMP-Konzentration verursacht.

Ohne β -adrenerge Stimulation führte die Applikation von Thrombin zu einem langsamen Anstieg der cAMP-Konzentration, der mehrere Minuten anhielt. Dieser cAMP-Konzentrationsanstieg beruhte auf der Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung der Phospholipase A_2 (PLA_2). Diese setzt Arachidonsäure aus Membranphospholipiden frei, die als Substrat für die Synthese verschiedener Prostaglandine dient. Durch die pharmakologische Beeinflussung von Zyklooxygenasen und Prostazyklinrezeptoren konnte gezeigt werden, dass die Synthese von Prostazyklin und die anschließende Stimulation G_s -gekoppelter Prostazyklinrezeptoren zum Thrombin-induzierten Anstieg der cAMP-Konzentration führte.

Da die Physiologie der Endothelzellen im Gefäß stark von Faktoren aus der unmittelbaren Umgebung beeinflusst wird, ist die Messung der Änderungen der cAMP-Konzentration in

Endothelzellen, die sich innerhalb eines Gewebes befinden, von sehr großer Bedeutung. Deshalb war die Generierung transgener Mäuse mit einer gewebespezifischen Expression des FRET-Sensors Epac1-camps in Endothelzellen ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Durch Anwendung eines Cre-Rekombinase/loxP-Ansatzes konnten transgene Mäuse generiert werden, die Epac1-camps spezifisch in Endothelzellen exprimierten. An isolierten pulmonären Endothelzellen konnte die Funktionalität des transgen exprimierten Sensors Epac1-camps nachgewiesen werden.

Die Echtzeitmessung der Thrombin-induzierten Änderungen der cAMP-Konzentration verdeutlichte ein zeitlich sehr komplexes Wechselspiel zwischen Ca^{2+} - und cAMP-Signalen, das die Barrierefunktion des Endothels maßgeblich beeinflussen wird. Die transgene Expression von Epac1-camps in Endothelzellen ermöglicht in Zukunft die Untersuchung der Thrombin-verursachten Änderungen der cAMP-Konzentration und der Permeabilität innerhalb eines intakten Gefäßes.

5 Summary

Endothelial cells form a semi permeable barrier between blood and interstitial tissues. The permeability of this barrier is mainly regulated by the second messengers Ca^{2+} and cAMP. While Ca^{2+} increases the permeability by inducing cell contraction, cAMP increases the adherence of the cells and, thereby, supports the barrier function. The Ca^{2+} -elevating agent thrombin was demonstrated to increase endothelial permeability and to decrease cAMP levels. The aim of this thesis was to investigate thrombin-induced changes of the cAMP concentration in real time in living endothelial cells via fluorescence resonance energy transfer (FRET). Therefore, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were transfected with the FRET-based cAMP sensor Epac1-camps. Binding of cAMP to the binding domain of Epac1-camps induces a conformational change of the sensor that results in a decrease of FRET. With help of this sensor, changes in cAMP concentration can be monitored with high temporal resolution.

First, the influence of thrombin on cAMP levels was investigated after elevating cAMP levels by stimulation of β -adrenergic receptors. Thrombin led to a Ca^{2+} -dependent decrease of cAMP levels by approximately 30 %. The decrease of cAMP levels was delayed compared to the thrombin-induced Ca^{2+} signal. This decrease was also transient and reached a minimum value 30 s after thrombin stimulation. A siRNA-mediated downregulation of the Ca^{2+} -inhibited adenylyl cyclase 6 (AC6) completely abolished the thrombin-induced decrease of cAMP concentration. This provided the first direct evidence that the Ca^{2+} -mediated inhibition of AC6 accounts for the thrombin-induced decrease in cAMP levels.

In the absence of a β -adrenergic-mediated increase of cAMP concentration, thrombin led to a slow increase in cAMP concentration that lasted for several minutes. This increase in cAMP concentration was caused by the Ca^{2+} -dependent activation of phospholipase A_2 (PLA_2). PLA_2 releases arachidonic acid, which represents the substrate for prostaglandin synthesis. It was confirmed by pharmacological interference of cyclooxygenases and prostacyclin receptors that the synthesis of prostacyclin and subsequent stimulation of G_s -protein-coupled prostacyclin receptors caused the thrombin-induced increase in cAMP concentration.

