

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg
Leiter Lehrstuhl II: Professor Dr. med. Drenckhahn

Einfluss von hydrostatischem Druck auf die Integrität des endothelialen Zellverbands

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Katharina Müller-Marschhausen

aus Schlüchtern

Würzburg, Mai 2009

Referent: Professor Dr. med. Detlev Drenckhahn
Korreferent: Professor Dr. med. Johann Bauersachs
Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.09.2010

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinem Opa gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	
1. Grundlagen	1
1.1 Endothel.....	1
1.1.1 Zell-Zell-Kontakte	1
VE-Cadherin und Adhärens-Junktionen.....	4
Tight Junctions	8
1.1.2 Caveolae	10
1.1.3 Das Zytoskelett.....	12
1.1.4 Regulation der Endothelbarriere.....	13
Mechanismen der Lückenbildung	13
Barriere-stabilisierende Mechanismen	15
1.2 Heranführung an die Fragestellung	17
1.2.1 Fragestellung	18
2. Material und Methoden	20
2.1 Zellkultur	20
2.2 Versuchsreagentien.....	23
2.3 Hydrostatischer Druck.....	25
2.4 Druckversuche	25
2.5 Mikroskopie bzw. Immunhistochemie	27
2.6 Laserpinzette.....	28
2.6.1 Prinzip der Laserpinzetten-Technik.....	28
2.6.2 Beschichtung von Protein A-Mikroperlen.....	29
2.6.3 Messungen mit der Laserpinzette	30
2.7 Rho A- und Rac 1-Aktivierungsassay	31
2.8 cAMP-ELISA	32
2.9 Angaben zur Statistik	33
3. Ergebnisse.....	34
3.1 Einzeldruckversuche.....	34

3.1.1	Hydrostatischer Druck verhindert den Effekt extrazellulärer Ca^{2+} -Depletion auf die VE-Cadherin-Lokalisation	34
3.1.2	Hydrostatischer Druck inhibiert die durch Cytochalasin D ausgelöste Actindepolymerisation und interzelluläre Lückenbildung	37
3.1.3	Hydrostatischer Druck verhindert Zellablösung nach Ca^{2+} /Calmodulin-Inhibition	38
3.1.4	Hydrostatischer Druck wirkt sich auch protektiv auf die Integrität makrovaskulärer Endothelzellen aus	39
3.1.5	Hydrostatischer Druck schützt den Cadherin-Catenin-Komplex	42
3.2	Kontinuierliche Druckversuche	43
3.2.1	Der protektive Effekt von hydrostatischem Druck steigert sich bis 15 cmH_2O	43
3.3	Laserpinzetten-Versuche	44
3.3.1	Hydrostatischer Druck blockiert den Verlust der VE-Cadherin-Adhäsion	45
3.4	Mechanismen der Druckprotektion	46
3.4.1	Die Rolle von Caveolin-1	46
3.4.2	Die Rolle von Rho A und Rac 1	47
3.4.3	Die Rolle von cAMP	48
4.	Diskussion	50
4.1	Hydrostatischer Druck schützt die endotheliale Integrität	50
4.1.1	Hydrostatischer Druck verhindert den junktionalen Verlust von VE-Cadherin durch extrazelluläre Ca^{2+} -Depletion	51
4.1.2	Hydrostatischer Druck inhibiert Actindepolymerisation, interzelluläre Lückenbildung und Ablösung der Zellen	53
4.2	Vergleich mit anderen Studien	54
4.2.1	In vitro-Studien zur Bedeutung des hydrostatischen Drucks	54
4.2.2	In vivo-Studien zur Bedeutung von extrazellulärem Ca^{2+}	54
4.3	Signalweg der Mechanotransduktion	55
4.3.1	Caveolin-1-defiziente Endothelzellen	56
4.3.2	PKC	58
4.3.3	Rho A und Rac 1	59
4.3.4	cAMP	61

5.	Ausblick.....	62
6.	Zusammenfassung	63
7.	Literaturverzeichnis	65
	Anhang	
	Danksagung	
	Lebenslauf	

Abkürzungen

AC	Adenylatzyklase		Synthase
AFM	Atomic force microscopy	Epac	Exchange protein activated by cyclic AMP
AJ	Adhärens-Junktion		
AKT	Proteinkinase B	ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
Ang-1	Angiopoetin-1	EZ	Endothelzellen
ATP	Adenosintriphosphat	F-Actin	Filamentäres Actin
BSA	Bovines Serumalbumin	FAK	Fokale Adhäsionskinase
Ca ²⁺	Calcium- Ion	FCS	Fetales Kälberserum
CAM	Zelladhäsionsmolekül	Gam	Goat anti-mouse
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat	Garb	Goat anti-rabbit
CAR	Cell adhesion recognition	Gart	Goat anti-rat
CR	Cadherin repeats	GDI	GDP dissociation inhibitor
Cyto D	Cytochalasin D	GDP	Guanosindiphosphat
d	Tag	G-LISA	GTPase-linked immunosorbent assay
Da	Dalton		
Dag	Donkey anti- goat	GTP	Guanosintriphosphat
DAG	Diacylglycerol	h	Stunde
DMEM	Dulbeccos modified Eagle medium	H ₂ O	Wasser
DMP	Dimethyl-Pimelimidat- Dihydrochlorid	HAV	Histidin-Alanin-Valin
DMSO	Dimethylsulfoxid	HBSS	Hanks buffered salt solution
EC	Extrazelluläre Cadherindomäne	HCl	Salzsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	Hg	Quecksilber
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat	IgG	Immunglobulin G
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	ICAM	Interzelluläres CAM
eNOS	Endotheliale NO-	HMG	High mobility group
		HRP	Horse radish peroxidase
		IF	Immunfluoreszenz
		IP ₃ R	Inositoltriphosphat-

	Rezeptor	PFA	Paraformaldehyd
IQGAP	IQRas GTPase aktivierendes Protein	pH	pH-Wert
JAF	Junktions-assoziiertes Actinfilamentsystem	PI3K	Phosphatidylinositol-3- Kinase
JAM	Junctional adhesion molecule	PK	Proteinkinase
L-NAME	<i>N</i> -nitro- <i>L</i> -arginine methyl ester	PSEC	Pulmonalarterielle Schweine-Endothelzellen
LDL	Low density lipoprotein	Ras	Rat sarcoma
min	Minute	Rho	Ras-Homologie
MLC	Myosinleichtketten	ROCK	Rho-Kinase
MLCK	MLC-Kinase	RT	Raumtemperatur
MLCP	MLC-Phosphatase	S1P	Sphingosin-1-Phosphat
MyEnd	Myokardiale Endothel- Zellen	sek/s	Sekunde
NDS	Normal donkey serum	si RNA	Silencing RNA
NGS	Normal goat serum	TEMED	N,N,N,N'- Tetramethyldiamin
NO	Stickstoff	TFP	Trifluperazin
NPG	n-Propylgallat	TJ	Tight junction
rpm	Rounds per minute	TRPC	Canonical transient receptor potential
p-NPP	p-Nitrophenolphosphat	U	Unit (Enzymeinheit)
P/S	PenicillinG/Streptomycin	VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
PAF	Platelet activating factor	VE-Cadherin	Vascular endothelial cadherin
PAR	Protein-aktivierter Rezeptor	VEGF	Vascular endothelial growth factor
PBS	Phosphate-buffered- saline	VLDL	Very low density lipoprotein
PDK	Phosphatidylinositol- dependent kinase	ZO	Zonula occludens
PECAM	Platelet endothelial CAM		

1. Grundlagen

1.1 Endothel

Blutkompartiment und Interstitium werden durch eine Schicht von Endothelzellen getrennt, die die Blutgefäße auskleidet. Neben dieser Barrierefunktion, die durch unterschiedliche Mechanismen moduliert werden kann (z.B. inflammatorische Permeabilitätssteigerung), erfüllt das Endothel auch andere wichtige Aufgaben. So verhindert es durch seine antithrombogene Oberfläche eine Blutgerinnung im Blutgefäß, erfüllt verschiedene metabolische Funktionen (Aktivierung von Hormonen; Umwandlung von VLDL in LDL) und kontrolliert den Tonus der Gefäßmuskulatur und damit die Blutgefäßweite durch Vasokine (Drenckhahn, 2003).

Das Endothel wird permanent mechanisch belastet, da es hämodynamischem Stress durch den Blutfluß, dem Blutdruck und einer Wandspannung ausgesetzt ist. Um auf der einen Seite diesen physiologischen Belastungen standzuhalten und auf der anderen Seite gleichzeitig die Funktionen und Reaktionen auf physiologische Reize erfüllen zu können, sind die Endothelzellen über verschiedene Zell-Zell-Kontakte sowohl mechanisch als auch über chemische Signalweiterleitung zu einem Zellverband (Gewebe) verbunden. Außerdem besitzen die Endothelzellen ein kontraktionsfähiges Zytoskelett aus unterschiedlichen Proteinen (Actin, Myosin II, Tropomyosin und α -Actinin), das ihnen eine aktive Formveränderung und ein Entgegenwirken bei hämodynamischer Belastung ermöglicht und ihnen die Fähigkeit verleiht, sich an hämodynamisch veränderte Konditionen anzupassen (Drenckhahn und Ness, 1997).

1.1.1 Zell-Zell-Kontakte

Im Endothel unterscheidet man die drei Klassen der Barrierekontakte (Zonulae occludentes), Kommunikationskontakte (Maculae communicantes oder Gap Junctions) und Adhäsionskontakte (Zonulae adherentes) (Drenckhahn und Ness, 1997):

1. Zonulae occludentes (= Tight Junctions/ Occludens-Junktionen) sind relativ undurchlässige Verbindungen, die den Interzellularspalt selbst für die meisten Ionen unpassierbar abdichten. Sie liegen im Endothel im Unterschied zu anderen Epithelien vermischt mit den Adhärenskontakten vor und sind nicht räumlich von ihnen getrennt (Dejana, 2004).
2. Maculae communicantes (= Gap Junctions) sind Verbindungen, die die Passage chemischer oder elektrischer Signale zulassen und so eine interzelluläre Kommunikation ermöglichen. Die transmembranären Kanäle werden durch gruppierte Connexine gebildet. Connexin 37, 40 und 43 kommen bei Endothelzellen vor (Simon, 1999).
3. Zonulae adherentes (= Adhärens-Junktionen) sind Haftverbindungen, die der mechanischen Festigung des Zellverbands dienen und darüberhinaus in verschiedene Signalwege involviert sind.

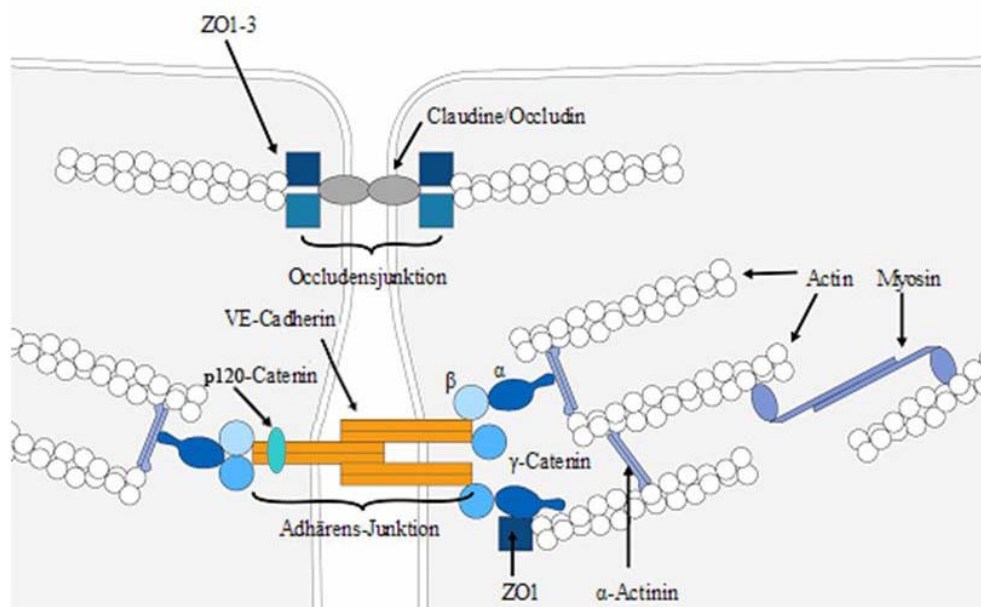


Abb. 1: **Zellkontakte der Endothelzellen.** In Tight Junctions sorgen vor allem Claudine und Occludine für eine dichte Bindung. Diese interagieren intrazellulär mit verschiedenen Proteinen und binden z.B. über ZO1 an Actinfilamente. In den Adhärens-Junktionen wird die Adhäsion durch VE-Cadherin vermittelt, das intrazellulär über verschiedenste Adapterproteine (α -, β -Catenin, α -Actinin) am Actinzytoskelett verankert ist. Neben der Bindung an das Actinozytoskelett spielen andere Proteine, die nicht an das Zytoskelett verankert sind wie z.B. p120-Catenin, eine regulatorische Rolle (modifiziert nach Drenckhahn/Christof).

Desweiteren exprimieren Endothelzellen außerhalb spezialisierter junctionaler Strukturen andere zellspezifische homophile Adhäsionsproteine, z.B. PECAM (= platelet endothelial cell adhesion molecule = CD31) und S-endo-1, welche beide in

die Familie der Immunglobulin-Domänen-Haftmoleküle gehören (Ilan and Madri, 2003).

Adhäsionskontakte

Die Zelladhäsion wird durch Zelladhäsionsmoleküle (cell adhesion molecules= CAMs) aus fünf verschiedenen Familien (Cadherine, Mitglieder der Immunglobulin(Ig)-Superfamilie, Selektine, Mucine und Integrine) vermittelt. Man unterscheidet Calcium-abhängige und Calcium-unabhängige CAMs.

Eine wichtige Gruppe Ca^{2+} -abhängiger Zelladhäsionsmoleküle wird von der Familie der Cadherine gebildet.

Neben ihrer Funktion als Zelladhäsionsmoleküle sind Cadherine auch in zelluläre Prozesse über spezifische Signalwege involviert. Dazu gehören z.B. Morphogenese und Homöostase von Geweben, Apoptose, Zellproliferation, Migration und Differenzierung (Dejana, 2004; Wallez and Huber, 2008). In den letzten Jahren wurden immer mehr Cadherine und Cadherin-ähnliche Proteine beschrieben, so dass man aufgrund der Domänen-Struktur, der genomischen Organisation und phylogenetischer Analysen klassische Cadherine (Cadherine Typ I) und atypische Cadherine (Cadherine Typ II), desmosomale Cadherine, Protocadherine und Cadherin-verwandte Proteine unterscheidet (Nollet et al., 2000).

Allen Cadherinen ist gemeinsam, dass sie in ihren extrazellulären Anteilen multiple Cadherin-spezifische Wiederholungsmotive (Cadherin-repeat= CR) und verschieden strukturierte Ca^{2+} -bindende extrazelluläre Domänen aufweisen, deren CR bis zu 110 Aminosäuren lang ist. Die Cadherine unterscheiden sich durch ihre unterschiedliche Anzahl an CRs (Nollet et al, 2000). Klassische sowie atypische Cadherine sind Transmembranproteine mit einer einfachen transmembranären α -Helix, einem zytoplasmatischen C-Terminus und einem extrazellulären N-Terminus. Zu den klassischen Cadherinen Typ I gehören E (epitheliales)-, P (plazentares)- und N (neurales) - und R-Cadherin, die Ca^{2+} -abhängig Zell-Zell-Adhäsion vermitteln und in ihrer Grundstruktur äquivalent sind.

Obwohl VE (Vascular Endothelial)-Cadherin (früher: Cadherin 5) nur 58% homologe Sequenzen mit der EC (= extracellular) 1-Domäne des Cadherins 11, dem Prototyp der Typ II-Cadherine, aufweist, gehört es aufgrund seiner genomischen Struktur in die

Gruppe der atypischen Typ II-Cadherine (Nollet et al., 2000).

VE-Cadherin und Adhärens-Junktionen

VE-Cadherin ist ein 140 kDa schweres Protein, welches als Cadherin 5 identifiziert wurde (Suzuki et al., 1991). Mittels spezifischem Antikörper konnte gezeigt werden, dass Cadherin 5 selektiv an Zell-Zell-Grenzen endothelialer Zellen in Blut- und Lymphgefäßen vieler Gewebe lokalisiert ist und darüberhinaus eine strukturelle Ähnlichkeit zu anderen Cadherinen aufweist, woraufhin Cadherin 5 in vaskuläres endotheliales Cadherin (= VE-Cadherin) umbenannt wurde (Breviario et al., 1995).

Strukturell besteht VE-Cadherin aus einem extrazellulären Anteil mit 5 Ca^{2+} -bindenden extrazellulären Cadherin-Domänen (EC 1-5) im Bereich des N-Terminus, der über eine Transmembranregion in der Zytoplasmamembran verankert ist (Takeichi et al., 1990; Vincent et al., 2004; Dejana et al., 2008). Die 5 EC-Domänen sind homolog und je 110 Aminosäuren lang. Zwischen jeder dieser repetitiven Domänen befinden sich Ca^{2+} -Bindungsstellen, die die EC-Domänen zu einer steifen Stäbchenstruktur verbinden, wenn Ca^{2+} -Ionen gebunden sind. Entzieht man Ca^{2+} -Ionen, so erschlafft die Stäbchenstruktur und eine Bindung an benachbarte Cadherine ist nicht mehr möglich (Nagar et al., 1996; Pokutta et al., 1994; Vincent et al., 2004).

Die Wichtigkeit der extrazellulären Domänen des VE-Cadherins in der Vermittlung von endothelialen Zellfunktionen konnte mittels Antikörper gegen die unterschiedlichen ECs gezeigt werden. So steigern Antikörper, die gegen die EC 1 gerichtet sind, die Permeabilität des Zellverbands in vitro und der Blutgefäße in vivo und unterbrechen die Angiogenese. Durch Antikörper, die gegen die EC 4 gerichtet sind, wird nur die Angiogenese gestört, die Permeabilität dagegen bleibt unverändert (Corada et al., 2001; Corada et al., 2002).

Den Typ I-Cadherinen ist gemeinsam, dass diese alle die Aminosäuresequenz HAV in der EC 1 enthalten. Dort interagiert sie mit einem N-terminalen Tryptophanrest an Position 2 (Tryp-2). Das HAV-Bindungsmotiv wird auch CAR (= cell adhesion recognition)-Sequenz genannt und scheint eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Zell-Zelladhäsion zu spielen.

Auch die Typ II-Cadherine sowie die desmosomalen Cadherine besitzen eine CAR-Sequenz mit zentralem Alanin, wobei die umgebenden Reste spezifisch für die einzelnen Subfamilien sind. VE-Cadherin dagegen ist eines von zwei Cadherinen,

denen ein zentrales Alanin an der CAR-Site fehlt, obwohl ein Tryptophan an Position 2 der EC 1 vorkommt (Blaschuk und Rowlands, 2002; Leckband und Sivasankar, 2000). Cadherine binden sowohl an Partnermoleküle der gleichen Zelle (Cis-Dimerisierung), als auch an Moleküle der Nachbarzellen (Trans-Dimerisierung) (Chappuis-Flament et al., 2001; Sivasankar et al., 2001). Obwohl der genaue Mechanismus der Cadherin-Trans-Dimerisierung noch unklar ist, deuten Studien vermehrt an, dass eine Interaktion der EC 1-Domäne mit gegenseitiger Bindung der Tryptophan-Reste an die CAR-Sequenzen der Interaktionspartner entscheidend ist (Posy et al., 2008).

Adapterproteine vermitteln die Verankerung der Cadherine am Zytoskelett

Catenine gehören zu der Familie der Armadillo-Proteine, die durch ein 42-Aminosäure-Wiederholungsmotiv definiert und in 2 große Subfamilien unterteilt werden (Peifer et al., 1994). α -Catenin, β -Catenin und γ -Catenin sind Vertreter der einen Subfamilie. Die zweite schliesst p120-Catenin, p120-Catenin-verwandte Moleküle und Plakophiline ein.

p120-Catenin, ein Substrat der Tyrosinkinase Src, bindet an die Juxtamembrandomäne, und scheint eine regulatorische Rolle in der Cadherinfunktion bzw. Aktivität und ihrer Lebensdauer zu spielen. Es steht über Kinesin mit Microtubuli in Verbindung (Davis et al., 2003; Kowalczyk and Reynolds, 2004).

β -Catenin bindet mit seiner Armadillodomäne an die distale Region der zyttoplasmatischen Cadherindomäne und mit der N-terminalen Region an α -Catenin, was wiederum mit Actin und Actin-bindenden Proteinen wie Vinculin, α -Actinin oder Formin-1 eine Bindung eingeht, und damit den Cadherin-Catenin-Komplex mit dem Zytoskelett verknüpft (Aberle et al., 1994; Ben-Ze'ev und Geiger, 1998). Dennoch ist nicht die alleinige Verbindung von Actin über α -Catenin an β -Catenin für ihre Stabilität verantwortlich, auch indirekte Verbindungen über andere Proteine scheinen für die Verankerung des Cadherin-Catenin-Komplexes notwendig zu sein (Drees et al., 2005; Gates und Peifer, 2005; Yamada et al., 2005).

Ein weiterer Cadherin-Bindungspartner der zyttoplasmatischen Domäne ist das γ -Catenin (= Plakoglobin), das z.T. die gleichen Funktionen hat wie β -Catenin (Knudsen

und Wheelock, 1992).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Verankerung von VE-Cadherin an das Actin-Zytoskelett funktionell bedeutend ist. Zellen, in denen VE-Cadherin ohne Bindungsstelle für β -Catenin exprimiert wurde, wiesen eine reduzierte VE-Cadherin-Adhäsion auf. Cadherine mit intakter Zytoskelettverankerung, aber fehlender EC-Domäne, beeinträchtigten dagegen die Barrierefunktion (Kouklis et al., 2003; Navarro et al., 1995). Die Verankerung von VE-Cadherin am Zytoskelett ist also wichtig, um eine starke Adhäsion zu ermöglichen. Diese Notwendigkeit wurde auch durch die Charakterisierung der molekularen Bindungseigenschaften des VE-Cadherins deutlich. Die Adhäsionskraft (ca. 40 pN) und die durchschnittliche Lebensdauer (ca. 0,5 sek) der einzelnen Molekülbindung sind relativ gering (Baumgartner et al., 2000). Ohne eine Zytoskelettverankerung würden die Moleküle mit einer 10-20 fachen lateralen Mobilität davon driften und so die Zeit bis zu einer Rückbindung nach Dissoziation verlängern. Eine Verankerung limitiert die laterale Diffusion und erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass nach der Lösung einer Bindung wieder eine Rückbindung an denselben Bindungspartner erfolgen kann (Baumgartner und Drenckhahn, 2002a; Baumgartner und Drenckhahn, 2002b). Eine durch Cytochalasin D hervorgerufene Actin-Depolymerisation führt daher zu einer gesteigerten Mobilität des VE-Cadherins in der Membran mit Reduktion der Adhäsionskraft und einem Zusammenbruch der Endothelbarriere in vivo (Baumgartner et al., 2003; Waschke et al., 2005). Folglich ist die Bindung an Actinfilamente für die Stabilisierung der Adhäsionkontakte von wesentlicher Bedeutung.