The real time monitoring of changes in cAMP concentration in endothelial cells within the vascular system is highly important as the physiology of endothelial cells *in vivo* is strongly influenced by factors contained in the surrounding blood or tissue. Therefore, a further aim of this thesis was the generation of transgenic mice expressing the FRET-based sensor Epac1-camps specifically in endothelial cells. Using a Cre-recombinase/loxP-approach transgenic

mice were generated that specifically expressed Epac1-camps in endothelial cells, and the functionality of the transgenic sensor was proven in isolated pulmonary endothelial cells.

Real time monitoring of thrombin-induced changes of cAMP concentration in endothelial cells revealed a temporally complex crosstalk between Ca^{2+} and cAMP signals that will affect endothelial barrier function. The transgenic expression of Epac1-camps opens the door for the investigation of thrombin-induced changes of cAMP levels and of endothelial permeability within intact vessels.

6 Literaturverzeichnis

Abdullaev IF, Bisailon JM, Potier M, Gonzalez JC, Motiani RK & Trebak M (2008). Stim1 and Orai1 mediate CRAC currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. *Circ Res* **103**, 1289-1299.

Adams SR, Harootunian AT, Buechler YJ, Taylor SS & Tsien RY (1991). Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature* **349**, 694-697.

Adamson RH, Curry FE, Adamson G, Liu B, Jiang Y, Aktories K, Barth H, Daigeler A, Golenhofen N, Ness W & Drenckhahn D (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 RH, Liu B, Fry GN, Rubin LL & Curry FE (1998). Microvascular permeability and number of tight junctions are modulated by cAMP. *Am J Physiol* **274**, 1885-1894.

Adamson RH, Ly JC, Sarai RK, Lenz JF, Altangerel A, Drenckhahn D & Curry FE (2008). Epac/Rap1 pathway regulates microvascular hyperpermeability induced by PAF in rat mesentery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**, 1188-1196.

Ahmed GU & Malik AB (2005). Functional role of TRPC channels in the regulation of endothelial permeability. *Pflugers Arch* **451**, 131-142.

Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y & Kaibuchi K (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* **271**, 20246-20249.

Andriopoulou P, Navarro P, Zanetti A, Lampugnani MG & Dejana E (1999). Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* **19**, 2286-2297.

Armstrong AW & Golan DE (2005). Pharmacology of hemostasis and thrombosis. In Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy, ed. Golan DE, pp. 335-356. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA.

Ayoub MA, Maurel D, Binet V, Fink M, Prezeau L, Ansanay H & Pin JP (2007). Real-time analysis of agonist-induced activation of protease-activated receptor 1/Galphai1 protein complex measured by bioluminescence resonance energy transfer in living cells. *Mol Pharmacol* **71**, 1329-1340.

Bacskai BJ, Hochner B, Mahaut-Smith M, Adams SR, Kaang BK, Kandel ER & Tsien RY (1993). Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in Aplysia sensory neurons. *Science* **260**, 222-226.

Baez S (1973). An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by *in vivo* microscopy. *Microvasc Res* **5**, 384-394.

Baumer Y, Drenckhahn D & Waschke J (2008). cAMP induced Rac1-mediated cytoskeletal reorganization in microvascular endothelium. *Histochem Cell Biol* **129**, 765-778.

- Baumer Y, Spindler V, Werthmann RC, Bünemann M & Waschke J (2009). Role of Rac1 and cAMP in endothelial barrier stabilization and thrombin-induced barrier breakdown. *J Cell Physiol* **220**, 716-726.
- Bazzoni G & Dejana E (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* **84**, 869-901.
- Beazely MA & Watts VJ (2006). Regulatory properties of adenylate cyclases type 5 and 6: A progress report. *Eur J Pharmacol* **535**, 1-12.
- Beech DJ (2009). Harmony and discord in endothelial calcium entry. *Circ Res* **104**, e22-e23.
- Benz PM, Blume C, Moebius J, Oschatz C, Schuh K, Sickmann A, Walter U, Feller SM & Renné T (2008). Cytoskeleton assembly at endothelial cell-cell contacts is regulated by alphaII-spectrin-VASP complexes. *J Cell Biol* **180**, 205-219.
- Bogatcheva NV, Garcia JGN & Verin AD (2001). Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochemistry* **67**, 75-84.
- Braun A, Varga-Szabo D, Kleinschnitz C, Pleines I, Bender M, Austinat M, Bösl M, Stoll G & Nieswandt B (2009). Orai1 (CRACM1) is the platelet SOC channel and essential for pathological thrombus formation. *Blood* **113**, 2056-2063.
- Broman MT, Kouklis P, Gao X, Ramchandran R, Neamu RF, Minshall RD & Malik AB (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.
- Bundey RA & Insel PA (2003). Quantification of adenylyl cyclase messenger RNA by real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* **319**, 318-322.
- Burke JE & Dennis EA (2009). Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res* **50**, 237-242.
- Cali JJ, Zwaagstra JC, Mons N, Cooper DMF & Krupinski J (1994). Type VIII adenylyl cyclase. A Ca²⁺/calmodulin-stimulated enzyme expressed in discrete regions of rat brain. *J Biol Chem* **269**, 12190-12195.
- Chetham PM, Guldemeester HA, Mons N, Brough GH, Bridges JP, Thompson WJ & Stevens T (1997). Ca²⁺-inhibitable adenylyl cyclase and pulmonary microvascular permeability. *Am J Physiol* **273**, 22-30.
- Chiono M, Mahey R, Tate G & Cooper DMF (1995). Capacitative Ca²⁺ entry exclusively inhibits cAMP synthesis in C6-2B glioma cells. Evidence that physiologically evoked Ca²⁺ entry regulates Ca²⁺-inhibitable adenylyl cyclase in non-excitabile cells. *J Biol Chem* **270**, 1149-1155.
- Chung CT, Niemela SL & Miller RH (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad USA* **86**, 2172-2175.

Cioffi DL, Moore TM, Schaack J, Creighton JR, Cooper DM & Stevens T (2002). Dominant regulation of interendothelial cell gap formation by calcium-inhibited type 6 adenylyl cyclase. *J Cell Biol* **157**, 1267-1278.

Cioffi DL & Stevens T (2006). Regulation of endothelial cell barrier function by store-operated calcium entry. *Microcirculation* **13**, 709-723.

Comerford KM, Lawrence DW, Synnestvedt K, Levi BP & Colgan SP (2002). Role of vasodilator-stimulated phosphoprotein in PKA-induced changes in endothelial junctional permeability. *FASEB J* **16**, 583-585.

Cooper DMF (2003). Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochem J* **375**, 517-529.

Coughlin SR (2000). Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* **407**, 258-264.

Cullere X, Shaw SK, Andersson L, Hirahashi J, Lusinskas FW & Mayadas TN (2005). Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase. *Blood* **105**, 1950-1955.

Daly RJ (2004). Cortactin signalling and dynamic actin networks. *Biochem J* **382**, 13-25.

Diller TC, Madhusudan, Xuong NH & Taylor SS (2001). Molecular basis for regulatory subunit diversity in cAMP-dependent protein kinase: crystal structure of the type II beta regulatory subunit. *Structure* **9**, 73-82.

Draijer R, Atsma DE, van der Laarse A & van Hinsbergh VW (1995). cGMP and nitric oxide modulate thrombin-induced endothelial permeability. Regulation via different pathways in human aortic and umbilical vein endothelial cells. *Circ Res* **76**, 199-208.

Dudek SM & Garcia JG (2001). Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol* **91**, 1487-1500.

Essler M, Amano M, Kruse HJ, Kaibuchi K, Weber PC & Aepfelbacher M (1998). Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells. *J Biol Chem* **273**, 21867-21874.

Essler M, Staddon JM, Weber PC & Aepfelbacher M (2000). Cyclic AMP blocks bacterial lipopolysaccharide-induced myosin light chain phosphorylation in endothelial cells through inhibition of Rho/Rho kinase signaling. *J Immunol* **164**, 6543-6549.

Fagan KA, Mons N & Cooper DMF (1998). Dependence of the Ca²⁺-inhibitable adenylyl cyclase of C6-2B glioma cells on capacitative Ca²⁺ entry. *J Biol Chem* **273**, 9297-9305.

Farmer PJ, Bernier SG, Lepage A, Guillemette G, Regoli D & Sirois P (2001). Permeability of endothelial monolayers to albumin is increased by bradykinin and inhibited by prostaglandins. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**, 732-738.

Förster I (1948). Zwischenmolekulare Energieumwandlung und Fluoreszenz. *Ann Phys (Leipzig)* **2**, 55-75.