Die Stärke der Adhäsion wird ebenfalls durch die Expression der Cadherine reguliert (Steinberg und Takeichi, 1994). Cadherine werden ständig endozytiert und wieder in die Plasmamembran eingebaut. Bei Lockerung der Interzellularkontakte wird dieser Prozess verstärkt (Kamei et al., 1999; Le et al., 1999).

Wie bereits oben erwähnt, tragen die Catenine aber nicht nur zur Verknüpfung der Cadherine mit dem Zytoskelett und zur Stabilisierung der Adhäsion bei, sondern fungieren vielmehr auch als Signalproteine und Regulatoren.

p120-Catenin verhindert die Internalisierung membranständiger Cadherine und deren

Abbau über den endozytotischen Weg. In Studien konnte gezeigt werden, dass der Verlust von p120-Catenin bei Mutanten zu einer eingeschränkten Endothelzellbarrierefunktion durch verminderte VE-Cadherin Expression führt (Xiao et al., 2003a). Gleichzeitig verhindern Proteasomeninhibitoren den Zusammenbruch interzellulärer Endotheljunctionen sowie die Degradation von VE-Cadherin in Endothelzellen, die mutiertes VE-Cadherin exprimieren (Xiao et al., 2003b). Eine Rolle der Ubiquitinierung bei der Cadherininternalisation scheint somit wahrscheinlich.

Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass p120-Catenin eine Art Kappe an dem Juxtamembranabschnitt der zytoplasmatischen Domäne von E-Cadherin bildet, die eine Interaktion mit HAKAI (= E3 Ubiquitinligase) bzw. HAKAI-ähnlichen Molekülen blockiert und so vor der Cadherininternalisierung und dem Abbau durch Proteasomen und Lysosomen schützt (Fujita et al., 2002).

Darüberhinaus wird vermutet, dass p120-Catenin das Cadherin-Recycling regulieren könnte (Davis et al., 2003; Kowalczyk und Reynolds, 2004). Diese Hypothese kann durch die Tatsache unterstützt werden, dass Interaktionen zwischen p120-Catenin und Kinesin sowie ein gesteigerter Transport von Cadherin zur Plasmamembran gefunden wurden (Chen et al., 2003).

Die Bindung von p120-Catenin an VE-Cadherin hat ebenfalls Einfluss auf die Organisation der Adhärenz-Junctionen und die Regulation der endothelialen Permeabilität. Studien konnten zeigen, dass p120-Catenin die Aktivität von Rho A negativ kontrolliert, die Aktivierung von Rac 1 und Cdc 42 dagegen positiv mit der p120-Catenin-Konzentration an der Plasmamembran korreliert (Anastasiadis und Reynolds, 2001; Noren et al., 2000). Durch die Fähigkeiten die Rho-GTPasen-Aktivität zu modulieren und mit microtubulären Motorproteinen zu interagieren, scheint p120-Catenin eine wichtige Rolle bei der Regulation der Junctions stabilität zu spielen.

Auch dem β -Catenin konnte eine regulatorische Rolle in der Cadherin-vermittelten Adhäsion nachgewiesen werden. Bei Analysen des Cadherin- β -Catenin-Komplexes zeigte sich, dass die Cadherindomäne in Abwesenheit von β -Catenin unstrukturiert vorliegt und dadurch sensitiver für den proteolytischen Abbau ist (Huber et al., 2001).

Desweiteren zeigten Forschungsergebnisse, dass β -Catenin und γ -Catenin auch eine transkriptionale und signalgebende/-weiterleitende Aktivität besitzen und zusammen

mit VE-Cadherin Effekte auf das Zellwachstum, die Inhibierung der Apoptose und die Modulation der Zelldifferenzierung haben (Ben-Ze'ev und Geiger, 1998; Gottardi und Gumbiner, 2001). Man geht davon aus, dass der Komplex aus VE-Cadherin und β -Catenin den zytoplasmatischen Gehalt an β -Catenin verringert, so dass weniger freies β -Catenin zum Zellkern translozieren kann, um dort die Gentranskription durch Bindung an HMG (= high mobility group)-Transkriptionsfaktoren zu modulieren (Behrens et al., 1996; Huber et al., 1996; Wheelock und Johnson, 2003). Auch die durch Zell-Zell-Kontakte induzierte Inhibition des Zellwachstums (= Kontaktinhibition) wird wahrscheinlich über diesen Mechanismus vermittelt, da β -Catenin bei voll ausgebildeten Zellkontakten überwiegend an die intrazelluläre Domäne von VE-Cadherin gebunden ist. Neben dieser Bindung von β -Catenin im Cadherin/Catenin-Komplex wird die Akkumulation von β -Catenin im Zytosol und damit die Möglichkeit zum Zellkern zu translozieren durch einen weiteren Signalweg, welcher GSK-3 β (= Glycogen Synthase Kinase-3 β) und APC (= Adenomatöses Poliposis coli-Protein) umfasst, reguliert. Bildet das freie, nicht an Cadherin-gebundene β -Catenin im Zytosol einen Komplex mit dem APC-Protein, so wird dieser unter physiologischen Konditionen rasch abgebaut, indem β -Catenin von GSK-3 β an der N-terminalen Domäne phosphoryliert und dadurch für den Abbau durch Proteasomen markiert wird (Aberle et al., 1997; Rubinfeld et al., 1996; Wheelock und Johnson, 2003). Wenn vermehrt freies β -Catenin vorkommt, transloziert β -Catenin vermehrt zum Zellkern, interagiert dort mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und reguliert dadurch die Expression von Genen, die in Mechanismen der Wachstumskontrolle und Morphogenese involviert sind (Grazia Lampugnani et al., 2003; Holnthoner et al., 2002; Moon et al., 2002; Venkiteswaran et al., 2002).

Tight Junctions

Tight Junctions (Zonula occludens) sind gürtelförmige Interzellularkontakte, die als Diffusionsbarriere zwischen den apikalen und basolateralen Plasmamembrandomänen in Epithel- und Endothelzellen fungieren. Im Endothel der Blut-Hirn-Schranke, in Arteriolen und grossen Arterien sind sie gut ausgebildet, während sie in venösen Gefäßen, dem Hauptort der Entzündungsreaktion, schwach ausgebildet sind (Simionescu und Simionescu, 1991). In den meisten Endothelzellen sind die Tight

Junctions weniger streng verteilt und teilweise mit Adhärens-Junctionen vergesellschaftet (Anderson und Van Itallie, 1995). Die molekulare Zusammensetzung der Tight Junctions ist komplex. Sie bestehen in Endothelzellen in der Regel aus den Adhäsionsproteinen Claudin 5 und z.T. auch Occludin (Bazzoni und Dejana, 2004).

Occludin (65kDa) besitzt 4 Transmembrandomänen und scheint nicht essentiell für die Bildung der Tight Junctions zu sein, es beeinflusst aber die Barriere- und Abgrenzungsfunktion. Fehlt Occludin, kommt es zu einer gesteigerten Permeabilität (Bamforth et al., 1999).

Claudine gehören zu einer großen Familie, die, basierend auf Sequenzübereinstimmungen, 24 Claudine umfasst (Förster, 2008). Alle Familienmitglieder zeigen den gleichen Aufbau mit 4 Transmembrandomänen, zwei extrazellulären bogenförmigen Abschnitten zur Bindung an Claudine der Nachbarzellen sowie zwei zyttoplasmatischen Domänen, die über ZO 1-3 und Cingulin am Actinzytoskelett verankert werden. Über Cingulin bzw. seine Bindung an die schwere Kette von Myosin II können kontraktile Kräfte auf die Tight Junctions ausgeübt werden (Cordenonsi et al., 1999). ZO-1 ist u.a. ein Bindungspartner für das Actin-bündelnde Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) (Comerford et al., 2002). Die Expression und die Kombination der unterschiedlichen Claudine variiert in den verschiedenen Geweben.

Darüberhinaus gibt es noch andere Proteine, die mit den Tight Junctions assoziiert sind, z.B. Symplekin oder JAMs. Die Moleküle der JAM-Familie (junctional adhesion molecule- A, B, C) sind sowohl Bestandteil der endothelialen Tight Junctions, als auch der Leukozyten. Sie scheinen für die Diapedese der letzteren und weniger für die Bildung der Endothelbarriere wichtig zu sein (Del Maschio et al., 1999; Martin-Padura et al., 1998).

Adhärens-Junctionen und Tight Junctions scheinen miteinander verbunden zu sein und sich sogar in ihrer Organisation zu beeinflussen. So wurden typische Tight Junction Proteine wie ZO-1 während der frühen Phase der Junctionsbildung in Adhärens-Junctionen nachgewiesen (Itoh et al., 1993). Gezeigt wurde auch, dass eine korrekte Organisation der Tight Junctions in epithelialen Zellen nach Zerstörung der Adhärens-Junctionen durch Antikörper nicht mehr möglich war (Bazzoni und Dejana, 2004; Behrens et al., 1985). Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass die Bildung der Adhärens-Junctionen der Bildung der Tight Junctions vorausgeht.

Eine wichtige Rolle in der Organisation beider Junctionen scheint das Nectin-Afadin-System einzunehmen, welches sowohl in Epithel- als auch Endothelzellen vorkommt. Nectin gehört zur Familie der Immunglobulin-ähnlichen Adhäsionsproteine und bildet innerhalb der Zelle einen Ca^{2+} -unabhängigen Komplex mit Afadin (= AF6), welcher über die Bindung mit Posin, Vinculin und α -Catenin mit dem Actinzytoskelett verankert ist. In Tight Junctions interagiert der Nectin-Afadin-Komplex mit ZO-1 und JAMs (Fukuhara et al., 2002).

1.1.2 Caveolae

Caveolae sind 50-100nm große Invaginationen der Plasmamembran, die in den meisten Zelltypen wie Adipozyten, Muskelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten gefunden werden. In Endothelzellen machen sie mit 10.000-30.000 Caveolae/Zelle ca. 15% des totalen Zellvolumens aus (Mehta und Malik, 2006). Ihre Morphologie und ihre Rolle bei der Transzytose von Molekülen über das Endothel wurde bereits in den 1950er Jahren von Yamada, Farquhar und Palade postuliert und ist seither Gegenstand von Diskussionen und Untersuchungen (Stan, 2005).

Endotheliale Caveolae können in verschiedenen Konformationen vorliegen. Einzelne Caveolae bilden Haufen, sollen mit Caveolae der gegenüberliegenden Membran zu transendothelialen Kanälen fusionieren (Simionescu und Simionescu, 1991) oder formen vesikulo-vakuoläre Organellen (Feng et al., 2002). Durch den Transport von Albumin und anderen Plasmaproteinen über das Endothel helfen Caveolae den onkotischen Druck und die Flüssigkeitsbalance der Kapillaren aufrecht zu halten (Mehta und Malik, 2006).

Immunzytochemisch konnten Caveoline (Caveolin-1, -2 und -3) als spezifische Komponenten der Caveolae nachgewiesen werden, wobei Caveolin-1 und -2 in den meisten Zelltypen exprimiert werden und eine gleiche Gewebsverteilung zeigen (Scheiffle et al., 1998; Scherer et al., 1997), während Caveolin-3 vor allem in Muskelzellen vorkommt (Way und Parton, 1995). Noch ist nicht bekannt, ob auch andere spezifische Caveolae-Komponenten zusätzlich zu den Caveolinen existieren.

Caveolin-1 ist ein 21-24 kDa großes integrales Membranprotein (Glenney, 1989; Glenney, 1992), welches zwei Isoformen, translatiert von verschiedenen mRNAs,

aufweist (Caveolin-1 α und Caveolin-1 β) (Kogo et al., 2004; Kogo und Fujimoto, 2000). Untersuchungen mit Caveolin-1-defizienten Mäusen haben gezeigt, dass Caveolin-1 ein essentielles Strukturprotein für die Kompartimentbildung bzw. die Bildung von Caveolae darstellt (Drab et al., 2001). Caveolin-1 konzentriert und organisiert spezifische Lipide (Sphingomyelin, Cholesterol) und lipid-modifizierte Signalmoleküle, wie z.B. G-Proteine, H-Ras, Src-like Kinasen sowie PKC α , eNOS und Ca²⁺-Kanäle wie IP₃R und TRPC1, in der Plasmamembran (Fra et al., 1995; Li et al., 1995; Liu et al., 2002; Murata et al., 1995; Song et al., 1996), interagiert mit ihnen und ist mitverantwortlich für die Modulation von Signalsystemen. Umgekehrt scheint Cholesterol aber auch notwendig zur Stabilisierung von Caveolin-Oligomeren zu sein (Monier et al., 1996). Weiterhin beeinflusst Caveolin-1 über verschiedene Mechanismen auch die Funktion der Endothelbarriere. Es reguliert die mikrovaskuläre Permeabilität möglicherweise via caveolärer Transzytose (Schubert et al., 2002) und spielt eine Rolle bei der Integrität interendothelialer Junctionen (Akhtar und Hotchin, 2001; Shen und Turner, 2005), der Ansammlung und Verteilung von Adhärenz-Junctionen (Lu et al., 2003), sowie bei der Aktivität von Rac 1 (Gonzalez et al., 2004). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass auch eine von PKC (Proteinkinase C) hervorgerufene Lückenbildung, die teilweise durch eine Verminderung der von VE-Cadherin vermittelten Zelladhäsion hervorgerufen wird, von Caveolin-1 abhängig zu sein scheint (Waschke et al., 2006).

Zu den oben erwähnten Caveolae-assoziierten Molekülen gehört auch die endotheliale Stickstoff-Synthase (endothelial nitric oxide synthase= eNOS), deren synthetisiertes NO (nitric oxide= Stickstoff) als ein wichtiges Signalmolekül verschiedener Signalwege bei der Kontrolle der vaskulären Permeabilität gilt (Hood et al., 1998; Lal et al., 2001; Ramirez et al., 1995).

In Studien (Schubert et al., 2002) konnte gezeigt werden, dass die katalytische Aktivität der eNOS unter anderem durch die Bindung mit Caveolin-1 kontrolliert und die NO-Produktion inhibiert wird (Bucci et al., 2000). Cav-1-defiziente Zellen (Cav-1^{-/-}-Zellen) zeigen eine gesteigerte eNOS-Aktivität bei gleichbleibenden eNOS-Expressionslevels (Razani und Lisanti, 2001; Schubert et al., 2001; Schubert et al., 2002) und eine erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität. Caveolin-1 scheint somit eine duale Rolle zu spielen:

einerseits als ein Strukturprotein, das wichtig für die Ausbildung der Caveolae und die caveoläre Transzytose ist und andererseits als ein negativer Regulator der eNOS mit Einfluss auf den parazellulären Transport (Mehta und Malik, 2006) und die mikrovaskuläre Permeabilität (Zhu et al., 2004).

1.1.3 Das Zytoskelett

Das Zytoskelett der Endothelzellen besteht aus verschiedenen Systemen von Strukturproteinen, die alle zu Filamenten polymerisieren und Netzwerke bilden können. Bestandteile sind sowohl zytoplasmatische Microtubulus-, Intermediär- und Actinfilamente, als auch membrangebundene Filamentnetzwerke (das Spectrin- und Dytrophinsystem). Für die mechanische Integrität des Endothels spielen vor allem die Komponenten des Actinzytoskeletts eine Rolle. Durch sie haben Endothelzellen die Fähigkeit sich hämodynamisch veränderten Konditionen anzupassen.

Das Actinfilamentsystem der Endothelzellen kann in drei verschiedenen molekularen Organisationsformen vorliegen (Drenkhahn und Ness, 1997):

1) Cortikales Actin

Es handelt sich um ein schmales subplasmalemmales Actinnetz, das mit integralen Plasmamembranproteinen (Spectrin und Protein 4.1) verbunden ist. Es ist mitverantwortlich für die Viskoelastizität der Plasmamembran, die Immobilisation der integralen Membranproteine, die Erhaltung der Zellpolarität und die Kontrolle von Endo- und Exozytose.

2) Junctions-assoziiertes Actinfilamentsystem (JAF)

Es kann als spezialisierter Anteil des corticalen Netzes angesehen werden. Der Hauptanteil des JAF ist mit den Zonulae adherentes verbunden. Actin und α -Actinin binden an α -Catenin, welches über β - und γ -Catenin an die zytoplasmatische Domäne von VE-Cadherin gebunden ist (Knudsen et al., 1995). Auf der einen Seite stabilisiert das JAF die Junctionen, erhält den Phänotyp und die junctionale Integrität. Auf der anderen Seite kann es die Zellen über einen Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Signalweg mit Phosphorylierung der regulierenden Myosinleichtkettenkinase aktiv retrahieren

(Goeckeler und Wysolmerski, 1995).

3) Stressfasern

Stressfasern sind Myofibrillen-ähnliche Actinfilamentbündel mit kurzen Myosinfilamenten. Ihre Enden sind mit Arealen der Plasmamembran verbunden, die über membrandurchspannende Proteine der Integrin-Familie an Komponenten der Extrazellulärmatrix befestigt sind. Diese spezialisierten Abschnitte werden fokale Substratkontakte genannt. Stressfasern werden als Antwort auf unterschiedliche Umgebungsstimuli gebildet, abgebaut oder umorganisiert. Durch ihre ATP-abhängige Kontraktilität können sie Spannung entwickeln, um mechanischer Beanspruchung, z.B. Scherstress oder zyklischer Dehnung, entgegen zu wirken (Franke et al., 1984; Dartsch und Betz, 1989; Drenckhahn und Ness, 1997; Girard und Nerem, 1995).

1.1.4 Regulation der Endothelbarriere

Mechanismen der Lückenbildung

Die Beteiligung von Myosin-abhängigen kontraktilen Kräften an der Regulation der Endothelbarriere wurde erstmalig in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts angenommen (Majno und Palade, 1961; Majno et al., 1961) und konnte schließlich an kultivierten Endothelzellen bestätigt werden (Schnittler et al., 1990; Goeckler und Wysolmerski, 1995). Die Kontraktion spielt sowohl bei der Permeabilitätskontrolle des Endothelzellverbands- z.B. Lückenbildung im Rahmen von Entzündungsreaktionen (Garcia et al., 1995; Drenckhahn und Ness, 1997; Hixenbaugh et al., 1997; Schnittler et al., 1990) - als auch bei der Anpassung an veränderte äußere mechanische Stimuli eine Rolle (Acevedo et al., 1993; Ookawa et al., 1992; Salwen et al., 1998).

Ca^{2+} ist ein tragendes Element der endothelialen Integrität, da eine veränderte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration sowohl die Kontraktilität als auch, durch Einfluss auf die Actinpolymerisation, die VE-Cadherin abhängige Zelladhäsion beeinflusst. Die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration kann durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, rezeptorgekoppelte Ca^{2+} -Kanäle oder durch die Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern gesteigert werden. So beeinflusst eine Erniedrigung der extrazellulären Ca^{2+} -

Konzentration, z.B. durch EGTA oder EDTA, die Zelladhäsion über eine Destabilisierung von VE-Cadherin und führt dadurch zu einer gesteigerten Permeabilität (Del Maschio et al., 1996; Gao et al., 2000).

Eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wirkt als primärer Aktivator der kontraktilen Elemente in den Endothelzellen. Durch die Bindung von Ca^{2+} an Calmodulin entsteht ein Komplex, welcher wiederum an die Myosinleichtkettenkinase (= myosin light chain kinase= MLCK) bindet. Diese bewirkt daraufhin die Phosphorylierung der MLC (= myosin light chain= Myosin Leichtkette), aus welcher der Anstieg der Actin-aktivierten ATPase-Aktivität von Myosin und damit die Kontraktion resultiert (Adelstein und Conti, 1975). Ebenfalls kann auch eine Phosphorylierung der MLC durch andere Kinasen, insbesondere der Proteinkinase C (PKC) von funktioneller Bedeutung sein (Kawamoto et al., 1989).

In den letzten Jahren hat sich zunehmend gezeigt, dass die Mitglieder der Familie der kleinen GTPasen eine tragende Rolle in der Regulation der junktionalen Permeabilität spielen. Dabei scheint Rho A die Barrierefunktion des Endothels zu schwächen (Baumer et al., 2008; Vandenbroucke et al., 2008; Wojciak-Stothard und Ridley, 2003). Man geht davon aus, dass Rho A durch seinen Effektor ROCK (= Rho-Kinase) zusätzlich die oben beschriebene Phosphorylierung der MLC und somit die Kontraktion verstärkt, indem es die Aktivität der MLCP (= myosin light chain phosphatase= Myosin Leichtketten Phosphatase= PP1) inhibiert (Noda et al., 1995; Yoshioka et al., 2007). Rho A wird unter anderem durch die $\text{PKC}\alpha$, welche Rho GDI phosphoryliert, reguliert bzw. aktiviert (Gorovoy et al., 2007).

Darüberhinaus scheint Rho A auch über andere Mechanismen auf die Endothelbarriere einzuwirken. So führt eine Destabilisierung der Microtubuli über einen Rho A/ROCK-abhängigen Signalweg zu einer gesteigerten MLC-Phosphorylierung, Stressfaserbildung und endothelialen Kontraktion. Dieser Mechanismus scheint ebenfalls durch die Inhibition der MLC-Phosphatase vermittelt zu werden und unabhängig von der MLCK zu sein (Verin et al., 2001). Zusätzlich führt ROCK über Phosphorylierung von Occludin zu einem Verlust der Tight Junctions und über Phosphorylierung von ERM-Proteinen (= Ezrin, Radixin, Moesin) zu einer gesteigerten Stressfaserbildung und

Permeabilität (Koss et al., 2006; Tsukita und Yonemura, 1999).

Neben den Mechanismen, die die aktive Zellkontraktion stimulieren, sind andere Vorgänge denkbar, welche die Stabilität der Zell-Zell-Kontakte beeinflussen. Es wurde gezeigt, dass eine gesteigerte Tyrosin-Phosphorylierung des Cadherin-Catenin-Komplexes, wie sie durch Stimulation des VEGF-Rezeptors hervorgerufen werden kann, eine Internalisation von VE-Cadherin verursacht und mit einer Abschwächung der junctionalen Stabilität korreliert (Esser et al., 1998; Gavard und Gutkind, 2006).

Die Permeabilität bzw. Integrität des endothelialen Zellverbands *in vitro* wird zusammenfassend durch ein Ungleichgewicht zwischen einer gesteigerten Kontraktilität der Endothelzellen einerseits und einer reduzierten Zelladhäsion andererseits beeinflusst. *In vivo* scheint die Kontraktilität weniger bedeutsam für die Permeabilitätsregulation zu sein, da auch bei Hemmung der MLCK-Aktivität eine Permeabilitätssteigerung durch verschiedene Agonisten erfolgen kann (Waschke et al., 2004).

Barriere-stabilisierende Mechanismen

Inflammatorische Stimuli sowie andere permeabilitätssteigernde Mediatoren induzieren typischerweise eine gesteigerte endotheliale Permeabilität, indem sie die Zelladhäsion an die extrazelluläre Matrix stören und/oder die interzellulären Kontakte öffnen (Mehta und Malik, 2006). Die Zelle verfügt über bestimmte Mechanismen, die die reversible Permeabilitätssteigerung aufheben und zu einer Erholung der endothelialen Barrierefunktion führen können. Diese sind aber im Gegensatz zu den Mechanismen der Lückenbildung weniger gut verstanden. Man weiß jedoch, dass neben anderen auch hier die Mitglieder der Familie der kleinen GTPasen eine Rolle spielen. So trägt einerseits eine Inhibition von Rho A bzw. der Rho A-Aktivität, z.B. durch FAK (= focal adhesion kinase= fokale Adhäsionskinase), zum Erhalt der endothelialen Barriereintegrität bei (Holinstat et al., 2006), andererseits vermittelt die Aktivierung anderer Mitglieder der kleinen GTPasen protektive Effekte.

Es konnte gezeigt werden, dass die kleinen GTPasen Rac 1 und Cdc 42 sowohl die Bildung und Organisation der Actinfilamente regulieren, als auch die Cadherin-vermittelte Zelladhäsion und Gruppierung der Adhärens-Junktionen kontrollieren (Bustelo et al., 2007; Jaffe und Hall, 2005). Rac 1 scheint einerseits die Interaktion von α -Catenin und Cadherinen zu regulieren und somit die Endothelbarriere zu stabilisieren

(Baumer et al., 2008; Waschke et al., 2004), andererseits die Assoziation von β -Catenin mit IQGAP zu lösen und somit mehr β -Catenin zur Bindung an Cadherine bereit zu stellen, was die Bildung neuer Adhärenz-Junktionen induziert (Kuroda et al., 1996).

Auch Cdc 42 wird eine Rolle bei der Regulation der junktionalen Stabilität und der endothelialen Permeabilität zugesprochen. Aktiviertes Cdc 42 transloziert aus dem Zytosol an die Zellmembran (Kouklis et al., 2003) und stimuliert möglicherweise die Interaktion zwischen α -Catenin und dem β -Catenin/VE-Cadherin-Komplex, so dass ein Permeabilitätsanstieg verhindert werden kann (Broman et al., 2007). Zusätzlich scheint aktiviertes Cdc 42 Einfluss auf die Bildung und Ausdehnung des Actinzytoskeletts zu haben, was möglicherweise die Wiedervereinigung zerstörter Adhärenz-Junktionen und die Wiederherstellung der endothelialen Barrierefunktion fördert (Kouklis et al., 2003).

Ein weiterer Mediator, der die Integrität des endothelialen Zellverbands aufrechterhält, ist cAMP. cAMP (= Cyclic adenosine monophosphate= zyklisches Adenosinmonophosphat) ist ein bekanntes intrazelluläres Signalmolekül, das durch die Adenylatzyklase und Phosphodiesterasen in seiner Konzentration reguliert wird und einen positiven Einfluss auf die Barrierfunktion vaskulärer Endothelzellen hat (Michel und Curry, 1999; Stelzner et al., 1989). Es dient als sekundärer Botenstoff im Signalweg des Gs-gekoppelten Rezeptors und ist über diesen an der Reduktion der durch inflammatorische Stimuli hervorgerufenen endothelialen Permeabilitätssteigerung beteiligt (Farmer et al., 2001; Hippenstiel et al., 2002). Man geht davon aus, dass die durch cAMP-vermittelte Stabilisierung der Zell-Zellkontakte sowie die Stabilisierung der endothelialen Integrität hauptsächlich von Proteinkinase A (= PKA) abhängig ist (Yuan, 2002). Die aktivierte PKA inhibiert unter anderem die endotheliale Kontraktion, indem sie eine Aktivierung von Rho A und MLCK verhindert (Nishikawa et al., 1984; Patterson et al., 2000; Qiao et al., 2003) und VASP phosphoryliert, was durch Stabilisierung der interendothelialen Junktionen zu einer verstärkten Barrierefunktion beiträgt (Comerford et al., 2002). Auf der anderen Seite führt eine Erhöhung des cAMP-Spiegels zu einer Zunahme von Zonula occludens-Leisten (Adamson et al., 1998).

Darüberhinaus scheinen bei der Regulation der Endothelbarriere aber auch PKA-unabhängige Mechanismen involviert zu sein. So konnten Fukuhara et al. (2005) zeigen, dass vermehrtes cAMP auch über den PKA-unabhängigen Signalweg

Epac/Rap1 die Permeabilität reduzieren und die VE-Cadherin vermittelte Zell-Zelladhäsion stabilisieren kann. Diese protektiven Effekte scheinen u.a. durch eine cAMP-Epac-Rap1-induzierte Aktivierung von Rac 1 vermittelt zu werden (Birukova et al., 2007; Baumer et al., 2008). Daneben gibt es andere Barriere-stabilisierende Mediatoren, wie S1P (= Sphingosine-1-phosphat) oder Ang-1 (= Angiopoetin-1), bzw. Lipidmediatoren, wie Prostaglandine, die bei einem Permeabilitätsanstieg aktiviert werden und die Barrierefunktion, teilweise über oben beschriebene Signalwege, schützen bzw. wiederherstellen (Mehta und Malik, 2006; Vandenbroucke et al., 2008).

1.2 Heranführung an die Fragestellung

Unter physiologischen Konditionen sind Endothelzellen verschiedenen mechanischen Kräften wie Scherstress, zyklischer Dehnung und hydrostatischem Druck ausgesetzt. Obwohl der Einfluss dieser Kräfte auf Endothelzellen schon Gegenstand der Forschung ist, beschränkt sich das Verständnis, welche Rolle der hydrostatische Druck bei der Regulation der Endothelzellbiologie spielt, auf druckinduzierte morphologische Veränderung der Endothelzellen. Es ist aber nur teilweise klar, wie diese Umgebungsstimuli bzw. hydrostatischer Druck die Barrierefunktion des Endothels mit beeinflussen. Werden kultivierte Endothelzellen z.B. einem Scherstress für unterschiedlich lange Zeitspannen ausgesetzt, so zeigen sie dramatische Veränderungen in ihrer Zytoskelettstruktur und ihrer Morphologie. Die unter statischen Konditionen pflastersteinförmigen Zellen elongieren parallel zur Flussrichtung und das Actinzytoskelett wird zu dicken zentral lokalisierten Stressfasern rearrangiert. Dieser Einfluss von Scherstress ist abhängig von Zeitintervall und Flusstärke und konnte in vielen Studien nachgewiesen werden (Dewey et al., 1981; Franke et al., 1984; Girard und Nerem, 1993; Levesque und Nerem, 1985).

Ähnliche Phänomene wurden in vorausgehenden Studien unter hydrostatischen Druckbedingungen beobachtet. Es wird berichtet, dass kultivierte Endothelzellen unter Drücken zwischen 12 mmHg bis 100 mmHg über mehrere Tage signifikante Veränderungen in ihrer Morphologie aufweisen. Es wurde beschrieben, dass die Endothelzellen, im Gegensatz zu den Zellen unter Scherstress, ohne bestimmte

Orientierung elongiert und die Actinfilamente reorganisiert sind (Acevedo et al., 1993; Salwen et al., 1998; Sato und Ohashi, 2005; Sumpio et al., 1994). In mehreren Untersuchungen wurde unter niedrigen Drücken die Bildung mehrlagiger Zellverbände beobachtet (Acevedo et al., 1993; Salwen et al., 1998). Ohashi et al. beobachteten zusätzlich einen Verlust von VE-Cadherin entlang der Zelljunctionen sowie eine verminderte VE-Cadherin-Expression unter hohen hydrostatischen Drücken bis 100 mmHg für 24h (Ohashi et al., 2007; Sato und Ohashi, 2005).

Schon 1973 konnte im Rahmen von Permeabilitätsstudien die Beobachtung gemacht werden, dass Endothelzellen bzw. die endotheliale Barrierefunktion in in vitro-Modellen und in vivo-Modellen durch eine extrazelluläre Ca^{2+} -Depletion unterschiedlich beeinflusst werden: die Perfusion von mesenterialen und muskulären Mikrogefäßen mit Ca^{2+} -freier Ringerlösung führte nicht zu einem Permeabilitätsanstieg (Curry et al., 1973). In den folgenden Jahren fielen im Vergleich zu in vitro-Studien Diskrepanzen auf. Einerseits zeigten Studien, dass EDTA und EGTA zu einer gesteigerten Permeabilität des endothelialen Zellverbands führten, andererseits konnte in anderen Untersuchungen, die unter Anwesenheit von hydrostatischem Druck durchgeführt wurden, keine Lückenbildung unter EDTA/EGTA-Exposition beobachtet werden (Suttorp et al., 1989).

In weiteren Arbeiten wurde gezeigt, dass der Ca^{2+} -Calmodulin-Antagonist Trifluoperazin (= TFP) unter niedrigem hydrostatischen Druck eine durch A23187 (Ca^{2+} -Ionophor) hervorgerufene Permeabilitätssteigerung in Endothelzellen aus der Pulmonalarterie des Schweins verhindert (Schnittler et al., 1990; Wilke, 1987), wo hingegen TFP in Abwesenheit von hydrostatischem Druck zu einer Lückenbildung im endothelialen Zellverband führt.

2001 konnte in unserem Labor ein protektiver Effekt des physiologischen hydrostatischen Drucks gegenüber unterschiedlicher chemischer Stimuli in makrovaskulären Endothelzellen bestätigt werden (Steinbrenner, 2001).

1.2.1 Fragestellung

Alle diese Daten zeigen, dass hydrostatischer Druck die Biologie der Endothelzelle beeinflusst. Dennoch ist der genaue Mechanismus, wie hydrostatischer Druck

Endothelzellen und Barrierefunktionen reguliert, noch nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit sollte die Hypothese, dass physiologischer hydrostatischer Druck effektiv die Integrität einschichtiger Endothelzellverbände in vitro schützt, in einer vergleichenden Studie von mikrovaskulären und makrovaskulären Endothelzellen untersucht werden. Darüberhinaus sollten erste Anhaltspunkte gefunden werden, welche Signalwege bei der Transduktion des hydrostatischen Drucks auf die Endothelzellbiologie eine Rolle spielen könnten.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Isolierung und Präparation pulmonaler Schweine-Endothelzellen

Der Truncus pulmonalis wurde mit Pinzette und Schere weitestgehend von Fettresten befreit und weiterhin mit sterilem PBS (= Phosphat buffered saline: 0,137 M NaCl; 2,68 mM KCl; 9,58 mM Na₂HPO₄ und 1,47 mM KH₂PO₄ in Aqua_{bide}st) gespült, um restliches Blut und Blutgerinnsel soweit wie möglich zu entfernen. Unter sterilen Bedingungen wurde eine Seite des Gefäßes mittels einer Klemme verschlossen, je nach Größe des Gefäßes mit ca. 3 ml Kollagenase A-Lösung (1 mg/ml in PBS) gefüllt und anschließend auch die zweite Öffnung abgeklemmt. Nach einer 15 min Inkubation in angewärmten PBS konnten die durch die Kollagenase A abgelösten Zellen mit ca. 2 x 5 ml Medium (M199 ohne FCS) in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert (5 Min bei 150 x g) werden. Das Zellsediment wurde schließlich in 5 ml Aussaatmedium (M199 + 20%FCS) resuspendiert und pro Arterie auf eine 25 cm² große gelatinierte Kulturflasche ausgesät. Nach 3 h erfolgte der erste Mediumwechsel, nach einem Tag der zweite, dann - wie in der Routinekultur - alle 2-3 Tage. Früheste Ablösung und Aussaat der Zellen auf weiter Kulturschalen (Splittung) in Passage 1 war nach einer Woche möglich. Ab diesem Zeitpunkt mussten die Zellen mit M199 + 10% FCS versorgt werden.

Routinekulturen

Die Zellkulturhaltung erfolgte als offenes System in einem CO₂-Auto-Zero-Brutschrank bei 37°C, ca. 80% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂. Als Kultivierungsmedien dienten DMEM (Dulbeccos modified Eagle medium) und M199. Das Medium wurde in fertigen Pulvermischungen geliefert, für den Gebrauch in H₂O gelöst und durch Zugabe von NaHCO₃ gepuffert (pH 7,5). Anschließend wurde das Medium steril filtriert und mehrere Monate bei 4°C gelagert. Vor dem Gebrauch wurde das Medium mit 2,5 ml Penizillin-G/Streptomycin (Penizillin/Streptomycin-Stammlösung: je 10000 U Penizillin und Streptomycin pro 1000 ml PBS, pH 5,58) und 10% FCS supplementiert.

PSEC-Routinekultur

Die in gelatinieren T25- Kulturflaschen mit 5 ml Aussaatmedium (M199 + 20% FCS + 2,5ml Pen/Strep) gehaltenen PSEC-Zellen wurden nach etwa 5-7 Tagen passagiert, wobei alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel erfolgte. Anschließend konnten die Zellen bei Konfluenz nach Trypsin-Inkubation (3 min) abgelöst und entweder in eine T75 überführt oder auf gelatinierter Deckgläschen ausgesät werden. Für alle Experimente wurden PSEC-Zellen verwendet, die sich in Passage 1-2 befanden und einen konfluenten Zellrasen gebildet hatten.

MyEnd-Routinekultur

Diese Endothelzellen stammen aus myokardialen mikrovaskulären Gefäßen. Auch sie wurden in gelatinieren T25- bzw. T75-Kulturflaschen bei zweitägigem Mediumwechsel kultiviert. Bereits ein- bis zwei Tage nach dem Aussäen zeigten die Zellen einen konfluenten Zellrasen, dennoch wurden sie nur einmal pro Wochen im Verhältnis 1:3 auf Kulturflaschen bzw. gelatinierter Objektträger und Deckgläschen verteilt. Auch hier erfolgte das Ablösen der Zellen mit Hilfe einer Trypsin-Inkubation (10 min), nachdem zunächst mit einer PBS-Spülung die Mediumreste entfernt worden waren. Für die Experimente wurden konfluente Kulturen (innerhalb des 3. bis 7. Tages nach Aussaat) verwendet. Bei der Charakterisierung (Golenhofen et al., 2002; Waschke et al., 2006) zeigten MyEnd-Zellen Immunpositivität für verschiedene endotheliale Marker. Die Expression von junctionalen Proteinen wie VE-Cadherin, α -, β -, γ -Catenin, ZO-1 und Claudin 5 sowie von-Willebrand-Faktor und eNOS (endotheliale NO-Synthase) konnten mittels Immunfärbung und Immunblots verifiziert werden.

Kryokonservierung von MyEnd-Zellen

Je häufiger eine Zelllinie passagiert wird, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass es zu genomischen und morphologischen Veränderungen der Zellen kommt. MyEnd-Zellen wurden deshalb in niedrigen Passagen kryokonserviert, um bei Bedarf wieder rekultiviert werden zu können.

Einfrieren von MyEnd-Zellen

Die Zellen einer konfluenten T75-Kulturflasche wurden durch Trypsinbehandlung abgelöst und bei 150 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 3 ml vorgekühltem Einfriermedium, das 10 %[V/V] des kryoprotektiven Dimethylsulfoxid (DMSO) enthielt, resuspendiert. Da DMSO bei Raumtemperatur toxisch an den Zellen wirkt (Zerstörung der Membranen), wurde zügig gearbeitet. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und für eine Woche in einer Einfrierbox bei -80°C, danach in flüssigem Stickstoff gelagert.

Auftauen von MyEnd-Zellen

Zum Auftauen der Zellen und zur schnellen Verdünnung von DMSO wurde auf 37°C vorgewärmtes Medium auf die eingefrorenen Zellen im Kryoröhrchen pipettiert. Durch vorsichtiges Resuspendieren und weiterer Zugabe angewärmten Mediums tauten die Zellen auf, konnten in ein Zentrifugengefäß überführt und bei 150 x g 5 min zentrifugiert werden. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellsediment in 5 ml frischem Medium resuspendiert und in eine gelatinierte T25-Kulturflasche überführt. Am darauffolgenden Tag war ein Mediumwechsel notwendig, um tote Zellen zu entfernen. Vor der nächsten Kryokonservierung sollten die Zellen mindestens zweimal passagiert worden sein.

Vorbehandlung von Kulturflaschen und Glaswaren

Sowohl MyEnd- als auch PSEC-Zellen wachsen besonders gut auf einer Oberfläche, die mit Kollagen (Gelantine) beschichtet ist.

Gelatinieren von Kulturflaschen

Bevor die Zellen in neue Kulturschalen überführt wurden, mussten diese gelatiniert werden. Dafür wurde der Boden der Kulturflaschen mit 0,5% Gelatine in H₂O bedeckt. Nach 30 min wurde die Gelatine-Lösung abgesaugt, die Flasche zweimal mit PBS gewaschen und danach Medium vorgelegt.

Gelatinieren von Glaswaren

Sowohl Deckgläschen als auch Objektträger wurden für 30 min mit 0,5% Gelatine in

H₂O unter regelmäßigem Schwenken beschichtet. Anschließend wurde die Gelatine-Lösung abgesaugt und die beschichteten Glaswaren wurden mit 2% Glutaraldehyd in PBS für 30 min inkubiert, um den Gelatineüberzug querzuzernetzen (Schnittler et al., 1993). Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 10 min, um restliches Glutaraldehyd zu entfernen, wurden die fertig beschichteten Glaswaren in PBS mit Penicillin-G/Streptomycin (10000 U/ml; im Verhältnis 100:1) bei 4°C aufbewahrt.

2.2 Versuchsreagentien

Alle Reagentien wurden für 45 min in Anwesenheit oder Abwesenheit des hydrostatischen Drucks appliziert. EGTA (3mM) wurde bei Applichen (Darmstadt, Germany) gekauft. Cytochalasin D (10µM), Trifluoperazin (TFP, 100µM) und Thrombin (10U/ml) wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) bezogen.

1) EGTA

= Ethylenglycoltetraessigsäure

EGTA ist ein für Ca²⁺-spezifischer Chelator und kann in Gegenwart von Mg²⁺ angewendet werden, da es eine 1000fach niedrigere Affinität für Mg²⁺ besitzt.

2) Cytochalasin D

Cytochalasin D ist ein zellpermeables fungales Toxin, welches die Polymerisation von Actin-Untereinheiten (G-Actin) hemmt. Es inhibiert die Actin-Polymerisation, indem es an das Plus-Ende der Actinfilamente (F-Actin) bindet und das Gleichgewicht zwischen Polymerisation und Depolymerisation zu Gunsten der Depolymerisation verschiebt und so einen Zusammenbruch des Actinfilament-Systems bewirkt (Goddette und Frieden, 1986). Daraus folgt, dass Cytochalasin D besonders dynamische Actinfilamentstrukturen (F-Actin) mit einem hohen Umsatz von Actinmonomeren (G-Actin) zerstört.

3) Trifluoperazin (TFP)

TFP, ein Neuroleptikum, gehört in die Klasse der Phenothiazine. Es bindet mit

hoher Affinität an Calmodulin, induziert eine Konformationsänderung und verhindert die Interaktion des Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexes mit seinen Zielproteinen (Bar-Sagi und Prives, 1983; Krebs und Carafoli, 1982; Prozialeck und Weiss, 1982; Roufogalis et al., 1983) bei einem Konzentrations-Optimum zwischen 50-100 μM (Osborn und Weber, 1980).

Dadurch verhindert TFP u.a. die Aktivierung der MLCK (Myosinleichtketten-Kinase), so dass es zur Abnahme des kontraktile Tonus der Zelle kommt. Die resultierende Lückenbildung zwischen den Zellen kommt möglicherweise über eine Reduktion des Tonus sowie der Neubildung von Stressfasern und die dadurch resultierende Auflösung fokaler Kontakt zustande (Fukata et al., 1999).

4) Thrombin

(= Faktor IIa der Blutgerinnung). Thrombin ist eine Serin-Endopeptidase, die im Blutplasma durch Faktor V und X mit Hilfe des Cofaktors Ca^{2+} und Membranphospholipiden aus Prothrombin entsteht. Es überführt lösliches Fibrinogen in Fibrin und löst die Thrombozytenaggregation und Freisetzung von Plättchenfaktoren aus, bevor es nach einer Halbwertszeit von ca. 5 Minuten durch Protein C inaktiviert und aus der Zirkulation entfernt wird. Zusätzlich reguliert Thrombin Prozesse der Homöostase, der Mitogenese und der Kontraktion glatter Muskelzellen (Mehta und Malik, 2006). In kultivierten Endothelzellen wird Thrombin vielfach als inflammatorischer Mediator verwendet. Es aktiviert an der Zelloberfläche den Proteinase-aktivierten-Rezeptor-1 (= PAR-1) durch proteolytische Freilegung einer Aktivator-peptidsequenz und steigert die endotheliale Permeabilität in endothelialen Zellverbänden innerhalb von Minuten, indem es zu Lückenbildung zwischen benachbarten Zellen, zu Aktivierung kontraktile Mechanismen innerhalb der Endothelzelle und zu einer veränderten Organisation der Zell-Zellkontakte führt (Rabiet et al., 1996; Sandoval et al., 2001). Diese Auswirkungen von Thrombin auf den endothelialen Zellverband scheinen über verschiedene Signalwege vermittelt zu werden. Unter anderem aktiviert Thrombin die Ca^{2+} -abhängige $\text{PKC}\alpha$, welche wiederum über einen Rho A/ROCK abhängigen Signalweg den Zusammenbruch der endothelialen Barrierefunktion vermittelt (Mehta et al.,

2001). Ein weiterer Signalweg über Proteinkinase C-assozierte Proteinkinasen scheint ebenfalls eine Rolle bei der Wirkung von Thrombin auf den endothelialen Zellverband, insbesondere die fokale Adhäsion, zu spielen (Gavard und Gutkind, 2008).