- Fukuhara S, Sakurai A, Sano H, Yamagishi A, Somekawa S, Takakura N, Saito Y, Kangawa K & Mochizuki N (2005). Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway. *Mol Cell Biol* **25**, 136-146.
- Fürst R, Bubik MF, Bihari P, Mayer BA, Khandoga AG, Hoffmann F, Rehberg M, Krombach F, Zahler S & Vollmar AM (2008). Atrial natriuretic peptide protects against histamine-induced endothelial barrier dysfunction in vivo. *Mol Pharmacol* **74**, 1-8.
- Garbers DL & Johnson RA (1975). Metal and metal-ATP interactions with brain and cardiac adenylate cyclases. *J Biol Chem* **250**, 8449-8456.
- Garcia JG, Davis HW & Patterson CE (1995). Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell Physiol* **163**, 510-522.
- Garcia JG, Lazar V, Gilbert-McClain LI, Gallagher PJ & Verin AD (1997). Myosin light chain kinase in endothelium: molecular cloning and regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **16**, 489-494.
- Garcia JG, Liu F, Verin AD, Birukova A, Dechert MA, Gerthoffer WT, Bamberg JF & English D (2001). Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest* **108**, 689-701.
- Goraya TA & Cooper DMF (2005). Ca²⁺-calmodulin-dependent phosphodiesterase (PDE1): Current perspectives. *Cell Signal* **17**, 789-797.
- Goraya TA, Masada N, Ciruela A & Cooper DMF (2004). Sustained entry of Ca²⁺ is required to activate Ca²⁺-calmodulin-dependent phosphodiesterase 1A. *J Biol Chem* **279**, 40494-40504.
- Guillou JL, Nakata H & Cooper DMF (1999). Inhibition by calcium of mammalian adenylyl cyclases. *J Biol Chem* **274**, 35539-35545.
- Hirase T, Kawashima S, Wong EY, Ueyama T, Rikitake Y, Tsukita S, Yokoyama M & Staddon JM (2001). Regulation of tight junction permeability and occludin phosphorylation by RhoA-p160ROCK-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* **276**, 10423-10431.
- Hu B, Nakata H, Gu C, De Beer T & Cooper DMF (2002). A critical interplay between Ca²⁺ inhibition and activation by Mg²⁺ of AC5 revealed by mutants and chimeric constructs. *J Biol Chem* **277**, 33139-33147.
- Hung DT, Wong YH, Vu TK & Coughlin SR (1992). The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **267**, 20831-20834.
- Jaffe EA, Grulich J, Weksler BB, Hampel G & Watanabe K (1987). Correlation between thrombin-induced prostacyclin production and inositol trisphosphate and cytosolic free calcium levels in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* **262**, 8557-8565.

- Jones RL, Wise H, Clark R, Whiting RL & Bley KR (2006). Investigation of the prostacyclin (IP) receptor antagonist RO1138452 on isolated blood vessel and platelet preparations. *Br J Pharmacol* **149**, 110-120.
- Kanthou C, Kanse SM, Kakkar VV & Benzakour O (1996). Involvement of pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins in alpha-thrombin signalling on cultured human vascular smooth muscle cells. *Cell Signal* **8**, 59-66.
- Kawamoto S, Niwa H, Tashiro F, Sano S, Kondoh G, Takeda J, Tabayashi K & Miyazaki J (2000). A novel reporter mouse strain that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated recombination. *FEBS Lett* **470**, 263-268.
- Kisanuki YY, Hammer RE, Miyazaki J, Williams SC, Richardson JA & Yanagisawa M (2001). Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev Biol* **230**, 230-242.
- Konstantoulaki M, Kouklis P & Malik AB (2003). Protein kinase C modifications of VE-cadherin, p120, and beta-catenin contribute to endothelial barrier dysregulation induced by thrombin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**, 434-442.
- Kooistra MR, Corada M, Dejana E & Bos JL (2005). Epac1 regulates integrity of endothelial cell junctions through VE-cadherin. *FEBS Lett* **579**, 4966-4972.
- Kooistra MR, Dubé N & Bos JL (2007). Rap1: a key regulator in cell-cell junction formation. *J Cell Sci* **120**, 17-22.
- Kouklis P, Konstantoulaki M, Vogel S, Broman M & Malik AB (2004). Cdc42 regulates the restoration of endothelial barrier function. *Circ Res* **94**, 159-166.
- Kozasa T, Jiang X, Hart MJ, Sternweis PM, Singer WD, Gilman AG, Bollag G, Sternweis PC (1998). p115RhoGEF, a GTPase-activating protein for G α 12 and G α 13. *Science* **280**, 2109-2111.
- Lampugnani MG, Corada M, Caveda L, Breviario F, Ayalon O, Geiger B & Dejana E (1995). The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J Cell Biol* **129**, 203-217.
- Landa LR Jr, Harbeck M, Kaihara K, Chepurny O, Kitiphongspattana K, Graf O, Nikolaev VO, Lohse MJ, Holz GG & Roe MW (2005). Interplay of Ca²⁺ and cAMP signaling in the insulin-secreting MIN6 beta-cell line. *J Biol Chem* **280**, 31294-31302.
- Langelier EG & van Hinsbergh VW (1991). Norepinephrine and iloprost improve barrier function of human endothelial cell monolayers: role of cAMP. *Am J Physiol* **260**, 1052-1059.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Lugnier C (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* **109**, 366-398.