2.3 Hydrostatischer Druck

Hydrostatischer Druck ist definiert als der Druck, der sich innerhalb einer ruhenden Flüssigkeit unter dem Einfluss der Gravitationskraft einstellt. Im engeren Sinne bezeichnet der hydrostatische Druck nur den Schweredruck. Dieser wächst in einer inkompressiblen Flüssigkeit proportional zur Tiefe, da auf eine Wasserschicht eine umso größere Gewichtskraft wirkt, je höher die darüber lastende Wassersäule ist. Der hydrostatische Druck einer Flüssigkeit ist überall in einem Gefäß gleich und wirkt allseitig. Auf allen Flächen bewirkt der hydrostatische Druck (wie jeder Druck) eine senkrecht zur Fläche gerichtete Druckkraft (SI-Einheit Pascal= Pa= N/m²). Bei einem Gefäß mit bekannter Querschnittsfläche A lässt sich der Schweredruck p in Abhängigkeit der Flüssigkeitsdichte ρ für die in der Tiefe h befindliche Wasserschicht berechnen (Duden Physik 2001).

Umrechnungstabelle: 133,322 Pa= 1 mmHg= 1,364 cmH₂O

→ 5 cmH₂O= 3,7 mmHg

→ 15 cmH₂O= 11 mmHg (Salwen et al., 1998)

2.4 Druckversuche

Für jedes einzelne Experiment wurden verschiedene Passagen von MyEnd-Zellen und unterschiedliche Präparationen der PSECs verwendet. Die Zellen wurden auf Deckgläschen für den diskontinuierlichen- und auf Objektträgern für den kontinuierlichen Druckversuch ausgesät.

Diskontinuierlicher Druckversuch

Die Deckgläschen mit konfluentem Zellrasen wurden in die Vertiefungen einer 6-Loch-Plastikplatte zusammen mit Wachstumsmedium mit bzw. ohne Testsubstanzen eingebracht und jede einzelne Kammer mittels eines Silikonstopfens luftblasenfrei abgedichtet. Dieser Stopfen enthielt in seiner Mitte eine Perforation, in die eine Pipette eingepaßt war, die als Druckrohr fungierte. Schon während des Abdichtens der Kammer stieg das enthaltene abgemessene Medium in der Regel auf die gewünschte Höhe von 5 cmH₂O (= cmMedium) im Druckrohr. Für Experimente mit Drücken von 15 cm Wassersäule wurde das Druckrohr anschließend von oben weiter aufgefüllt. Anschließend wurde das System für 45 min im Brutschrank bei 37°C belassen (siehe Abb. 2). Bei Kontrollversuchen wurden die Vertiefungen der 6-Loch-Platte mit 2 mm Medium überschichtet. Diese Bedingung wird im weiteren Verlauf der Arbeit als „Abwesenheit von hydrostatischem Druck“ bezeichnet.

Kontinuierlicher Druckversuch

Um die Endothelzellen auch unter kontinuierlicher Steigerung des hydrostatischen Drucks untersuchen zu können, musste ein anderes System gewählt werden. Endothelzellen wurden auf gelatinierten Objektträgern gezüchtet, welche schließlich bei konfluentem Zellrasen in senkrechter Position übereinander in einem Messzylinder aus Plexiglas platziert wurden. Anschließend wurde der Messzylinder mit Medium mit oder ohne Testsubstanzen bis auf 15 cm Wassersäule gefüllt und ebenfalls 45 min bei 37°C im Brutschrank belassen, um einen so generierten kontinuierlichen Druckgradienten von 0 cm Wassersäule (unmittelbar unterhalb der Oberfläche des Mediums) bis 15 cm Wassersäule (am Boden des Zylinders) auf die Zellen einwirken zu lassen (siehe Abb. 2). Dieser Aufbau ermöglicht das gleichmäßige Einwirken des Drucks auf die Zellen von allen Seiten unter Ausschluß von Biegebeanspruchungen.

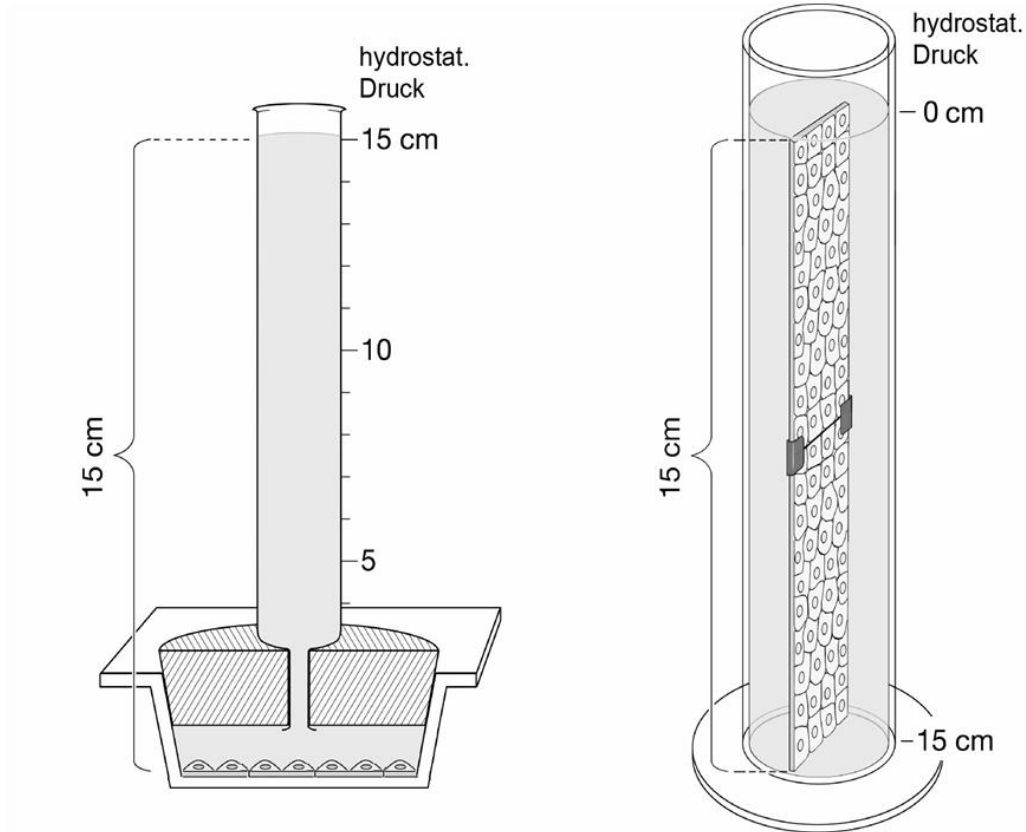


Abb. 2. Für die diskontinuierlichen Druckexperimente wurden mit Zellen bewachsene Deckgläschen am Boden einer 6-Loch-Platte platziert. Die einzelnen Löcher wurden mittels eines Silikonstoppers mit zentral eingelassener Pipette verschlossen, die mit Medium befüllt wurde, um den hydrostatischen Druck zu applizieren (links im Bild). Für die kontinuierlichen Druckversuche wurden Zellen auf Objektträger ausgesät, welche in aufrechter Position in einem mit Kultumedium befüllten Messzylinder platziert wurden (rechts im Bild).

(modifiziert nach Mueller-Marschhausen et al.)

2.5 Mikroskopie bzw. Immunhistochemie

Nach der Inkubation der Zellen mit den Versuchsreagentien für 45 min, wurde das Kulturmedium durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen 10 min bei Raumtemperatur (RT) mit 2% Formaldehyd in PBS fixiert. Überschüssiges Formaldehyd wurde durch weiteres Waschen (3x) entfernt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit 0,1% Triton-X-100 in PBS permeabilisiert und wiederum 3x mit PBS gewaschen.

Die Objektträger und die anschließend auf Objektträger platzierten Deckgläser wurden bei RT 30 min mit BSA/NGS bzw. BSA/NDS abgesättigt und die Zellen anschließend

über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer mit einem Erstantikörper inkubiert. Um VE-Cadherin in MyEnd-Zellen anfärben zu können, wurden diese mit dem monoklonalen Ratten-Antikörper 11D4.1 (unverdünnter Hybridoma-Überstand) (Gotsch et al., 1997), PSEC dagegen mit einem polyklonalen Ziegen-Antikörper gegen VE-Cadherin (Santa Cruz, Heidelberg, Germany, 1:100) behandelt. Um Claudin 5 anzufärben, wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Zymed Laboratories/Invitrogen, Karlsruhe, Germany, 1:100) verwendet.

Vor der Zugabe eines markierten Zweitantikörpers wurden die Objektträger wieder dreimal mit PBS gespült. Die Zellen wurden 60 min bei RT mit dem Zweitantikörper inkubiert [Cy3-markierte Ziege anti-Ratte IgG (garb) oder Cy3-markierte Esel anti-Ziege IgG (dag) (beide von Dianova, 1:600)]. Zur Darstellung von F-Actin wurde zusätzlich mit Alexa-markiertem Phalloidin 488 inkubiert (Morbitec Goettingen, Deutschland). Anschliessend folgten Spülungen mit PBS (3 x 5min) und Eindeckung der Deckgläschen mit 60% Glycerin in PBS + 2,5% NPG (n-Propylgallat, Serva, Heidelberg, Germany) - zum Schutz vor Verbleichen. Alle verwendeten Antikörper wurden in PBS/Acid (0,05 % NaN₃ in PBS) verdünnt.

2.6 Laserpinzette

2.6.1 Prinzip der Laserpinzetten-Technik

In der physikalischen Grundlagenforschung werden Lichtdruck bzw. Laser seit den 80er Jahren zur Beeinflussung von kleinen Partikeln verwendet und auch in den Biowissenschaften z.B. im Rahmen der Laserpinzette eingesetzt (Ashkin und Dziedzic, 1985). Der Strahl eines Infrarotlasers (λ -1064nm) wird in ein Mikroskopobjektiv gelenkt und von diesem in die Objektebene fokussiert. Aufgrund ihres elektrischen Dipols wandern freie Partikel in einem Lichtintensitätsgradienten in Richtung der höchsten Lichtintensität und bleiben daher auch unter Bewegung des Lasers immer im Fokus. Auf diese Weise ist es möglich Partikel „einzufangen“ und zu bewegen.

Die Laserpinzette besteht aus einem Nd:Yag Laser (1064 nm), einem Axiovert 135 Mikroskop mit einem hochauflösendem NA-Objektiv (Zeiss, 100 x 1,3 oil) und einem dichroischen Spiegel (Zeiss, FT 510), der den Laserstrahl zum Objektiv reflektiert. Die

fokale Ebene kann mittels Videokamera auf einem Bildschirm beobachtet werden. Die Laserpinzette wurde hier zur Untersuchung der durch VE-Cadherin vermittelten Adhäsion unter Beeinflussung verschiedener Reagentien und Druckbedingungen eingesetzt. Für alle Experimente wurde eine Laserstrahl-Intensität von 42 mW im Fokus gewählt.

Mit VE-Cadherin beschichtete Mikroperlen wurden unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen ins Kulturmedium appliziert. In einem Zeitraum von 45 min interagierte das an die Mikroperlen gebunden VE-Cadherin mit dem membranständigen VE-Cadherin der mikrovaskulären Endothelzellen und die Mikroperlen wurden gebunden.

2.6.2 Beschichtung von Protein A-Mikroperlen

Nach gutem Schütteln wurden einer Suspension bestehend aus mit Protein A beschichteten superparamagnetischen Polystyren-Mikroperlen (2×10^9 Mikroperlen/ml, Durchmesser 2,8 μm ; Dynal, Oslo) 10 μl entnommen und dreimal mit 100 μl 0,1 M Natriumphosphatlösung (pH 8,1) in einem Eppendorfgefäß gewaschen. Zwischen den Waschsritten wurde das Eppendorfgefäß in einen Magnethalter (MPC-E-1, Dynal) eingespannt, um die magnetischen Perlen an der Gefäßwand zu sammeln bzw. zu immobilisieren, so dass die Waschflüssigkeit ohne größere Verluste abgezogen werden konnte. Anschließend wurden die Mikroperlen in 100 μl 0,5 M Natriumphosphatlösung (pH 8,1) und HBSS (Hanks balanced salt solution, Gibco, Karlsruhe) mit 10 μg VE-Cadherin-Fc-Fusionsprotein über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert, um das Protein an die Perlen zu binden. Das VE-Cadherin-Fc-Protein bestand aus der kompletten extrazellulären Domäne des VE-Cadherins (EC1-EC5) der Maus und dem Fc-Teil des humanen IgG1. Das Protein wurde von transfizierten Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) exprimiert und mittels Protein-A-Agarose-Chromatographie aus den Kulturen gewonnen. Am folgenden Tag wurden die Mikroperlen wieder dreimal mit 0,1 M Natriumphosphatlösung (pH 8,1) und anschließend dreimal in 0,1 M Boratpuffer (pH 9) gewaschen und 45 min in 0,1 M Boratpuffer (pH 8,5) mit 0,54 mg DMP bei RT auf einem Drehrad inkubiert. DMP

diente zur Quervernetzung von Protein A mit den Proteinen. Die Mikroperlen wurden zweimal mit 100 µl 0,2 M Ethanolamin (pH 8,0) gewaschen und schließlich noch 2 h bei RT am Drehrad inkubiert, um restliche Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurden die Mikroperlen dreimal 5 min mit HBSS gewaschen, in 100 µl HBSS aufgenommen und bei 4°C auf dem Drehrad bis zum Gebrauch, aber nicht länger als 7 Tage, aufbewahrt. Die Mikroperlen-Konzentration in der Suspension betrug etwa $1,6 \times 10^8$ Mikroperlen/ml.

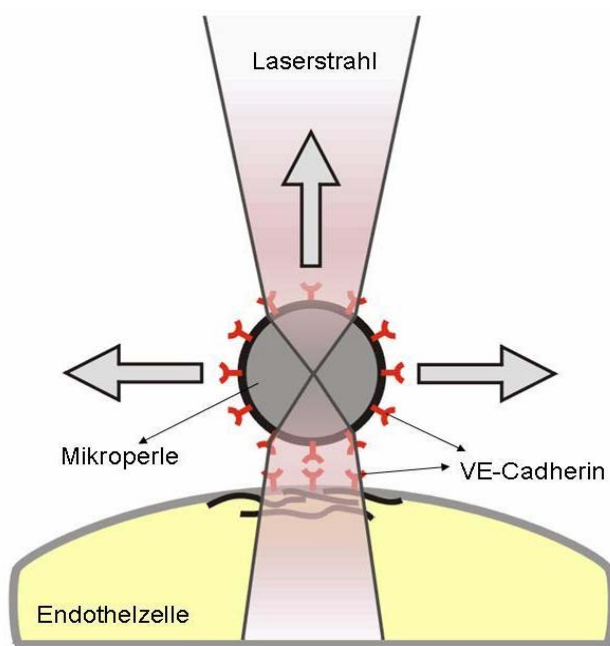


Abb. 3.

Prinzip der Laserpinzette.

Eine mit VE-Cadherin beschichtete Mikroperle im Fokus des Laserstrahls auf einer VE-Cadherin exprimierenden Endothelzelle. Ließ sich die Mikroperle durch Verschiebung des Laserstrahls bewegen, galt sie als nicht gebunden.

(modifiziert nach Drenckhahn/Christof)

2.6.3 Messungen mit der Laserpinzette

Für die Versuche mit der Laserpinzette wurden die Endothelzellen auf gelatinierte Deckgläschen (Durchmesser 22 mm; Stärke 0,13-0,16 mm) ausgesät und nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens innerhalb von 3-4 Tagen verwendet. Für die Kontrollexperimente wurden die Deckgläschen auf Objektträger mit einem Loch in der Mitte aufgelegt und mit einer dünnen Schicht Silikonpaste fixiert, so dass das Zentrum des Deckgläschens durchgängig für den Laserstrahl und auch durchsichtig für den Betrachter bzw. die Mikroskopkamera blieb. Auf die Endothelzellen wurden je nach Versuchsbedingung 200 µl Medium (mit oder ohne Reagentien) und 10 µl der

Mikroperlen-Suspension appliziert und für 45 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger vorsichtig ins Mikroskop eingespannt, die Ebene fokussiert und der Laserstrahl ca. 4 sek. auf die gebundenen Mikroperlen gerichtet, um ihre Haftung zu prüfen. Lose Mikroperlen sprangen in den Laserfokus und verließen so die fokussierte Ebene, feste Mikroperlen dagegen ließen sich nicht bewegen und blieben an ihrem Platz (siehe Abb. 3).

Bei den Versuchen unter Druckbedingungen wurden die Deckgläschen in eine Metallkammer, die wie die Objektträger ebenfalls ein Loch im Boden hat, eingelegt und wieder mit Silikonpaste über dem Loch fixiert. Die Kammer wurde anschließend je nach Versuchsbedingung mit 5 ml Medium und 30 µl der Mikroperlen-Suspension gefüllt und mit einem durchsichtigen Plexiglasdeckel luftblasenfrei verschlossen. Über einen Seitport wurde ein mit Medium gefüllter Silikonschlauch angeschlossen, um den hydrostatischen Druck von 15 cm Wassersäule applizieren zu können. Dieses System wurde vorsichtig auf dem Mikroskop der Laserpinzette installiert. Die Messungen erfolgten nach 45 min Inkubationszeit bei RT in bestehendem System. Pro Messung wurden 100 Mikroperlen ausgezählt und deren Bindungseigenschaft über den prozentualen Anteil der Mikroperlen, die sich nicht durch den Laserstrahl von der Zelloberfläche lösen ließen, quantifiziert.

2.7 Rho A- und Rac 1-Aktivierungsassay

Die Aktivierungsraten von Rho-GTPasen wurden mittels GLISA (= GTPase-linked Immunosorbent Assay) bestimmt. Der GLISA ähnelt im Prinzip dem ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Die Zellen müssen lysiert und die aktiven GTPasen an spezifische Bindungspartner gebunden werden, um anschließend mittels immunenzymatischer Reaktion und Spektrophotometer gemessen werden zu können. Die dafür benötigten GLISA-Kits (Rho A GLISA Activation Assays Biochem KitTM /Rac 1 GLISA Activation Assays Biochem KitTM, beides von Cytoskeleton Inc., Denver CO, USA) wurden exakt nach den Vorgaben des Herstellers benutzt.

MyEnd-Zellen wurden in eine gelatinierte 6-Loch-Platte ausgesät und nach ca. 3 Tagen bei Konfluenz für 45 min mit einem hydrostatischen Druck von 15 cmH₂O ohne Zusatz

von Mediatoren inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen, bevor sie mittels eisgekühltem Lysepuffer und Zellschaber vom Boden der 6-Loch-Platte abgelöst und durch Zentrifugation für 2 min bei 15000 x g und 4°C in Überstand und Sediment aufgetrennt wurden. 10 µl dieses Überstandes wurden zur Messung der Proteinkonzentration aufbewahrt, während der Rest des Lysates sofort bei -70°C eingefroren wurde. Nach Messung der Proteinkonzentration wurden die Zelllysate aufgetaut und jeweils 50 µl davon wurden in die Vertiefungen einer GLISA-Platte, die entweder mit Rho A- oder Rac 1-Bindungsdomänen beschichtet sind, hinzugegeben. Als Positivkontrollen wurden zusätzliche Vertiefungen mit Rac 1- bzw. Rho A-Kontrollprotein sowie Lyse- und Bindungspuffer befüllt. Bei der Negativkontrolle wurden Lyse- und Bindungspuffer in die Vertiefungen gegeben. Anschließend wurde die GLISA-Platte für 30 min bei 400 rpm und 4°C geschüttelt und zweimal mit Waschpuffer bei RT gewaschen. Danach wurden 200 µl Antigen-Präsentations-Puffer in jede Vertiefung hinzu gegeben und dort für 2 min bei RT belassen.

Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden 50 µl des Rho A oder Rac 1 Erstantikörpers (1:200 verdünnt in Antikörper Verdünnungspuffer) in jede Vertiefung appliziert und die GLISA-Platte 45 min bei RT auf einem Microplatten-Orbitalschüttler bei 400 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Vertiefungen dreimal gewaschen, bevor sie mit 50 µl des HRP (=horse radish peroxidase)-gebundenen Zweitantikörpers (1:100 verdünnt) für einen Zeitraum von 45 min bei 400 rpm und RT inkubiert wurden. Nach wiederholtem dreimaligem Waschen wurden 50 µl der HRP Detektionslösung, welche im Wesentlichen aus Luminol und H₂O₂ besteht, für 15 min bei 37°C zugegeben. Die durch HRP katalysierte Chemolumineszenz-Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl HRP-Stopplösung beendet und direkt im Anschluss mittels eines Mikroplattenspektrometers (Sunrise, Tecan GmbH, Crailsheim Germany) bei 490 nm gemessen. Die Ergebnisse wurden mittels Microsoft Excel ausgewertet.

2.8 cAMP-ELISA

Zur Quantifizierung der intrazellulären cAMP-Konzentration wurde ein kommerziell erhältlicher cAMP-ELISA (Biomol, Germany) nach exakten Anweisungen des

Herstellers verwendet. Dieser Versuchssatz funktioniert nach dem Prinzip eines kompetitiven ELISA: ein Polyklonaler Antikörper bindet auf kompetitive Weise cAMP aus den Zelllysaten und cAMP, das mit Alkalischer Phosphatase assoziiert ist.

PSEC wurden in eine gelatinierte 6-Loch-Platte ausgesät und nach ca. 4-5 Tagen bei Konfluenz für 45 min mit einem hydrostatischen Druck von 15 cmH₂O ohne Zusatz von Mediatoren inkubiert. Nach Absaugen des Mediums und Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 200 µl 0,1M HCl für 10 min inkubiert. Durch Zugabe von HCl wird einerseits die Lyse gestartet, andererseits wird die Aktivität endogener Phosphodiesterasen gehemmt. Anschließend wurden die gewonnenen Zelllysate bei > 600 x g für 5 min bei RT zentrifugiert und 100 µl des entstandenen Überstandes zu mit garb-IgG beschichteten Vertiefungen gegeben. Danach wurden je 50 µl eines cAMP-Konjugats (= Lösung aus Alkalischer Phosphatase konjugiert mit cAMP) und einer Lösung eines gegen cAMP gerichteten Kaninchen-Antikörpers hinzu gegeben und die Vertiefungen für 2 h auf einem Mikroplattenschüttler bei 500 rpm und RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 200 µl Waschlösung wurden die Vertiefungen für weitere 60 min mit 200 µl *p*-NPP-Substrat (Lösung von *p*-Nitrophenolphosphat in Puffer) inkubiert. Im Anschluß wurde die Reaktion mit je 50 µl Stopp-Lösung gestoppt und die Platte sofort mittels eines Mikroplattenspektrometers (Sunrise, Tecan GmbH, Crailsheim) bei 405 nm ausgewertet. Mittels einer Standardkurve konnte die gemessene optische Dichte in cAMP Konzentrationen umgerechnet werden. Die cAMP-Konzentration (in pmol/l) der jeweiligen Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt und in Relation zu den cAMP-Konzentrationen der Druckversuche betrachtet. Je höher die gemessene Absorption war, desto geringer war die cAMP-Konzentration der Probe (Prinzip des Verdrängungsassays).