- Lum H, Aschner JL, Phillips PG, Fletcher PW & Malik AB (1992). Time course of thrombin-induced increase in endothelial permeability: relationship to Ca^{2+} and inositol polyphosphates. *Am J Physiol* **263**, L219-225.
- Lum H & Malik AB (1996). Mechanisms of increased endothelial permeability. *Can J Physiol Pharmacol* **74**, 787-800.
- Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD & Plevin R (2001). Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* **53**, 245-282.
- Manolopoulos VG, Fenton JW 2nd & Lelkes PI (1997). The thrombin receptor in adrenal medullary microvascular endothelial cells is negatively coupled to adenylyl cyclase through a Gi protein. *Biochim Biophys Acta* **1356**, 321-332.
- McLaughlin JN, Shen L, Holinstat M, Brooks JD, DiBenedetto E & Hamm HE (2005). Functional selectivity of G protein signaling by agonist peptides and thrombin for the protease-activated receptor-1. *J Biol Chem* **280**, 25048-25059.
- Mercapide J, Santiago E, Alberdi E & Martinez-Irujo JJ (1999). Contribution of phosphodiesterase isoenzymes and cyclic nucleotide efflux to the regulation of cyclic GMP levels in aortic smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* **58**, 1675-1683.
- Mehta D & Malik AB (2006). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* **86**, 279-367.
- Mehta D, Rahman A & Malik AB (2001). Protein kinase C- α signals rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor phosphorylation and rho activation and regulates the endothelial cell barrier function. *J Biol Chem* **276**, 22614-20.
- Michel CC & Curry FE (1999). Microvascular permeability. *Physiol Rev* **79**, 703-761.
- Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M & Tsien RY (1997). Fluorescence indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**, 882-887.
- Montiel M, de la Blanca EP & Jiménez E (2006). P2Y receptors activate MAPK/ERK through a pathway involving PI3K/PDK1/PKC-zeta in human vein endothelial cells. *Cell Physiol Biochem* **18**, 123-134.
- Motoike T, Loughna S, Perens E, Roman BL, Liao W, Chau TC, Richardson CD, Kawate T, Kuno J, Weinstein BM, Stainier DY & Sato TN (2000). Universal GFP reporter for the study of vascular development. *Genesis* **28**, 75-81.
- Mou TC, Masada N, Cooper DMF & Sprang SR (2009). Structural basis for inhibition of mammalian adenylyl cyclase by calcium. *Biochemistry* **48**, 3387-3397.
- Moy AB, Bodmer JE, Blackwell K, Shasby S & Shasby DM (1998). cAMP protects endothelial barrier function independent of inhibiting MLC20-dependent tension development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **274**, 1024-1029.

Netherton SJ & Maurice DH (2004). Vascular endothelial cell cyclic nucleotide phosphodiesterases and regulated cell migration: implications in angiogenesis. *Mol Pharmacol* **67**, 263-272.

van Nieuw Amerongen GP, van Delft S, Vermeer MA, Collard JG & van Hinsbergh VWM (2000). Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of Rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circ Res* **87**, 335-40.

van Nieuw Amerongen GP, Draijer R, Vermeer MA & van Hinsbergh VW (1998). Transient and prolonged increase in endothelial permeability induced by histamine and thrombin: role of protein kinases, calcium, and RhoA. *Circ Res* **83**, 1115-1123.

van Nieuw Amerongen GP & van Hinsbergh VWM (2001). Cytoskeletal effects of Rho-like small guanine nucleotide-binding proteins in the vascular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 300-311.

Nikolaev VO, Bünemann M, Hein L, Hannawacker A & Lohse MJ (2004). Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* **297**, 37215-37218.

Ogino Y, Tanaka K & Shimizu N (1996). Direct evidence for two distinct G proteins coupling with thrombin receptors in human neuroblastoma SH-EP cells. *Eur J Pharmacol* **316**, 105-109.

Portell C, Rickard A, Vinson S & McHowat J (2006). Prostacyclin production in tryptase and thrombin stimulated human bladder endothelial cells: effect of pretreatment with phospholipase A2 and cyclooxygenase inhibitors. *J Urol* **176**, 1661-1665.

Qiao J, Huang F & Lum H (2003). PKA inhibits RhoA activation: a protection mechanism against endothelial barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**, 972-980.

Rubart M, Wang E, Dunn KW & Field LJ (2003). Two-photon molecular excitation imaging of Ca²⁺ transients in Langendorff-perfused mouse hearts. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, 1654-1668.

Rudolf R, Magalhães PJ & Pozzan T (2006). Direct in vivo monitoring of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ and cytosolic cAMP dynamics in mouse skeletal muscle. *J Cell Biol* **173**, 187-193.

Rudolf R, Mongillo M, Magalhães PJ & Pozzan T (2004). In vivo monitoring of Ca²⁺ uptake into mitochondria of mouse skeletal muscle during contraction. *J Cell Biol* **166**, 527-536.

Russwurm M, Mullershausen F, Friebe A, Jäger R, Russwurm C & Koesling D (2007). Design of fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based cGMP indicators: a systematic approach. *Biochem J* **407**, 69-77.

Rybalkin SD, Rybalkina I, Beavo JA & Bornfeldt KE (2002). Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C promotes human arterial smooth muscle cell proliferation. *Circ Res* **90**, 151-157.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB & Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

Sayner SL, Alexeyev M, Dessauer CW & Stevens T (2006). Soluble adenylyl cyclase reveals the significance of cAMP compartmentation on pulmonary microvascular endothelial cell barrier. *Circ Res* **98**, 675-681.

Schläger TM, Bartunkova S, Lawitts JA, Teichmann G, Risau W, Deutsch U & Sato TN (1997). Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 3058-3063.

Schlegel N, Baumer Y, Drenckhahn D & Waschke J (2009). Lipopolysaccharide-induced endothelial barrier breakdown is cyclic adenosine monophosphate dependent in vivo and in vitro. *Crit Care Med* **37**, 1735-1743.

Schlegel N, Burger S, Golenhofen N, Walter U, Drenckhahn D & Waschke J (2008). The role of VASP in regulation of cAMP- and Rac1-mediated endothelial barrier stabilization. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**, 178-188.

Schreier B, Börner S, Völker K, Gambaryan S, Schäfer SC, Kuhlencordt P, Gaßner B & Kuhn M (2008). The heart communicates with the endothelium through the guanylyl cyclase-A receptor: acute handling of intravascular volume in response to volume expansion. *Endocrinology* **149**, 4193-4199.

Seybold J, Thomas D, Witzenrath M, Boral S, Hocke AC, Bürger A, Hatzelmann A, Tenor H, Schudt C, Krüll M, Schütte H, Hippenstiel S & Suttrop N (2005). Tumor necrosis factor- α -dependent expression of phosphodiesterase 2: role in endothelial hyperpermeability. *Blood* **105**, 3569-3576.

Shasby DM, Ries DR, Shasby SS & Winter MC (2002). Histamine stimulates phosphorylation of adherens junction proteins and alters their link to vimentin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**, 1330-1338.

Simpson RE, Ciruela A & Cooper DMF (2006). The role of calmodulin recruitment in Ca²⁺-stimulation of adenylyl cyclase type 8. *J Biol Chem* **281**, 17379-17389.

Smoake JA, Moy GM, Fang B & Solomon SS (1995). Calmodulin-dependent cyclic AMP phosphodiesterase in liver plasma membranes: stimulated by insulin. *Arch Biochem Biophys* **323**, 223-232.

Sonnenburg WK, Seger D, Kwak KS, Huang J, Charbonneau H & Beavo JA (1995). Identification of inhibitory and calmodulin-binding domains of the PDE1A1 and PDE1A2 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Biol Chem* **270**, 30989-31000.

Spieker LE, Flammer AJ & Lüscher TF (2006). The vascular endothelium in hypertension. *Handb Exp Pharmacol* **176**, 249-283.

Stelzner TJ, Weil JV & O'Brien RF (1989). Role of cyclic adenosine monophosphate in the induction of endothelial barrier properties. *J Cell Physiol* **139**, 157-166.