2.9 Angaben zur Statistik

Unterschiede der Perlenhaftung zwischen verschiedenen Versuchsansätzen wurden anhand eines zweiseitigen "student's T-Test" (Microsoft ExcelTM) beurteilt. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

In Anknüpfung an die vorhergehenden Arbeiten wurde zu weiteren Untersuchungen des Effektes von physiologischem hydrostatischen Druck auf die endotheliale Integrität eine immortalisierte mikrovaskuläre endotheliale Zelllinie aus dem Myokard der Maus (myocardial endothelial cells= MyEnd cells) verwendet. Diese Zelllinie wurde gewählt, da die Regulation der Endothelbarriere bei der Entzündungsreaktion vor allem in mikrovaskulären Endothelien eine große Rolle spielt. Darüberhinaus haben murine immortalisierte Zellen den Vorteil, bis zu 20 Passagen lang kultiviert werden zu können und bieten die Möglichkeit, mit Endothelzellen von Mausmutanten zu arbeiten. Die makrovaskulären PSEC-Zellen aus dem Truncus pulmonalis des Hausschweins wurden als nicht immortalisierte Primärkultur von Endothelzellen zum Vergleich verwendet. Die meisten Vorarbeiten in der Literatur und in unserem Labor wurden mit Zellen dieser Herkunft durchgeführt. Für jedes einzelne Experiment wurden verschiedene Passagen von MyEnd-Zellen und Präparationen von PSEC verwendet.

3.1 Einzeldruckversuche

3.1.1 Hydrostatischer Druck verhindert den Effekt extrazellulärer Ca^{2+} -Depletion auf die VE-Cadherin-Lokalisation

Im mikrovaskulären MyEnd-Zellverband ließ sich VE-Cadherin in der Immunfluoreszenz deutlich sichtbar darstellen und zeigte eine kontinuierliche Verteilung entlang der Zellgrenzen (Abb. 4a). Depletion von extrazellulärem Ca^{2+} durch EGTA (3 mM für 45 min) führte zu einem Verlust des VE-Cadherins an den Junctionen und einer diffusen Immunreaktion im Zytoplasma der Zellen. Die vorher deutlich dargestellte Zellmembran ließ sich nicht mehr abgrenzen (Abb. 4b). In parallelen Experimenten wurden MyEnd-Zellen für 45 min einem physiologischen hydrostatischen Druck von 15 cmH₂O (= cmMedium) mit und ohne EGTA (3mM) ausgesetzt. In 41 von 50 Einzelexperimenten simultaner Applikation konnte der Effekt von EGTA auf die VE-Cadherin-Immunlokalisation durch hydrostatischen Druck fast vollständig verhindert werden (Abb. 4c).

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass weder EGTA noch hydrostatischer Druck (mit und ohne EGTA) die Verteilung des Tight Junction-Moleküls Claudin 5 beeinflussen (Abb. 4d-f; n= 4).

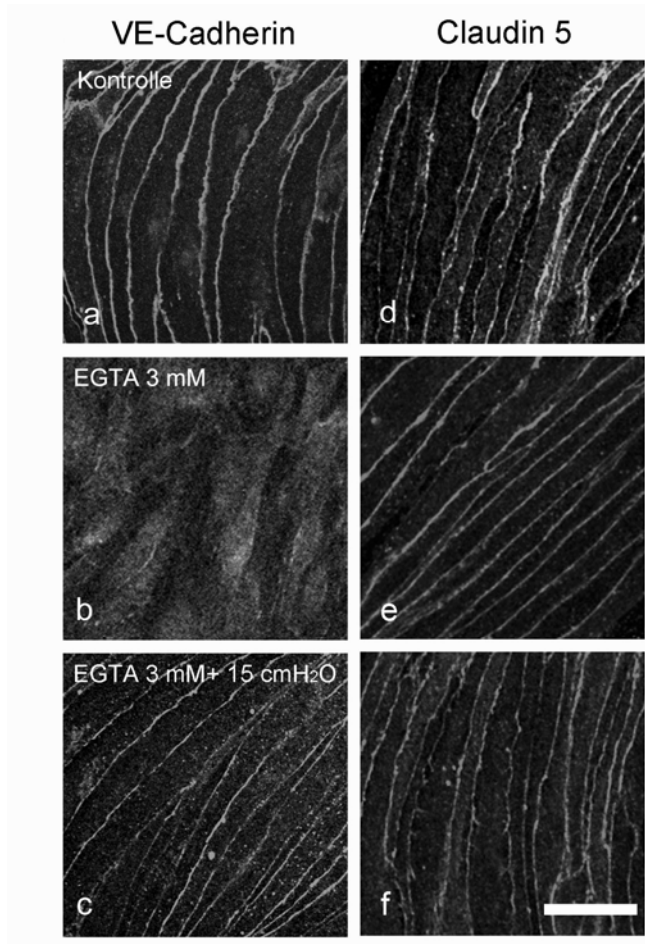


Abb. 4. Effekte von extrazellulärer Ca^{2+} -Depletion auf die Lokalisation von VE-Cadherin (a-c) und Claudin 5 (d-f) in An- und Abwesenheit von hydrostatischem Druck. Unter Kontrollbedingungen war VE-Cadherin kontinuierlich entlang der Zelljunctionen lokalisiert (a). Extrazelluläre Ca^{2+} -Depletion durch EGTA führte zu einem Verlust der Immunfärbung entlang der Junctionen und einer komplett diffusen Immunfärbung (b). Hydrostatischer Druck (15 cmH_2O) blockierte diesen Effekt fast vollständig in 41 von 50 Experimenten (c). Dagegen beeinflussten weder EGTA noch hydrostatischer Druck die Verteilung von Claudin 5 (n= 4) (d-f). Messbalken = 12 μm für a-f (modifiziert nach Mueller-Marschhausen et al)

Auch in 7 von 8 Vorinkubationen (Präkonditionierung) der MyEnd-Zellen mit 15 cmH_2O Druck für 45 min und anschließender Zugabe von EGTA (3 mM für 45 min) unter Kontrollbedingungen konnte ein protektiver Effekt auf die Membranlokalisierung von VE-Cadherin beobachtet werden (Abb. 5).

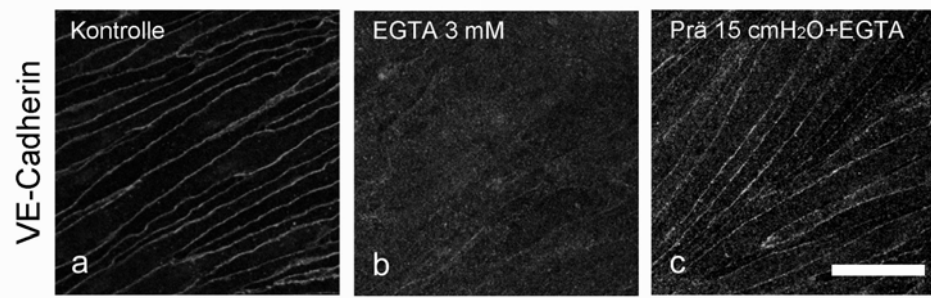


Abb. 5. Effekte von extrazellulärer Ca^{2+} -Depletion auf die Lokalisation von VE-Cadherin (a-c) mit und ohne Vorinkubation mit hydrostatischem Druck. Unter Kontrollbedingungen war VE-Cadherin kontinuierlich entlang der Zelljunctionen lokalisiert (a). Extrazelluläre Ca^{2+} -Depletion durch EGTA führte zu einem Verlust der Junctionen u. einer komplett diffusen Immunfärbung (b). Eine Vorbehandlung der MyEnd-Zellen mit 15 cmH₂O für 45 Minuten u. anschließender 45 minütiger Inkubation mit EGTA ohne Druckapplikation verhinderte ebenfalls die Dislokation von VE-Cadherin in 7 von 8 Experimenten (c). Messbalken = 20 μm für a-f, (modifiziert nach Mueller-Marschhausen et al.)

Vergleichende Experimente mit 7 Tage lang kultivierten, hochkonfluenten MyEnd-Zellen ergaben gleiche Ergebnisse und konnten Effekte ausschließen, die von der Kulturdauer und dem Konfluenzgrad abhängen (Abb. 6).

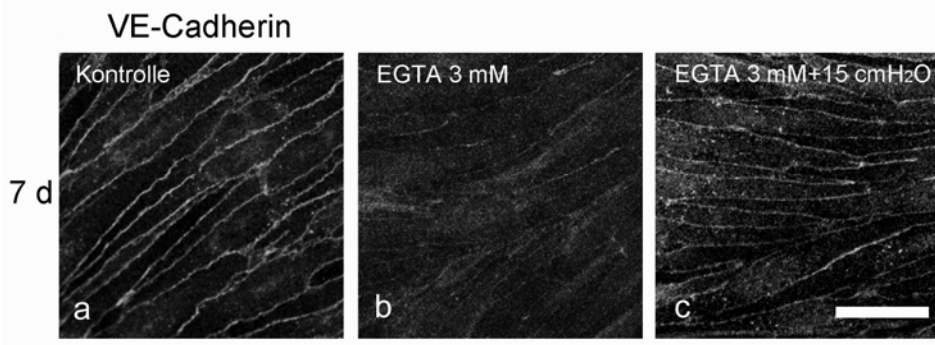


Abb. 6. Effekte von extrazellulärer Ca^{2+} -Depletion auf die Lokalisation von VE-Cadherin (a-c) in An- u. Abwesenheit von hydrostatischem Druck in 7 Tage lang kultivierten, hochkonfluenten MyEnd-Zellen. Unter Kontrollbedingungen war VE-Cadherin kontinuierlich entlang der Zelljunctionen lokalisiert (a). Extrazelluläre Ca^{2+} -Depletion durch EGTA führte zu einer komplett diffusen Immunfärbung und einem Verlust der junctionalen Immunlokalisation von VE-Cadherin (b). Hydrostatischer Druck (15 cmH₂O) für 45 Minuten verhinderte die Dislokation von VE-Cadherin (c) (n= 4). Messbalken = 12 μm für a-c, (modifiziert nach Mueller-Marschhausen et al.)

3.1.2 Hydrostatischer Druck inhibiert die durch Cytochalasin D ausgelöste Actindepolymerisation und interzelluläre Lückenbildung

Unter Kontrollbedingungen bildeten MyEnd-Zellen einen regelmäßigen einschichtigen Zellrasen mit einer Vielzahl parallel zur Zellachse ausgerichteter Actin-Stressfasern aus (Abb. 7 a-c). Die Organisation des Actinzytoskeletts blieb auch unter hydrostatischem Druck (15 cmH₂O für 45 min) unverändert (nicht gezeigt).

Inkubation der MyEnd-Zellen mit Cytochalasin D (10 µM für 45 min) führte zu einer Dissoziation der Zellen sowie zu einem kompletten Zusammenbruch der Stressfasern und Fragmentierung des peripheren Actinbandes (Abb. 7 e). Dort, wo das periphere Actinband fehlte, kam es zu interzellulärer Lückenbildung (Abb. 7 d/e, Pfeile, n= 13).

Bei gleichzeitiger Applikation von hydrostatischem Druck und Cytochalasin D, wurden diese Effekte größtenteils verhindert. In 8 von 13 Experimenten kam es zu einer deutlichen Reduktion der interzellulären Lückenbildung sowie der Fragmentierung des peripheren Actinbandes, während der Zusammenbruch der Stressfasern nur partiell verhindert wurde (Abb. 7 h). Die VE-Cadherin Färbung blieb weitestgehend kontinuierlich. Dennoch traten unter Druckbedingungen noch vereinzelte Lücken auf, was daraufhin weist, dass die Effekte von Cytochalasin D nicht komplett durch Druck inhibiert werden (Abb. 7 g/i, Pfeile). Gleiche Ergebnisse wurden bei Vorinkubation der MyEnd-Zellen mit 15 cmH₂O für 45 min und anschließender Applikation von Cytochalasin D (45 min ohne Druck) erzielt (nicht gezeigt, n= 3).

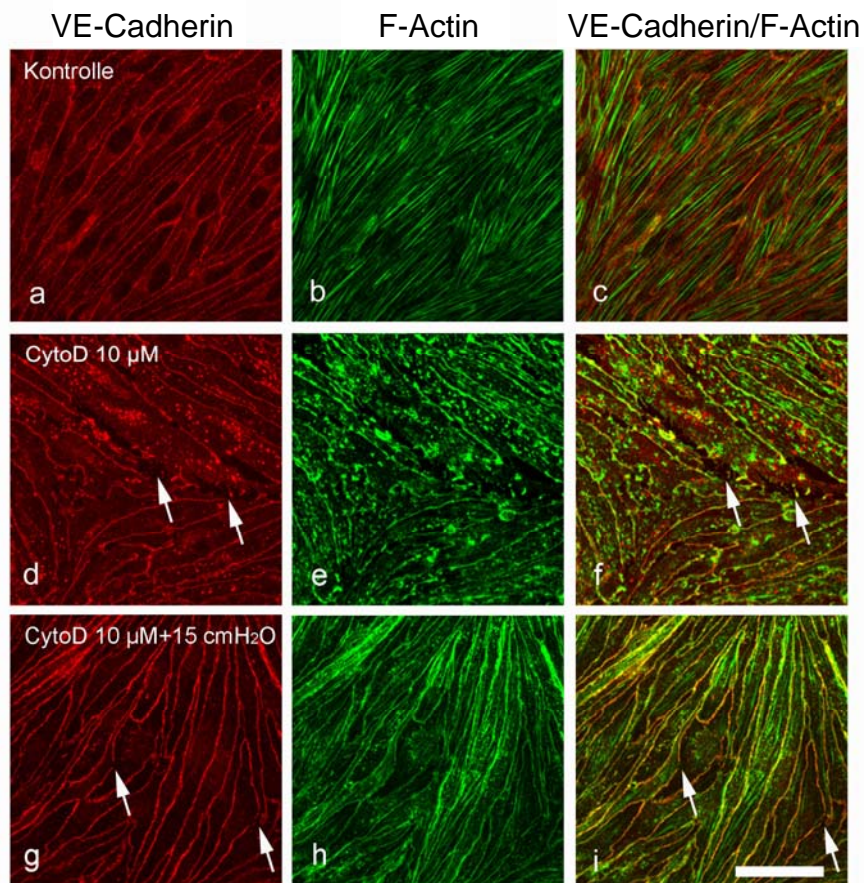


Abb. 7. Einfluss der Actin-Depolymerisation auf die Integrität des endothelialen Zellverbands in An- und Abwesenheit von hydrostatischem Druck. Immunfärbung der MyEnd-Zellen für VE-Cadherin (a/d/g) oder Färbung von F-Actin (b/e/h). Unter Kontrollbedingungen bildeten MyEnd-Zellen intakte Zellverbände (a-c) mit zahlreichen Stressfasern im Zytoplasma (b), VE-Cadherin war kontinuierlich entlang der Zelljunctionen lokalisiert (a). Cytochalasin D verursachte interzelluläre Lückenbildung (Pfeile in d), Fragmentierung des peripheren Actinbandes (Pfeile in f) u. Verlust von Stressfasern (e). Hydrostatischer Druck verhinderte die Lückenbildung u. Actinfragmentierung in 8 von 13 Experimenten (g-i), wobei unter diesen Konditionen noch vereinzelt Lücken gefunden wurden (Pfeile g/i).
Messbalken = 20 μm für a-i, (modifiziert nach Mueller-Marschhausen et al.)

3.1.3 Hydrostatischer Druck verhindert Zellablösung nach Ca^{2+} /Calmodulin- Inhibition

Im Vergleich zu Kontrollen (Abb. 8 a/b) verursachte der Ca^{2+} /Calmodulin-Inhibitor TFP (100 μM für 45 min) einen Zusammenbruch der VE-Cadherin-Verteilung und eine Reduktion von Stressfasern (Abb. 8 c/d, Pfeile). Dies führte zur Bildung großer interzellulärer Lücken, bis hin zu kompletter Ablösung ganzer Zellareale vom Deckgläschen. Diese TFP-induzierte Zelldissoziation und Ablösung konnte durch

gleichzeitige Applikation von hydrostatischem Druck von 15 cmH₂O (45 min) in 10 von 11 Experimenten fast vollständig unterdrückt werden (Abb. 8 e/f).

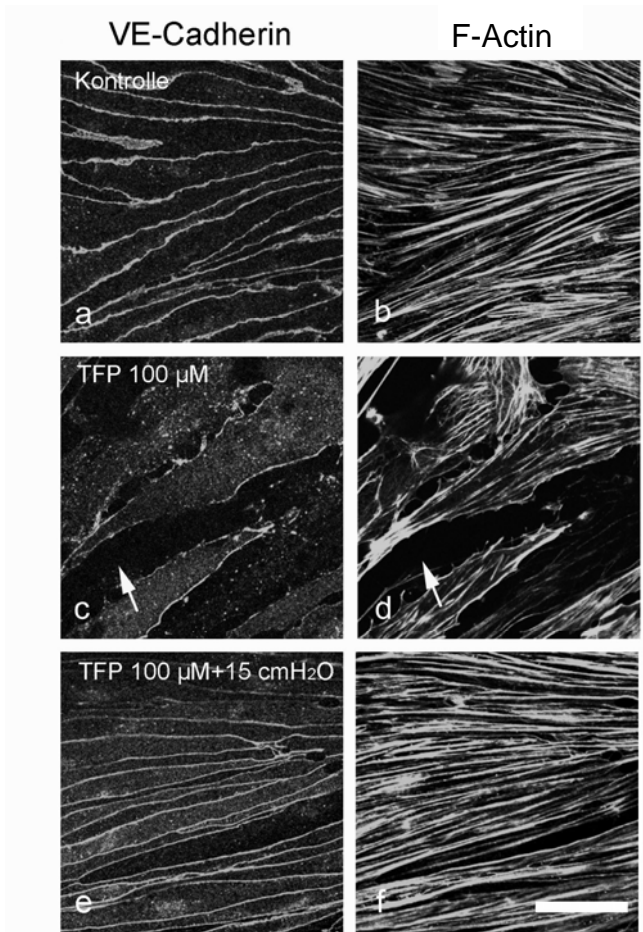


Abb. 8. Einfluss von Ca²⁺/Calmodulin-Inhibition auf die Integrität des endothelialen Zellverbands in An- und Abwesenheit von hydrostat. Druck. Immunfärbung der MyEnd-Zellen für VE-Cadherin- (a/c/e) und F-Actin-Färbung (b/d/f). Unter Kontrollbedingungen bildeten MyEnd-Zellen intakte Zellverbände (a/b) mit zahlreichen Stressfasern im Zytoplasma aus (b), VE-Cadherin war kontinuierlich entlang der Zelljunctionen lokalisiert (a). TFP führte zu interzellulärer Lückenbildung, Ablösung der Zellen und Reduktion der Stressfasern (Pfeile c/d). Hydrostat. Druck (15 cmH₂O) verhinderte die Lückenbildung fast vollständig in 10 von 11 Experimenten (e/f).

Messbalken = 12 µm für a-f
(modifiziert nach
Mueller-Marschhausen et al.)

3.1.4 Hydrostatischer Druck wirkt sich auch protektiv auf die Integrität makrovaskulärer Endothelzellen aus

Die gezeigten Ergebnisse weisen daraufhin, dass physiologischer hydrostatischer Druck *in vitro* die Integrität des mikrovaskulären Zellverbands vor unterschiedlichen destabilisierenden Stimuli schützt. Um auszuschließen, dass dieser protektive Effekt auf den Immortalisationsprozess der MyEnd-Zellen zurückzuführen ist, wurden alle Experimente unter selben Bedingungen mit Primärkulturen von PSEC wiederholt. Unter

Kontrollbedingungen wuchsen PSEC pflastersteinartig und bildeten einen lückenlosen Zellrasen. VE-Cadherin ließ sich in der Immunfluoreszenz darstellen und war kontinuierlich entlang der Zelljunctionen verteilt (Abb. 9 a). Unter Druckbedingungen (5 oder 15 cmH₂O) zeigten sich in der Immunfluoreszenz keine Veränderungen der VE-Cadherin-Verteilung oder der Intensität der Immunfärbung (nicht gezeigt). Hydrostatischer Druck (15 cmH₂O für 45 Minuten) blockierte auch hier den durch EGTA (3 mM) hervorgerufenen Membranverlust der VE-Cadherin-Immunfärbung in 12 von 24 Experimenten (Abb. 9 b und c), ebenso wie die durch Cytochalasin D (100 nM) hervorgerufene Zelldissoziation in 9 von 12 Experimenten (Abb. 9 d-f, Pfeile) und die durch TFP (100 µM) induzierte Lückenbildung in allen 5 Experimenten (Abb. 9 g-i, Pfeile). Bereits unter einem niedrigeren Druck von 5 cmH₂O konnten die Effekte von EGTA (nicht gezeigt) und Cyto D (Abb. 9 e) effektiv reduziert werden, nicht aber die Effekte von TFP (Abb. 9 h).

In den aufgeführten Experimenten wurden Mediatoren verwendet, die bekanntermaßen die Endothelbarriere stören, jedoch in vivo keine Rolle spielen. Um einen Bezug zu physiologischen Verhältnissen herzustellen, wurde geprüft, ob hydrostatischer Druck auch die Effekte von Thrombin beeinflusst. Dieser Versuch wurde nur mit PSEC durchgeführt, da MyEnd-Zellen nicht auf Thrombinstimulation ansprechen. Thrombin ist ein pathophysiologischer Mediator, der bei der Blutgerinnung gebildet wird und die Endothelpermeabilität durch interzelluläre Lückenbildung erhöht.

Unter Kontrollbedingungen induzierte Thrombin (10 U/ml) nach einer Inkubationszeit von 15 min die Ausbildung multipler interzellulärer Lücken (Abb. 9 j).