- Stevens T, Creighton J & Thompson WJ (1999). Control of cAMP in lung endothelial cell phenotypes. Implications for control of barrier function. *Am J Physiol* **277**, L119-126.
- Stevens T, Nakahashi Y, Cornfield DN, McMurtry IF, Cooper DM & Rodman DM (1995). Ca(2+)-inhibitable adenylyl cyclase modulates pulmonary artery endothelial cell cAMP content and barrier function. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 2696-2700.
- Sun X, Shikata Y, Wang L, Ohmori K, Watanabe N, Wada J, Shikata K, Birukov KG, Makino H, Jacobson JR, Dudek SM & Garcia JG (2009). Enhanced interaction between focal adhesion and adherens junction proteins: involvement in sphingosine 1-phosphate-induced endothelial barrier enhancement. *Microvasc Res* **77**, 304-313.
- Surapisitchat J, Jeon KI, Yan C & Beavo JA (2007). Differential regulation of endothelial cell permeability by cGMP via phosphodiesterases 2 and 3. *Circ Res* **101**, 811-818.
- Tang WJ, Krupinski J & Gilman AG (1991). Expression and characterization of calmodulin-activated (type I) adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **266**, 8595-8603.
- van Teeffelen JW, Constantinescu AA, Brands J, Spaan JAE & Vink H (2008). Bradykinin- and sodium nitroprusside-induced increases in capillary tube haematocrit in mouse cremaster muscle are associated with impaired glycocalyx barrier properties. *J Physiol* **586**, 3207-3218.
- Tesmer JJ, Sunahara RK, Gilman AG & Sprang SR (1997). Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G_{sa} GTP γ S. *Science* **278**, 1907-1916.
- Tesmer JJ, Sunahara RK, Johnson RA, Gosselin G, Gilman AG & Sprang SR (1999). Two-metal-ion catalysis in adenylyl cyclase. *Science* **285**, 756-760.
- Tiruppathi C, Ahmmed GU, Vogel SM & Malik AB (2006). Ca²⁺ signaling, TRP channels, and endothelial permeability. *Microcirculation* **13**, 693-708.
- Tiruppathi C, Malik AB, Del Vecchio PJ, Keese CR & Giaever I (1992). Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: assessment of endothelial barrier function. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 7919-7923.
- Tsien RY (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**, 509-544.
- Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R & Malik AB (2008). Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann N Y Acad Sci* **1123**, 134-145.
- Varga-Szabo D, Braun A, Kleinschnitz C, Bender M, Pleines I, Pham M, Renné T, Stoll G & Nieswandt B (2008). The calcium sensor STIM1 is an essential mediator of arterial thrombosis and ischemic brain infarction. *J Exp Med* **205**, 1583-1591.
- Verin AD, Patterson CE, Day MA & Garcia JG (1995). Regulation of endothelial cell gap formation and barrier function by myosin-associated phosphatase activities. *Am J Physiol* **269**, 99-108.
- Vouret-Craviari V, Boquet P, Pouyssegur J & van Obberghen-Schilling E (1998). Regulation of the actin cytoskeleton by thrombin in human endothelial cells: role of Rho proteins in endothelial barrier function. *Mol Biol Cell* **9**, 2639-2653.

- Waschke J, Drenckhahn D, Adamson RH, Barth H & Curry FE (2004). cAMP protects endothelial barrier functions by preventing Rac-1 inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, 2427-2433.
- Weksler BB, Ley CW & Jaffe EA (1978). Stimulation of endothelial cell prostacyclin production by thrombin, trypsin, and the ionophore A 23187. *J Clin Invest* **62**, 923-930.
- Wheeler-Jones CPD (2008). Regulation of endothelial prostacyclin synthesis by Protease-activated receptors: mechanisms and significance. *Pharmacol Rep* **60**, 109-118.
- Willemsse M, Janssen E, de Lange F, Wieringa B & Fransen J (2007). ATP and FRET -- a cautionary note. *Nat Biotechnol* **25**, 170-172.
- Willoughby D & Cooper DMF (2006). Ca²⁺ stimulation of adenylyl cyclase generates dynamic oscillations in cyclic AMP. *J Cell Sci* **119**, 828-836.
- Willoughby D & Cooper DMF (2007). Organization and Ca²⁺ regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiol Rev* **87**, 965-1010.
- Wojciak-Stothard B, Potempa S, Eichholtz T & Ridley AJ (2001). Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial permeability. *J Cell Sci* **114**, 1343-1355.
- Wojciak-Stothard B & Ridley AJ (2002). Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol* **39**, 187-199.
- Wu Z, Wong ST & Storm DR (1993). Modification of the calcium and calmodulin sensitivity of the type I adenylyl cyclase by mutagenesis of its calmodulin binding domain. *J Biol Chem* **268**, 23766-23768.
- Yasuda R (2006). Imaging spatiotemporal dynamics of neuronal signaling using fluorescence resonance energy transfer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Curr Opin Neurobiol* **16**, 551-561.
- Yoshimura M & Cooper DMF (1992). Cloning and expression of a Ca²⁺-inhibitable adenylyl cyclase from NCB-20 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 6716-6720.
- Zaccolo M, De Giorgi F, Cho CY, Feng L, Knapp T, Negulescu PA, Taylor SS, Tsien RY & Pozzan T (2000). A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells. *Nat Cell Biol* **2**, 25-29.
- Zimmerman RS, Trippodo NC, MacPhee AA, Martinez AJ & Barbee RW (1990). High-dose atrial natriuretic factor enhances albumin escape from the systemic but not the pulmonary circulation. *Circ Res* **67**, 461-168.
- Zimmermann G, Zhou D & Taussig R (1998). Mutations uncover a role for two magnesium ions in the catalytic mechanism of adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **273**, 19650-19655.