Nach Vorbehandlung des PSEC-Zellverbands mit hydrostatischem Druck von 5 oder 15 cmH₂O für 45 min zeigte sich dagegen nach 15 minütiger Inkubation mit Thrombin eine reduzierte interzelluläre Lückenbildung. Jedoch konnten die Effekte von Thrombin nicht komplett unterdrückt und in manchen Arealen noch Lücken gefunden werden (Abb. 9, Pfeile k und l).

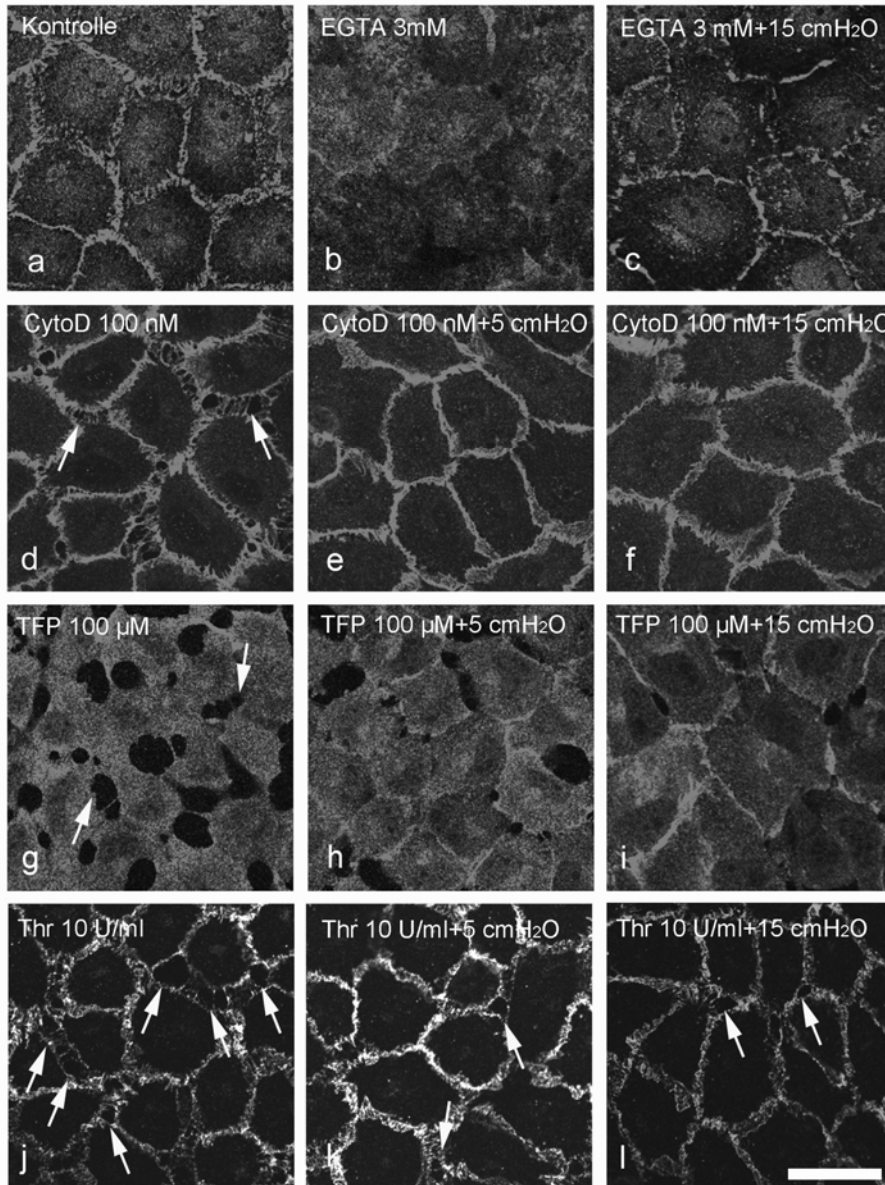


Abb. 9. Einfluss von hydrostatischem Druck auf die Zellverbandintegrität in makrovaskulärem Endothel. In den PSEC wurde VE-Cadherin durch Immunfärbung dargestellt. Unter Kontrollbedingungen bildeten PSEC intakte Zellverbände mit kontinuierlicher Lokalisation von VE-Cadherin entlang der Zelljunktions (a). Extrazelluläre Ca^{2+} -Depletion durch EGTA führte zu einer diffusen Immunfärbung (b). Dies konnte durch hydrostatischen Druck fast vollständig blockiert werden (c). Durch Cytochalasin D induzierte interzelluläre Lückenbildung (d) konnte durch hydrostatischen Druck von 5 u. 15 cmH_2O in 9 von 12 Experimenten inhibiert werden (e und f). TFP verursachte interzelluläre Lückenbildung (g), welche ebenfalls teilweise durch 5 cmH_2O (h) u. fast vollständig durch 15 cmH_2O (i) verhindert wurde. Thrombin-induzierte Lückenbildung (j) konnte durch Vorbehandlung der Zellen mit hydrostatischem Druck (5 u. 15 cmH_2O) in 8 von 13 Experimenten reduziert, aber nicht vollständig verhindert werden (Pfeile k und l). Messbalken = 20 μm für a-l. (modifiziert nach Mueller-Marschhausen et al.)

3.1.5 Hydrostatischer Druck schützt den Cadherin-Catenin-Komplex

Um den Mechanismus der Dislokation von VE-Cadherin genauer zu verstehen, wurde in weiteren Versuchen der Einfluss von hydrostatischem Druck auf β -Catenin bzw. den Cadherin-Catenin-Komplex untersucht. Unter Kontrollbedingungen war β -Catenin in PSEC wie VE-Cadherin kontinuierlich entlang der Zelljunctionen verteilt (Abb. 10 a-c). Depletion der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch EGTA (3mM für 45 min) führte nicht nur zu einem Verlust von VE-Cadherin (Abb. 10 d und f) aus den Junctionen, sondern auch zu einer Dislokation von β -Catenin mit einer diffusen zellulären Immunfärbung (Abb. 10 e und f). Die Zelljunctionen ließen sich in der Immunfluoreszenz nicht mehr abgrenzen. Unter hydrostatischem Druck dagegen war neben VE-Cadherin (Abb. 10 g und h) auch β -Catenin in 4 von 6 Experimenten vermehrt entlang der Zelljunctionen verteilt (Abb. 10 h und i).

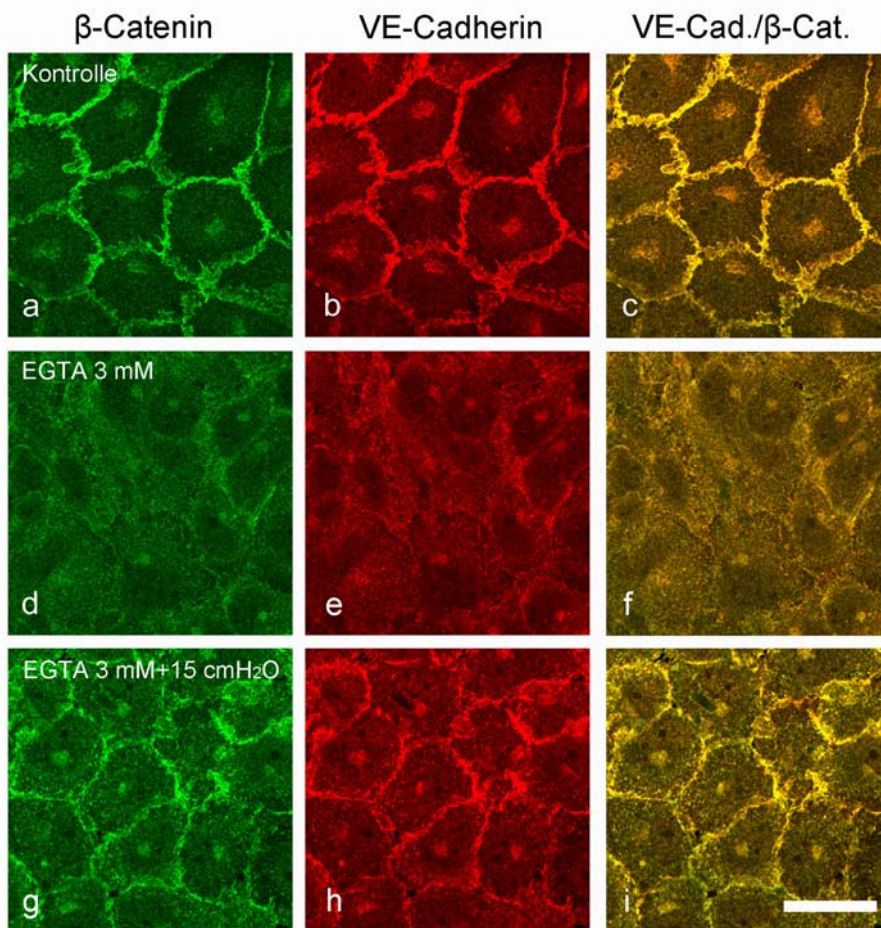


Abb. 10. Einfluss von Ca^{2+} -Depletion durch EGTA auf den Cadherin/Catenin-Komplex in makrovaskulären Endothelzellen (PSEC). Unter Kontrollbedingungen war sowohl VE-Cadherin als auch β -Catenin kontinuierlich entlang der Zelljunctionen lokalisiert (a und b). Ca^{2+} -Depletion führte neben einem Verlust von VE-Cadherin aus den Junctionen (d und f), auch zu einer Dislokation von β -Catenin mit einer diffusen Immunfärbung (e und f). Hydrostatischer Druck reduzierte diesen Effekt in 4 von 6 Experimenten (g-i). Messbalken = 20 μm für a-i, (modifiziert nach Mueller-Marschhausen et al.)

TFP und Cytochalasin D wirkten auf β -Catenin ebenfalls ähnlich wie auf VE-Cadherin. Durch hydrostatischen Druck konnte die Dissoziation von β -Catenin verhindert und die Integrität des endothelialen Zellverbands aufrechterhalten werden (nicht gezeigt).

3.2 Kontinuierliche Druckversuche

Die oben beschriebenen Einzeldruckversuche sind statische Modelle und repräsentieren immer genau einen bestimmten Druckwert, nicht aber wieviel hydrostatischer Druck exakt notwendig ist, um einen protektiven Effekt zu erzielen. Um dies herauszufinden, wurden die Versuche in einem kontinuierlichen Druckmodell mit einem Druckgradienten von 0-15 cmH₂O wiederholt. Hierbei wurden die mit Endothelzellen bewachsenen Objektträger aufrecht in einer mit Kulturmedium gefüllten Messzylinder platziert, so dass der hydrostatische Druck von allen Seiten auf die Endothelzellen einwirkte. Dadurch konnte auch ein möglicher Einfluss minimaler druckinduzierter Verformungen des Kulturträgers ausgeschlossen werden. Zusätzlich konnten die Effekte unterschiedlicher Druckwerte direkt miteinander verglichen werden.

3.2.1 Der protektive Effekt von hydrostatischem Druck steigert sich bis 15 cmH₂O

Schon bei einem hydrostatischen Druck von 1 cmH₂O konnten leichte druckprotektive Veränderungen sowohl in MyEnd-Zellen (nicht gezeigt) als auch in PSEC beobachtet werden. Die durch EGTA (Abb. 11 a und b) hervorgerufene Dislokation von VE-Cadherin war weniger ausgeprägt, zum Teil konnten Membranabschnitte abgegrenzt werden, in denen VE-Cadherin sich nicht aus den Zelljunctionen gelöst hatte (Abb. 11 b-i). Dieser druckprotektive Effekt prägte sich mit steigender Wassersäule stärker aus, wobei 5 cmH₂O (Abb. 11 f) die Auswirkungen von EGTA in MyEnd-Zellen fast so effektiv blockierten wie 15 cmH₂O (Abb. 11 i). Diese Ergebnisse zeigen, dass es beim hydrostatischen Druck keinen bestimmten Schwellenwert gibt, der überschritten werden muss, um den protektiven Mechanismus auszulösen.

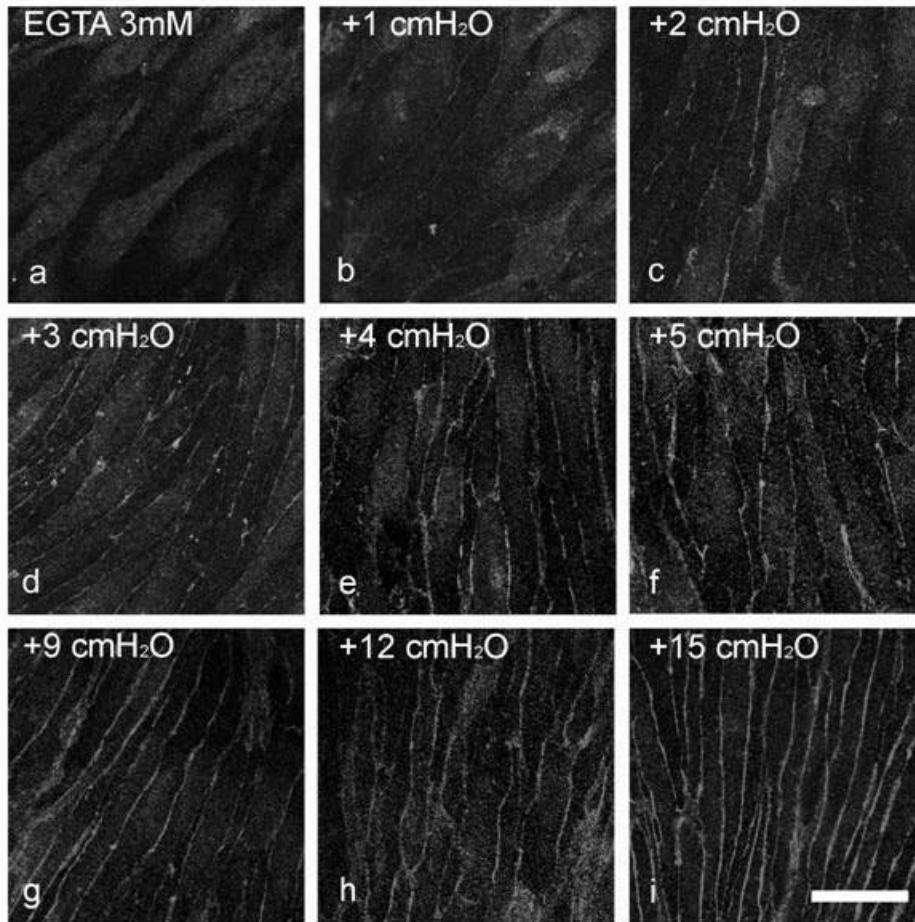


Abb. 11. Effekte von hydrostatischem Druck von 0-15 cmH₂O auf MyEnd-Zellen bei gleichzeitiger Inkubation mit EGTA über 45 Minuten. VE-Cadherin ist durch Immunfärbung dargestellt. Extrazelluläre Ca²⁺-Depletion durch EGTA führte zu einer vollständig diffusen Immunfärbung bei einem hydrostatischen Druck <1 cmH₂O (a). Hydrostatischer Druck blockierte den Verlust von VE-Cadherin aus den Zelljunctionen partiell schon ab 1 cmH₂O (b). Der druckprotektive Effekt steigerte sich mit zunehmender Wassersäule bis 15 cmH₂O in 7 von 9 Experimenten (c-i).
Messbalken = 12 µm für a-i, (modifiziert nach Mueller-Marschhausen et al.)

3.3 Laserpinzetten-Versuche

Die beschriebenen Experimente zeigen, dass hydrostatischer Druck die Zelldissoziation und den Verlust einer kontinuierlichen VE-Cadherin-Lokalisation entlang der Zelljunctionen blockiert. Um den direkten Einfluss von hydrostatischem Druck auf die homophile Bindung von VE-Cadherin zu untersuchen, wurde die Bindung VE-Cadherin-beschichteter Mikroperlen in An- und Abwesenheit von 15 cmH₂O mittels Laserpinzette quantifiziert. Da das rekombinante VE-Cadherin aus der Maus keine

Perlenhaftung an den PSEC-Zellen vermitteln konnte (VE-Cadherin vom Schwein), wurden die Experimente nur mit MyEnd-Zellen durchgeführt.

3.3.1 Hydrostatischer Druck blockiert den Verlust der VE-Cadherin-Adhäsion

Übereinstimmend mit Ergebnissen der vorhergehenden Untersuchungen, banden unter Kontrollbedingungen ca. 70-80% der beschichteten Mikroperlen fest auf der Zelloberfläche und konnten nicht vom Laserstrahl verschoben werden (Golenhofen et al., 2002; Waschke et al., 2006). Diese Anzahl wurde auf 100% normiert. Extrazelluläre Ca^{2+} -Depletion durch EGTA (3mM für 45 Minuten) reduzierte den Anteil der gebundenen Mikroperlen auf 54 +/- 2% der Kontrolle (Abb. 12). Dieser Effekt konnte durch einen hydrostatischen Druck von 15 cmH₂O in 12 von 15 Experimenten signifikant verringert werden (91 +/- 5% gebundene Mikroperlen der Kontrolle). Auch Actindepolymerisation durch Cytochalasin D (10 μM für 45 min) führte zu einem signifikanten Verlust der gebundenen Mikroperlen auf 62 +/- 4% der Kontrolle. Unter hydrostatischem Druck konnte die Haftung in 5 von 7 Experimenten signifikant verbessert werden (84 +/- 4% blieben fest auf der Zelloberfläche gebunden und konnten durch den Laserstrahl nicht verschoben werden). TFP (100 μM für 45 min) verringerte die Zahl der gebundenen Mikroperlen auf 76 +/- 7% der Kontrolle. Dieser Adhäsionsverlust konnte durch hydrostatischen Druck in 8 von 11 Experimenten vollständig verhindert werden (97 +/- 2% der Kontrolle) (Abb. 12).

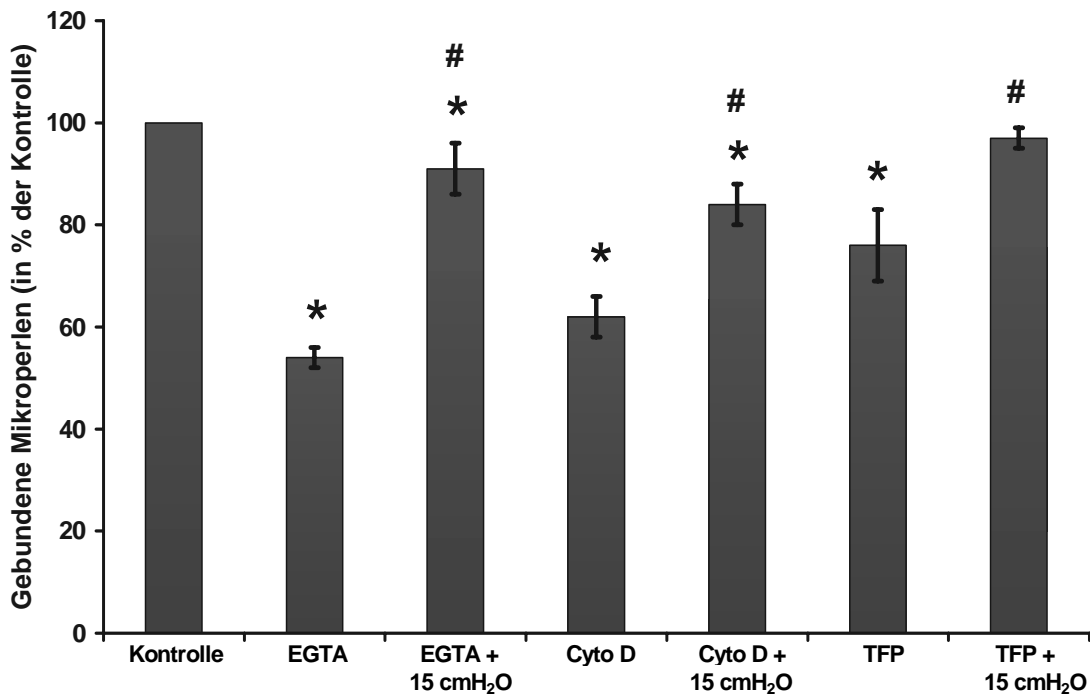


Abb. 12. Einfluss von hydrostatischem Druck auf die VE-Cadherin-vermittelte Adhäsion getestet mit der Laserpinzette. Unter Kontrollbedingungen banden ca. 70-80% der mit rekombinanten VE-Cadherin beschichteten Mikroperlen fest an die Zelloberfläche u. ließen sich durch den Laserstrahl nicht dislozieren. EGTA, Cytochalasin D u. TFP führten zu einem signifikanten Verlust der Perlenadhäsion. Diese Effekte wurden durch hydrostatischen Druck (15 cmH₂O) signifikant reduziert. Werte +/- Standardabweichung. *Signifikante Veränderung im Vgl. zur Kontrolle (p<0.05). #Signifikante Veränderung im Vgl. zu Experimenten mit gleichem pharmakologischem Mediator in Abwesenheit von hydrostatischem Druck (p<0.05). (modifiziert nach Mueller-Marschhausen et al.)

3.4 Mechanismen der Druckprotektion

3.4.1 Die Rolle von Caveolin-1

In der Literatur wird berichtet, dass Caveolae eine Rolle bei der Registrierung von zyklischer Dehnung in vaskulären glatten Muskelzellen spielen (Sedding et al., 2005). Um herauszufinden, ob Caveolae auch in den oben beschriebenen druckprotektiven Mechanismus involviert sind, wurden die Einzeldruckversuche mit Zellen einer Caveolin-1-defizienten (Caveolin-1^{-/-}) MyEnd-Zelllinie durchgeführt, die bereits in unserem Labor etabliert und charakterisiert wurde (Waschke et al., 2006).

In Caveolin-1^{-/-}-MyEnd-Zellen verursachte EGTA (3mM für 45 Minuten) wie in normalen MyEnd-Zellen eine Dislokation von VE-Cadherin mit diffuser Immunfärbung

(Abb. 13 a und b). Unter hydrostatischem Druck von 15 cmH₂O blieb der in normalen MyEnd-Zellen beobachtete druckprotektive Effekt jedoch aus (Abb. 13 c, n= 6). Diese Ergebnisse geben einen ersten Hinweis darauf, dass Caveolin-1 und/oder Caveolae möglicherweise in die druckinduzierten Signalwege der Endothelzellen involviert sind.

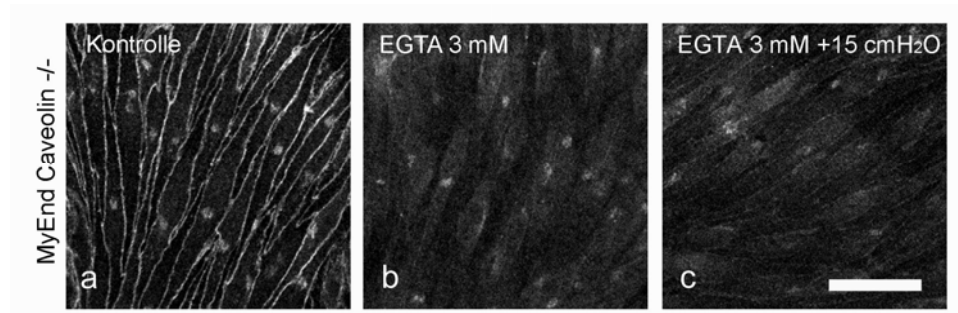


Abb. 13. Der Effekt von hydrostatischem Druck erfordert die Expression von Caveolin-1. VE-Cadherin wurde in MyEnd Cav-1^(-/-)-Zellen durch Immunfärbung dargestellt. Unter Kontrollbedingungen war VE-Cadherin kontinuierlich entlang der Zelljunctionen lokalisiert (a). Extrazelluläre Ca²⁺-Depletion durch EGTA unter Kontrollbedingungen verursachte eine vollständig diffuse Immunfärbung (b). Im Gegensatz zu MyEnd-Wildtyp-Zellen wurde der Effekt von EGTA in Caveolin-1-defizienten Zellen unter hydrostatischem Druck nicht blockiert (c).

Messbalken = 20 µm für a-c, (modifiziert nach Mueller-Marschhausen et al.)

3.4.2 Die Rolle von Rho A und Rac 1

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse, besteht außerdem die Möglichkeit, dass hydrostatischer Druck Signalwege aktiviert, welche das Actinfilamentsystem stabilisieren. Die Mitglieder der Rho-GTPasen, und hier insbesondere Rho A und Rac 1, sind bekanntermaßen Schlüsselregulatoren sowohl der endothelialen Adhäsion als auch des endothelialen Zytoskeletts (Wojciak-Stothard und Ridley, 2003; Vandenbroucke et al., 2008). Um ihre Rolle bei der Vermittlung des druckprotektiven Effekts näher definieren zu können, wurde die Aktivität von Rac 1 und Rho A in MyEnd-Zellen vor und nach Applikation von hydrostatischem Druck mittels GLISA bestimmt. Hierbei zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede der Rho A- und Rac 1-Aktivität zwischen Kontroll- bzw. Druckbedingungen (Abb. 14; n= 3).

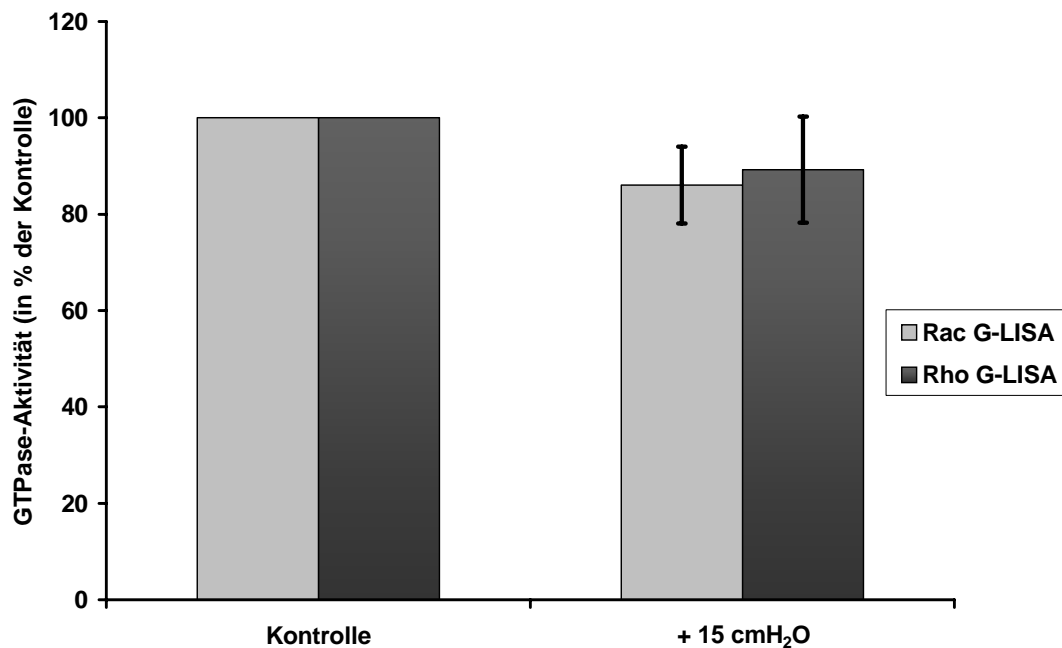


Abb. 14. GLISA-Messungen der Aktivität von Rho A und Rac 1 unter Kontroll- und Druckbedingungen. Nach 45 minütiger Exposition der Endothelzelle mit 15 cmH₂O zeigte sich keine signifikante Veränderung der GTPasen-Aktivität (dargestellt als % der Kontrolle).

3.4.3 Die Rolle von cAMP

Auch cAMP ist bekanntermaßen ein Botenstoff, der in stabilisierende Mechanismen des Endothels involviert ist.

Um herauszufinden, ob der protektive Effekt durch Druck cAMP-abhängig vermittelt werden könnte, wurden Druckversuche mit PSEC ohne Zugabe von Mediatoren durchgeführt und anschließend die cAMP-Spiegel bestimmt. Hierbei ergaben sich jedoch keine durch hydrostatischen Druck veränderten cAMP-Konzentrationen im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Abb. 15; n= 3).

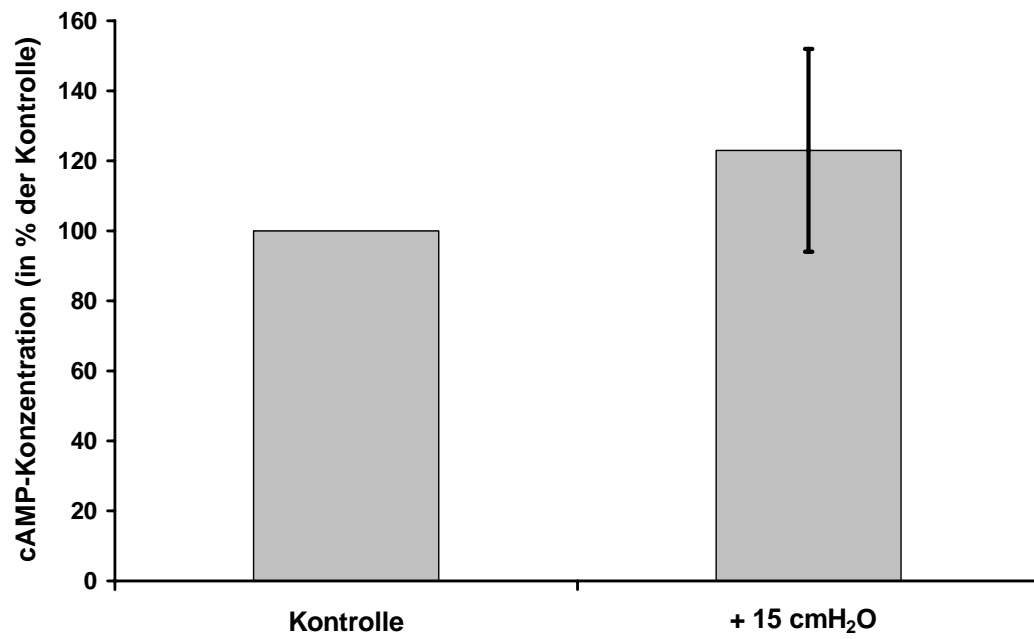


Abb. 15. ELISA-Messungen der cAMP-Konzentration unter Kontroll- und Druckbedingungen. Nach 45 minütiger Exposition der Endothelzellen mit 15 cmH₂O zeigte sich keine signifikante Veränderung der cAMP-Konzentration (dargestellt als % der Kontrolle).

4. Diskussion

4.1 Hydrostatischer Druck schützt die endotheliale Integrität

Das Ziel der Arbeit war, die Rolle von hydrostatischem Druck bei der Aufrechterhaltung der Zellverband-Integrität in mikrovaskulären (MyEnd-Zellen) und makrovaskulären Endothelzellen (PSEC) zu untersuchen. In vorhergehenden Studien konnte gezeigt werden, dass EGTA-vermittelte Ca^{2+} -Depletion, Cytochalasin D-induzierte Actindepolymerisation und TFP-vermittelte Inhibition der Ca^{2+} /Calmodulin-Funktion die Integrität des einschichtigen endothelialen Zellverbands unter Kontrollbedingungen, d.h. in Abwesenheit von hydrostatischem Druck, zerstören (Wilke, 1987; Suttorp et al., 1989; Schnittler et al., 1990).

Die im Ergebnisteil beschriebenen Untersuchungen ergaben, dass ein hydrostatischer Druck von 15 cmH₂O, wie er typischerweise im Kapillarbett der Mikrostrombahn herrscht, ausreichend ist, den durch extrazelluläre Ca^{2+} -Depletion hervorgerufenen Verlust von VE-Cadherin an den Zellgrenzen sowohl in mikrovaskulären als auch in makrovaskulären Endothelzellen weitgehend zu unterdrücken. Ebenfalls waren die interzelluläre Lückenbildung in Folge einer Actindepolymerisation durch Cytochalasin D sowie die durch TFP induzierte Zellablösung unter Druckbedingungen reduziert. Darüberhinaus konnte durch Experimente mit der Laserpinzette gezeigt werden, dass hydrostatischer Druck auch die VE-Cadherin-Bindung beeinflusst. Unter Druckbedingungen wurden der durch EGTA und TFP hervorgerufene Verlust der VE-Cadherin-vermittelten Adhäsion komplett und die Effekte von Cytochalasin D teilweise inhibiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hydrostatischer Druck die durch VE-Cadherin vermittelte Adhäsion sowohl gegen den Einfluss extra- als auch intrazellulärer destabilisierender Stimuli schützt.

4.1.1 Hydrostatischer Druck verhindert den junktionalen Verlust von VE-Cadherin durch extrazelluläre Ca^{2+} -Depletion

VE-Cadherin vermittelt homophile interzelluläre Bindungen in den endothelialen Adhärens-Junktionen und ist wichtig für die endotheliale Barrierefunktion in vivo und in vitro (Dejana et al., 2008; Corada et al., 1999; Gotsch et al., 1997; Hordijk et al., 1999; Lampugnani et al., 1992).

Extrazelluläres Ca^{2+} ist notwendig, um die Integrität des endothelialen Zellverbands zu erhalten. Unter anderem sind millimolare Konzentrationen von extrazellulärem Ca^{2+} erforderlich, um die Ektodomäne von VE-Cadherin zu stabilisieren und die homophile Bindung von VE-Cadherin im interzellulären Spalt zu ermöglichen (Baumgartner et al., 2000; Vincent et al., 2004).

Unter Kontrollbedingungen führte eine extrazelluläre Ca^{2+} -Depletion durch EGTA in MyEnd-Zellen zu einem kompletten Verlust der Immunfärbung von VE-Cadherin entlang der Zelljunktionen und gleichzeitig auch zu einer verminderten VE-Cadherin vermittelten Adhäsion (Baumgartner et al., 2003). Auch in Messungen mit AFM (atomic force microscopy)-Technik konnte gezeigt werden, dass bei extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen unter 0.5 mM eine Transinteraktion von VE-Cadherin nicht mehr möglich ist (Baumgartner et al., 2000).

In den vorliegenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass hydrostatischer Druck von 5-15 cmH₂O die junktionale Dislokalisierung von VE-Cadherin und die Zelldissoziation nach extrazellulärer Ca^{2+} -Depletion verhindert.

In Westernblot-Analysen konnte ausgeschlossen werden, dass hydrostatischer Druck Einfluss auf die Expression von VE-Cadherin nimmt. Aber selbst wenn die Druckexposition die Synthese und den Membraneinbau von VE-Cadherin gesteigert hätte, wäre es kaum erklärbar, warum VE-Cadherin in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} eine transzelluläre Haftung vermitteln sollte. Unsere Untersuchungen mit der Laserpinzette ergaben allerdings den erstaunlichen Befund, dass mit VE-Cadherin beschichtete Mikroperlen in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} an der Zelloberfläche der druckexponierten MyEnd-Endothelzellen hafteten, während sie an nicht druckexponierten Endothelzellen nicht mehr hafteten.

Da die Transinteraktion von Cadherinen bei Ca^{2+} -Depletion nicht möglich ist, muß man annehmen, dass hydrostatischer Druck die Oberflächenexposition von Membran-

proteinen vermittelt, die heterophil an VE-Cadherin in Abwesenheit von Ca^{2+} binden können. Mögliche Kandidaten wären die endothelialen Proteine PECAM-1, Nectin oder JAMs (= junction-associated adhesion molecule).

Es wurde beobachtet, dass die Barriereigenschaften in MyEnd-Zellen von ihrem Reifegrad abhängig sind (Baumgartner et al., 2004). MyEnd-Zellen, die bis zu 5 Tage nach Konfluenz (entspricht 7-8 Tage nach Aussaat) kultiviert wurden, zeigten zunehmend Resistenz gegenüber verschiedenen Barriere-destabilisierenden Stimuli (Baumgartner et al., 2004). Um ein unterschiedliches, vom Reifegrad des Zellrasens abhängiges Ansprechen auf den hydrostatischen Druck auszuschließen, wurden die Druckversuche vergleichend mit für 3 Tage und 7 Tage alten Endothelzellkulturen durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass der druckprotektive Effekt nicht von der Kulturdauer und somit auch nicht von eventuellen Unterschieden im Reifegrad der Endothelzellmonolagen abhängig ist.

Auch die Möglichkeit, dass Tight Junctions eine Rolle bei der Stabilisierung von VE-Cadherin in der Membran spielen, sollte in der Arbeit überprüft werden. In der Literatur besteht die Hypothese, dass Adhärens-Junktionen und Tight Junctions miteinander verbunden sind und sich sogar in ihrer Organisation beeinflussen. So wurden typische Tight Junction Proteine wie ZO-1 während der frühen Phase der Junktionsbildung in Adhärens-Junktionen nachgewiesen (Drenckhahn und Ness, 1997; Itoh et al., 1993). Gezeigt wurde auch, dass in einigen Zellen die korrekte Organisation der Tight Junctions von der Ausbildung von Adhärens-Junktionen abhängt (Behrens et al., 1985). Diese Befunde weisen auf die besondere Beziehung der beiden Zellkontaktformen hin. In dieser Arbeit bewirkte hydrostatischer Druck aber keine vermehrte junktionale Rekrutierung von Claudin 5, dem Hauptadhäsionsprotein der Tight Junctions in Endothelzellen. Eine druckvermittelte Stabilisierung von VE-Cadherin durch kompensatorische Verstärkung der Tight Junctions scheint somit eher unwahrscheinlich.

Die druckvermittelten Phänomene könnten möglicherweise auch dadurch erklärt werden, dass hydrostatischer Druck oder sein mechanisches Signal die zytoskelettale

Verankerung von VE-Cadherin stabilisiert und dadurch dessen Verlust durch laterale Diffusion aus den Junctionen verhindert (Baumgartner und Drenckhahn, 2002a; Baumgartner und Drenckhahn, 2002b).

Nach einer Modell-Vorstellung wird VE-Cadherin durch β -Catenin an α -Catenin geknüpft, welches wiederum mit Actin und Actin-bindenden Proteinen wie Vinculin, α -Actinin oder Formin-1 eine Bindung eingeht. Diese zytoskelettale Verankerung des Cadherin-Catenin-Komplex scheint zur Stabilität der Adhärens-Junctionen und der Zelle im Allgemeinen beizutragen (Aberle et al., 1994; Ben-Ze'ev und Geiger, 1998). Darüberhinaus scheint β -Catenin eine regulatorische Rolle in der Cadherin-vermittelten Adhäsion zu spielen (Huber et al., 2001) und auch transkriptionale und signalgebende/-weiterleitende Aktivität zu besitzen (Ben-Ze'ev und Geiger, 1998; Gottardi und Gumbiner, 2001). In der Doppel-Immunfluoreszenz waren VE-Cadherin und β -Catenin unter Kontrollbedingungen entlang der Junctionen kolokalisiert. Nach extrazellulärer Ca^{2+} -Depletion (45 Minuten) zeigte sich eine diffuse Färbung, was für einen Zusammenbruch des Cadherin/Catenin-Komplexes und eine Dislokation der beiden Komponenten spricht.

Nach gleichzeitiger 45 minütiger Druckapplikation jedoch war sowohl der junctionale Verlust von VE-Cadherin als auch von β -Catenin blockiert. Möglicherweise stärkt hydrostatischer Druck direkt oder über bestimmte Signalwege die Verankerung von VE-Cadherin durch β -Catenin im Zytoskelett und stabilisiert so die Adhärenskontakte. In zukünftigen Studien sollte auch untersucht werden, ob PECAM, Nectin oder JAMs unter Druckbedingungen bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen transzelluläre Bindungen mit VE-Cadherin eingehen können.

4.1.2 Hydrostatischer Druck inhibiert Actindepolymerisation, interzelluläre Lückenbildung und Ablösung der Zellen

Die beschriebenen Experimente zeigen, dass eine interzelluläre Lückenbildung durch den Ca^{2+} /Calmodulin-Inhibitor TFP oder als Folge der Actindepolymerisation durch Cytochalasin D unter hydrostatischem Druck reduziert wird.

Die Möglichkeit, dass der hydrostatische Druck Transportmechanismen (u.a. Membrantransporter) aktiviert, die TFP und Cytochalasin D aus der Zelle entfernen,

scheint unwahrscheinlich, da gezeigt werden konnte, dass TFP einen durch intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung induzierten Anstieg der Permeabilität in PSEC unter hydrostatischem Filtrationsdruck von 10 cmH_2O verhinderte (Schnittler et al., 1990).

4.2 Vergleich mit anderen Studien

4.2.1 In vitro-Studien zur Bedeutung des hydrostatischen Drucks

In zwei Publikationen (Acevedo et al., 1993; Salwen et al., 1998) wurde berichtet, dass PSEC, die bis zu 7 Tage lang unter 8-12 mmHg (= 10,9 bis 16,4 cmH_2O) kultiviert wurden, mit einer Elongation der Zellen und einer Bildung eines mehrschichtigen Zellverbands reagieren. Sumpio et al. (1994) haben beobachtet, dass Endothelzellen aus der Rinderaorta, die für 9 Tage arteriellen hydrostatischen Drücken zwischen 80-100 mmHg (= 109,1 bis 136,4 cmH_2O) ausgesetzt wurden, ebenfalls mit einer Zell-elongation reagierten; die Bildung eines mehrschichtigen Zellverbands fand jedoch nicht statt.

Kürzlich publizierte Studien berichten über eine vermehrte Stressfaserbildung und eine Fragmentierung der VE-Cadherin-Immunfärbung entlang der Zellgrenzen in Endothelzellen aus der Rinderaorta, die einem hydrostatischen Druck von 100 mmHg (136,4 cmH_2O) über 24 Stunden ausgesetzt waren (Ohashi et al., 2007; Sato und Ohashi, 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnten unter den beschriebenen Bedingungen dagegen keinerlei Veränderungen der Zellform und Schichtigkeit in den untersuchten mikro- und makrovaskulären Endothelzellen festgestellt werden. Auch zeigte sich weder in mikro- noch in makrovaskulären Zellen unter Druckbedingungen eine vermehrte Stressfaserbildung oder ein verändertes Muster der VE-Cadherin-Lokalisation im Vergleich zu Kontrollzellen.

4.2.2 In vivo-Studien zur Bedeutung von extrazellulärem Ca^{2+}

Die Untersuchungsergebnisse zeigen einen protektiven Einfluss von hydrostatischem Druck auf die Integrität des endothelialen Zellverbands gegenüber verschiedenen

Bedingungen, die die Endothelbarriere herabsetzen. Da Zellkulturuntersuchungen in der Regel nicht unter physiologischem hydrostatischen Druck durchgeführt werden, könnten die Ergebnisse dieser Arbeit dazu beitragen, verschiedene widersprüchliche Ergebnisse von in vivo-Untersuchungen an Endothelzellen und Blutgefäßen neu zu bewerten. Beispielsweise konnte wiederholt gezeigt werden, dass eine extrazelluläre Ca^{2+} -Depletion in vitro zu einem Permeabilitätsanstieg mit Lückenbildung im Endothelzellrasen führt. In vivo zeigte sich jedoch, dass die Funktion der Endothelbarriere in mesenterialen und muskulären Mikrogefäßen nicht auf eine extrazelluläre Ca^{2+} -Depletion durch Verwendung Ca^{2+} -freier Lösungen oder niedriger EGTA-Konzentrationen reagiert (Curry et al., 1973; He und Curry, 1993). Dagegen kommt es im Endothel der Lungenkapillaren durch extrazellulären Ca^{2+} -Entzug ebenfalls unter in vivo-Bedingungen zur Lückenbildung zwischen den Endothelzellen (Gao et al., 2000).

Die Ergebnisse der vorhergehenden Arbeit unterstützen jedoch die Hypothese, dass kultivierte Endothelzellen einen Phänotyp ausbilden könnten, der nicht in allen Aspekten repräsentativ für die Endothelzellen intakter Gefäße ist (Curry, 2002). Bei Diskrepanzen von Ergebnissen vergleichender in vivo- und in vitro-Studien sollte folglich der Einfluss physiologischer mechanischer Bedingungen, wie z.B. hydrostatischer Druck oder auch Flüssigkeitsscherstress (Franke et al., 1984), berücksichtigt werden.

4.3 Signalweg der Mechanotransduktion

Unter physiologischen Bedingungen sind Endothelzellen verschiedenen mechanischen Kräften wie Flüssigkeitsscherstress, zyklischer Dehnung und hydrostatischem Druck ausgesetzt. Die genauen Mechanismen, wie diese mechanischen Reize in biochemische Signale transduziert werden und so eine zelluläre Antwort und Anpassung an die umgebenden Reize auslösen können, sind erst in den Anfängen bekannt. Bei der zellulären Wahrnehmung von Scherstress und zyklischer Dehnung spielen dehnungsabhängige Ionenkanäle eine Rolle (Tzima, 2006). Bei hydrostatischer Druckapplikation findet jedoch keine Verformung der Zellen statt, so dass andere

Mechanismen der Mechanotransduktion in Erwägung gezogen werden müssen.