Publikationen**Originalarbeiten:**

R.C. Werthmann, K. von Hayn, V.O. Nikolaev, M.J. Lohse and Moritz Bünemann (2009). Real-time monitoring of cAMP levels in living endothelial cells: thrombin transiently inhibits adenylyl cyclase 6. *J Physiol* **587**, 4091-4104.

Y. Baumer, V. Spindler, R.C. Werthmann, M. Bünemann and J. Waschke (2009). Role of Rac1 and cAMP in endothelial barrier stabilization and thrombin-induced barrier breakdown. *J Cell Physiol* **220**, 716-726.

Konferenzbeiträge:

R.C. Werthmann*, K. von Hayn*, M.J. Lohse, M. Bünemann (2007). FRET-based analysis of cyclic AMP signals in primary cells of the vascular system. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **375**(1), 39.

R.C. Werthmann, K. von Hayn, V.O. Nikolaev, M.J. Lohse, M. Bünemann (2008). Ca²⁺-mediated regulation of cAMP levels in endothelial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **377**(1), 30.

K. von Hayn, R.C. Werthmann, V.O. Nikolaev, M.J. Lohse, M. Bünemann (2008). Dual regulation of cAMP levels by Ca²⁺ in vascular smooth muscle cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **377**(1), 32.

R.C. Werthmann, K. von Hayn, V.O. Nikolaev, M.J. Lohse, M. Bünemann (2009). Thrombin-mediated increase in [Ca²⁺]_i causes a transient decrease in cAMP levels in endothelial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **379**(1), 27.

K. von Hayn, R.C. Werthmann, V.O. Nikolaev, M.J. Lohse, M. Bünemann (2009). Purinergic inhibition of β-adrenergic-induced cAMP elevation in vascular smooth muscle cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **379**(1), 26.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Echtzeit-Untersuchungen zur Thrombin-abhängigen Änderung der cAMP-Konzentration in lebenden Endothelzellen“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Weiterhin erkläre ich, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen ist.

Würzburg, Oktober 2009

DANKE

Vielen Dank an alle, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Moritz Bünemann für die Bereitstellung des Themas, für die Betreuung und die Freiheiten bei der Umsetzung und für das lockere Arbeitsklima.

Bei Herrn Prof. Martin J. Lohse bedanke ich mich für die Einladung und die Möglichkeit am Lehrstuhl für Pharmakologie zu promovieren, für die anregenden Diskussionen und für die jährlichen Seminarfahrten.

Frau Prof. Michaela Kuhn und Herrn Prof. Thomas Dandekar danke ich für die externe Betreuung meiner Doktorarbeit, besonders für die aufmunternden Diskussionen bei den jährlichen Treffen. Frau Prof. Kuhn danke ich auch für die praktische Zusammenarbeit mit dem Institut für Physiologie und für die Beherbergung der Mäuse.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der AG Bünemann für die Zusammenarbeit und die freundschaftliche Atmosphäre bedanken. Besonders danke ich Kathrin von Hayn für die mehr als kollegiale Zusammenarbeit, außerdem Peter Hein für die geduldige Hilfe bei der Erstellung der ersten Abstracts und Poster, Kerstin Hadamek für die Einarbeitung und Unterstützung bei der Arbeit mit den Mäusen, Monika Frank für die fröhliche Labornachbarschaft und Freundschaft, Leif Hommers für die kritische Korrektur von Teilen des Papers und dieser Arbeit, und last but not least Markus Milde für die hilfreichen Kommentare bezüglich dieser Dissertation.

Ich bedanke mich auch bei allen Mitgliedern des Instituts für Pharmakologie für die Hilfe bei aller Art von Problemen und die schönen und angenehmen Jahre! Danke besonders an Slava Nikolaev für sein offenes Ohr bei allen Fragen und Problemen.

Ich danke meiner Familie, all meinen Mitbewohnern und Freunden für die Unterstützung, Aufmunterung, Ablenkung und für ihr Interesse und Verständnis!