4.3.1 Caveolin-1-defiziente Endothelzellen

Untersuchungen von Caveolin-1 defizienten Mäusen haben gezeigt, dass Caveolin-1 eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung und Vermittlung von zyklischer Dehnung in vaskulären glatten Muskelzellen spielt (Sedding et al., 2005). Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit die Druckversuche mit einer im Labor generierten Caveolin-1-defizienten MyEnd-Zelllinie wiederholt. Es zeigte sich, dass hydrostatischer Druck keine Resistenzsteigerung der Caveolin-1 defizienten Endothelzellen gegenüber extrazellulärer Ca^{2+} -Depletion und Applikation von Cytochalasin D und TFP vermittelte. Daraus kann gefolgert werden, dass Caveolin-1 und Caveolae bei der Mechanotransduktion des hydrostatischen Drucks eine Rolle spielen, entweder als Sensorstrukturen oder als Strukturen der druckvermittelten Signalwege.

Neben Caveolin-1 scheinen auch $\alpha_v\beta_3$ -Integrine, c-Src-Kinasen und PI3-K/Akt bei der Mechanotransduktion von zyklischer Dehnung in vaskulären glatten Muskelzellen involviert zu sein (Sedding et al., 2005). Eine Beteiligung von Akt bei der Mechanotransduktion von Druck in Endothelzellen wurde durch die Anwendung des Akt-Inhibitors Deguelin geprüft. Da Druck auch in Anwesenheit von Deguelin einen protektiven Effekt auf die endotheliale Integrität bewirkte, scheint die druckvermittelte Mechanotransduktion über einen Akt-abhängigen Signalweg eher unwahrscheinlich zu sein (nicht gezeigte Ergebnisse).

Da Caveolin-1 und Caveolae anscheinend an der Vermittlung des hydrostatischen Drucks beteiligt sind, sollten weitere Caveolin-abhängige Signalwege untersucht werden. Caveolin-1 stabilisiert die Caveolae, die eine Vielzahl lipid-modifizierter Moleküle beherbergen, so dass sich auch eine Vielzahl an möglichen Molekülen ergibt, die an der Vermittlung des protektiven Druckeffekts beteiligt sein könnten.

Ein mögliches Enzym, das an der Vermittlung des druckprotektiven Effekts beteiligt sein könnte, ist die endotheliale NO-Synthetase (= eNOS). Diese produziert Stickoxid (= Nitric oxide= NO), ein membrangängiges, reaktives Gas, das an der Regulation der

Endothelbarriere und des vaskulären Gefäßtonus beteiligt ist (Predescu et al., 2005). Darüberhinaus wirkt es antithrombotisch und antiatherogetisch. In Studien konnte gezeigt werden, dass höhere NO-Spiegel einerseits für eine gesteigerte Permeabilität der endothelialen Barriere erforderlich sind (Michel und Curry, 1999 ;Bucci et al., 2005; Hatakeyama et al., 2006; Kubes, 1995). Andererseits gibt es auch Untersuchungen, die nach Inhibition der eNOS eine gesteigerte Permeabilität mit Öffnung der interendothelialen Kontakte beobachtet haben (Predescu et al., 2005; Rumbaut et al., 1995). NO übt also eine kritische Funktion auf das Endothel aus: Stabilisierung der Barriere bei physiologischen Konzentrationen und Destabilisierung der Barriere bei erhöhten Konzentrationen (Vandenbroucke et al., 2008).

Die eNOS-Aktivität und damit die NO-Spiegel können durch verschiedene vasoaktive Substanzen, wie Vascular endothelial growth factor (= VEGF), Bradykinin, Acetylcholin oder Adenosin gesteigert werden. Diese Agonisten führen zu einer Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die ihrerseits die eNOS und damit die NO-Produktion stimuliert (Govers und Rabelink, 2001). NO seinerseits ist ein wichtiger Kofaktor der gesteigerten Permeabilität (Bucci et al., 2005; Hatakeyama et al., 2006). Die durch NO geförderte Permeabilitätssteigerung scheint vor allem über eine Aktivierung einer von cGMP-abhängigen Phosphodiesterase vermittelt zu werden, die eine Senkung des cAMP-Spiegels bewirkt (Michel und Curry, 1999). Daneben gibt es andere Signalwege, die die eNOS Aktivität beeinflussen können.

Außer durch vasoaktive Substanzen kann die endotheliale NO-Produktion auch durch verschiedene mechanische Kräfte, wie Scherstress oder zyklische Dehnung, stimuliert werden (Awolesi et al., 1994; Corson et al., 1996). Durch den Blutfluß induzierter Scherstress zählt sogar zu den potentesten Stimuli der NO-Produktion. Shaul et al. (2002) konnten zeigen, dass diese mechanische Aktivierung der eNOS unabhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und Calmodulin-Bindung zu sein scheint. Vielmehr wurde gezeigt, dass Scherstress eine eNOS-Phosphorylierung bzw. deren Aktivierung über einen PI3K/Akt-abhängigen Signalweg induzieren könnte (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999; Go et al., 2001). Darüberhinaus scheint Scherstress auch die Assoziation von eNOS und Caveolin-1 zu beeinflussen und auf diesem Wege die eNOS aktivieren zu können (Rizzo et al., 1998).

Die in der vorliegenden Doktorarbeit durchgeführten Inhibitionsexperimente von eNOS

durch L-NAME (=N-nitro-L-arginine methyl ester) ergaben aber keinen Hinweis darauf, dass eNOS an der Signaltransduktion des druckprotektiven Mechanismus beteiligt ist (nicht gezeigt, n= 3).

Diese Experimente schließen auch unsere Arbeitshypothese aus, dass Mikrogasbläschen aus NO an der Vermittlung des druckprotektiven Effektes beteiligt sind: Durch die kontinuierlichen Druckversuche wurde weitgehend ausgeschlossen, dass druckabhängige Deformationen an der Mechanotransduktion beteiligt sind. Deshalb haben wir die Hypothese aufgestellt, dass kleine intrazelluläre Stickstoff-Gasblasen als Sensor für hydrostatischen Druck fungieren könnten. Für diese Hypothese spricht, dass Gasblasen, im Gegensatz zu Flüssigkeiten, dem Boyle-Mariotteschen Gesetz und druckabhängigen Volumenänderungen unterliegen. Über diesen Mechanismus könnten Gasbläschen eine mechanische Spannung an der caveolären Membran verursachen und somit als Sensor weitere Signalwege regulieren. Als Gasquelle erschien uns NO möglich, u.a. auch weil die eNOS an der Caveola-Membran lokalisiert ist und durch diese reguliert wird (Bucci et al., 2000).

4.3.2 PKC

Einige Studien berichten, dass Proteinkinase C (= PKC) durch verschiedene mechanische Stimuli wie zyklische Dehnung, Scherstress oder Druck aktiviert werden kann (Ali et al., 2006; Ni et al., 2003; Watson, 1991) und bestimmte zelluläre Antworten auslöst. In der Literatur sind 12 verschiedene PKC-Isoformen beschrieben (Yuan, 2002), die in 4 Klassen unterteilt werden: die klassischen PKC-Isoformen, die als Ca²⁺-unabhängige und Phorbolster-responsive Enzyme gelten; die 2. und 3. Klasse beinhalten „neuere“ PKC-Isoformen und „atypische“ PKC-Isoformen, die Ca²⁺-unabhängig und nicht Phorbolster-responsiv sind (Vandenbroucke et al., 2008; Newton, 1995).

Scherstress aktiviert unter anderem die Bildung von Diacylglycerol, einem Aktivator der PKC. Die aktivierte PKC kann anschließend eine zytoskelettale Reorganisation vermitteln (Girard und Nerem, 1993) und die Endothelin-1 Produktion (Kuchan und Frangos, 1993) und die Expression von PDGF (= platelet-derived growth factor) (Biswas et al., 1995) stimulieren. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass auch die

Scherstress-induzierte Aktivierung von ERK1/2 über PKC vermittelt wird. ERK 1 und ERK 2 gehören zur Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (= MAPK) und können bekanntermaßen die zelluläre Physiologie und Genexpression auf unterschiedliche Weise modulieren (Pelech und Sanghera, 1992; Schweighofer et al., 2007; Yuan, 2002).

Um zu untersuchen, ob hydrostatischer Druck über einen PKC-abhängigen Signalweg eine zelluläre Antwort hervorruft, wurden in der vorliegenden Arbeit Druckversuche mit EGTA bei gleichzeitiger Applikation des PKC-Inhibitors Chelerythrin durchgeführt. Vorläufige Ergebnisse dieser Experimente gaben jedoch keinen Hinweis darauf, dass der druckprotektive Effekt über einen PKC-abhängigen Signalweg vermittelt wird.

4.3.3 Rho A und Rac 1

Es ist bekannt, dass das Junctions-assoziierte Actinfilamentsystem (= JAF) dazu beiträgt, die Integrität des Endothelzellverbands aufrecht zu halten, indem es die Zellkontakte der Endothelzelle stabilisiert, u.a. durch Immobilisierung und Aggregation von Adäsionsmolekülen wie VE-Cadherin. Auf der anderen Seite kann Actin-Myosin-Kontraktion die Zellen aktiv auseinander ziehen (Schnittler et al., 1990; Goeckeler und Wysolmerski, 1995). Wahrscheinlich aber nur, wenn die Zelladhäsion geschwächt ist.

Obwohl unter Druckbedingungen in der vorliegenden Arbeit kein offensichtliches Rearrangement des Actinfilamentsystems unter Druckeinfluss durch Phalloidin-fluoreszenz beobachtet wurde, sollte dennoch untersucht werden, ob verantwortliche Signalkaskaden eventuell bereits vor sichtbaren Veränderungen des Actinfilamentsystems durch hydrostatischen Druck aktiviert werden, die zuerst zu einer Stabilisierung und im weiteren zeitlichen Verlauf (> 45 Minuten) schließlich zu einer Umorganisation der Actinfilamente führen könnten.

Für eine druckvermittelte Stabilisierung des Actinfilamentsystems sprechen die Experimente mit Cytochalsin D und TFP. Beide Substanzen führen mittel- bis langfristig zu einer Destabilisierung dynamischer Actinfilamentstrukturen: Cytochalsin D indem es die Polymerisation von Actinfilamenten unterdrückt, so dass das Gleichgewicht zwischen G- und F-Actin zu Gunsten von G-Actin verschoben wird und TFP indem es die Phosphorylierung und Aktivierung von Myosin blockiert und dadurch die Bildung

funktioneller Actomyosin-Strukturen unterdrückt.

Druckvermittelte Signalwege könnten durch Aktivierung von Actin-bindenden Minusend-Cappingproteinen das Actinfilamentsystem stabilisieren und dadurch die Wirksamkeit von TFP und Cytochalasin D auf das Actinfilamentsystem weitgehend außer Kraft setzen.

Wichtige Regulatoren des Zytoskeletts sind die Mitglieder der Rho-GTPasen-Familie Rho A und Rac 1, die sich auch als Schlüsselregulatoren der endothelialen Adhäsion und des endothelialen Zytoskeletts erwiesen haben. So konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Inhibition von Rho A (Holinstat et al., 2006), als auch eine Aktivierung von Rac 1 die endotheliale Barriere stabilisieren (Bustelo et al., 2007; Waschke et al., 2006; Adamson et al., 2002). Hydrostatischer Druck könnte daher möglicherweise Rac 1 aktivieren, was die Verankerung zwischen VE-Cadherin und dem Actinzytoskelett reguliert und so zur Stabilisierung der endothelialen Barriere beiträgt (Waschke et al., 2004).

In vielen Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass die Mitglieder der kleinen GTPasen-Familie auch bei der endothelialen Mechanotransduktion von hydrodynamischem Scherstress eine Rolle spielen. Ein geläufiges Erklärungsmodell besagt, dass Scherstress Integrine aktiviert, die an die Extrazelluläre Matrix gebunden sind. Diese sind in der Lage die Aktivität von Rho A und Rac 1 zu beeinflussen. Rho A vermittelt initial die durch Scherstress induzierte Polarisierung und Retraktion und schließlich die Elongation der Endothelzelle (Wojciak-Stothard und Ridley, 2003). Darüberhinaus hat Rho A Effekte auf die Scherstress-induzierte Genexpression (Li et al., 1999) sowie die interzelluläre Adhäsion (Dudek und Garcia, 2001).

Das ebenfalls durch Flüssigkeitsscherstress über Integrine aktivierte Rac 1 reguliert die zytoskelettale Reorganisation als Anpassung an die Flussrichtung der Flüssigkeit (Birukov et al., 2002). Darüberhinaus vermittelt die durch Scherstress induzierte Aktivierung von Rac 1 auch die Stärkung der endothelialen Barriere (Shikata et al., 2005). Wie Rho A hat auch Rac 1 Effekte auf die Genexpression (Tzima et al., 2002).

Um zu untersuchen, ob die stabilisierenden Mechanismen von hydrostatischem Druck über Rho-GTPasen vermittelt werden, wurde die Aktivität von Rho A und Rac 1 nach Druckapplikation durch GLISA bestimmt. Hierbei ergab sich jedoch keine signifikante druckabhängige Beeinflussung der Rho A- oder Rac 1-Aktivität. Zukünftig sollte in

weiterführenden Studien untersucht werden, inwieweit Integrine (Jalali et al., 2001), Intermediärfilamente (Li et al., 1997) und andere kleine GTPasen wie Cdc 42 (Li et al., 1999) oder Ras (Li et al., 1996), die alle an der Reizweiterleitung von Scherstress beteiligt zu sein scheinen, auch bei der Mechanotransduktion des hydrostatischen Drucks eine Rolle spielen.

4.3.4 cAMP

In vielen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von cAMP die endotheliale Barriere sowohl *in vivo* als auch *in vitro* stärkt (Stelzner et al., 1989; van Nieuw Amerongen und van Hinsbergh, 2002). Über PKA-abhängige und -unabhängige Signalwege (cAMP-Epac-Rap1) werden unterschiedliche Mechanismen, die teilweise auch die kleinen GTPasen involvieren, aktiviert (Bos, 2003; Birukova et al., 2007).

So werden bei gesteigertem intrazellulären cAMP-Spiegel die Myosin-vermittelte Kontraktion durch Inhibition von Rho A blockiert (Qiao et al., 2003) und die zytoskelettale Reorganisation durch Rac 1-Aktivierung (Baumer et al., 2008) sowie die Umverteilung der junctionalen Komponenten von Adhärens-Junktionen und Tight Junctions vermittelt (Baumer et al., 2008; Cullere et al., 2005; Fukuhara et al., 2005).

Da hydrostatischer Druck ebenfalls einen Barriere-stabilisierenden Mechanismus hervorruft, galt es herauszufinden, ob hydrostatischer Druck zu einem cAMP-Anstieg führt und der druckprotektive Effekt über cAMP-abhängige Signalwege vermittelt wird. Die cAMP-Messungen ergaben jedoch keine druckabhängigen Effekte auf die cAMP-Konzentration. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Boo et al., die 2002 zeigen konnten, dass Scherstress die Aktivität der PKA stimuliert und eine eNOS-Phosphorylierung verursacht (Boo et al., 2002), scheinbar ohne jedoch die endotheliale cAMP-Konzentration zu beeinflussen (Malek et al., 1993). Da bis dato aber eine Aktivierung der PKA immer cAMP-abhängig zu sein schien, wurde spekuliert, dass Scherstress die cAMP-Spiegel in bestimmten subzellulären Kompartimenten steigert, ohne dass die gesamte zelluläre cAMP-Konzentration dadurch verändert wird. Eine weitere Möglichkeit könnte darin bestehen, dass PKA nicht über einen cAMP-abhängigen Signalweg, sondern über PI3K/PDK1 (= Phosphatidylinositol-dependent

kinase) aktiviert wird (Go et al., 2001). Auch die Ergebnisse der cAMP-Messung unter Druckbedingungen könnten so interpretiert werden. In weiterführenden Studien sollte untersucht werden, welchen Effekt hydrostatischer Druck auf die Funktion von PKA oder PI3K/PDK1 hat.

5. Ausblick

Hämodynamische Kräfte können die Struktur und Funktion der vaskulären Endothelzellen modulieren. Unter normalen Konditionen ermöglichen diese modulierenden Einflüsse eine optimale Anpassung des vaskulären Endothels an Veränderungen der äußeren mechanischen Stimuli. Das Verständnis, wie ein mechanisches Signal in ein chemisches Signal umgewandelt wird und Mechanismen aktiviert, die die endotheliale Integrität aufrechterhalten, kann dazu beitragen, neue therapeutische Ansätze pathologischer Störungen der endothelialen Permeabilität zu finden.

In weiterführenden Studien sollte die protektive, Caveolin-1-abhängige Stabilisierung von VE-Cadherin durch hydrostatischen Druck näher untersucht werden. Durch Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von VE-Cadherin nach Druck-Exposition könnte man feststellen, ob die druckvermittelten Signalwege direkt am VE-Cadherin angreifen. Darüberhinaus sollte auch die Rolle von NO genauer untersucht werden. Da auch andere Gruppen zeigen konnten, dass die eNOS eine Rolle bei der Mechanotransduktion von Druck in Kokulturen von Endothel- und glatten Muskelzellen spielt (Vouyouka et al., 2006), muss bedacht werden, dass die Blockade der eNOS mit L-NAME unzureichend gewesen sein könnte. Es sollte zusätzlich mit eNOS-Knockout-Modellen oder siRNA gearbeitet werden, um eine mögliche Rolle von NO bei der Mechanotransduktion zu beweisen. Desweiteren sollten die mit eNOS assoziierten Signalwege eingehender untersucht werden. Neben Scherstress scheint auch Druck über einen ERK- und PKC-abhängigen Signalweg die eNOS-Konzentration zu beeinflussen (Vouyouka et al., 2006). Mittels potenter Inhibitoren sollten dieser Signalweg und auch die durch Scherstress induzierte, PI3K/AKT-abhängige Phosphorylierung der eNOS noch einmal unter hydrostatischen Druckbedingungen untersucht werden. Da in

aktuellen Studien gezeigt werden konnte, dass verschiedene Komponenten der endothelialen Glykokalix ebenfalls über einen NO-abhängigen Signalweg mechanische Reize vermitteln könnten (Dull et al., 2007; Pahakis et al., 2007), sollte die Möglichkeit, dass spezifische, mit Caveolae- bzw. Caveolin-1-assoziierte Komponenten der Glykokalix eine Rolle im Signalweg der Druckprotektion spielen, in Erwägung gezogen und überprüft werden. Falls durch diese Untersuchungen eine Beteiligung der eNOS und NO eher unwahrscheinlich zu sein scheint, sollten andere mit Caveolae assoziierte Signalmoleküle untersucht werden.

6. Zusammenfassung

Endothelzellen kleiden als einschichtiger Zellverband die Blutgefäße aus und bilden so eine Barriere zwischen Blut und Interstitium. Der Austausch von Flüssigkeit und Makromolekülen über diese Barriere wird durch die transzelluläre und parazelluläre Permeabilität reguliert. Die parazelluläre Permeabilität ist von der Integrität der interzellulären endothelialen Junctionen abhängig. Eine Schwächung der Adhäsion und Öffnung der Tight Junctions bedingt unweigerlich einen Anstieg der Permeabilität, die bei verschiedenen pathologischen Bedingungen, z.B. inflammatorischen Ödemen und allergischem Schock, lebensbedrohlich werden kann. Unter physiologischen Bedingungen ist das Endothel verschiedenen mechanischen Stimuli wie Scherstress durch den Blutfluß, zyklischer Dehnung durch die Wandspannung und hydrostatischem Druck durch den Blutdruck ausgesetzt.

Da die Effekte des hydrostatischen Drucks auf die Biologie der Endothelzelle weitgehend unverstanden sind, sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des physiologischen hydrostatischen Drucks auf die Integrität des endothelialen Zellverbands näher untersucht werden. Sowohl in mikrovaskulären Endothelzellen als auch in makro-vaskulären Endothelzellen wurde gefunden, dass hydrostatischer Druck von 5-15 cmH₂O, wie er typischerweise in Blutkapillaren in vivo herrscht, einen protektiven Einfluss auf die Endothelbarriere gegenüber permeabilitätssteigernden Einflüssen vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass eine extrazelluläre Depletion von Ca²⁺ durch EGTA zu einem Verlust von VE-Cadherin aus den endothelialen Junctionen

mit Lückenbildung zwischen den Zellen führt (dargestellt durch Immunfluoreszenz) und dass dieser Effekt durch die gleichzeitige Applikation eines hydrostatischen Drucks von 15 cmH₂O weitgehend verhindert werden konnte. Auch die durch Cytochalasin D induzierte Actindepolymerisation und interzelluläre Lückenbildung sowie die Dissoziation der Zellkontakte und Zellablösung nach Zugabe des Ca²⁺/Calmodulin-Antagonisten Trifluperazin und die Thrombin-induzierte Zelldissoziation konnten durch gleichzeitige Druckexposition von 15 cmH₂O inhibiert werden. Darüberhinaus konnte mit Hilfe der Laserpinzetten-Technik gezeigt werden, dass hydrostatischer Druck die Haftung von mit VE-Cadherin beschichteten Mikroperlen an der endothelialen Zelloberfläche sowohl in Abwesenheit von extrazellulärem Ca²⁺ als auch unter Einfluss von Cytochalasin D und Trifluperazin nahezu unvermindert ermöglichte, während ohne hydrostatischen Druck die Mikroperlen unter diesen Bedingungen (Ca²⁺-Depletion, Cytochalasin D, Trifluperazin) nicht mehr hafteten.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde untersucht, welche Mechanismen an den druckvermittelten Signalwegen beteiligt sein könnten. Es ist bekannt, dass cAMP und auch die Mitglieder der Rho-GTPasen-Familie Endothelbarriere-stabilisierende Funktionen haben. Es konnten jedoch keine signifikanten Veränderungen der cAMP-Konzentrationen sowie der Rho A- und Rac 1-Aktivität in makrovaskulären Endothelzellen unter hydrostatischem Druck von 15 cmH₂O innerhalb von 45 Minuten nachgewiesen werden.

Da Caveolin-1 in der Literatur eine Rolle in der Mechanotransduktion von zyklischer Dehnung und Scherstress zugesprochen wird, wurden im Labor generierte Endothelzellen aus Caveolin-1-defizienten Mäusen untersucht. Caveolin-1 stabilisiert plasmalemmale Invaginationen, die Caveolae, die eine Vielzahl an Molekülen mit signalgebenden und -weiterleitenden Funktionen beherbergen. In Caveolin-1-defizienten Endothelzellen war hydrostatischer Druck nicht in der Lage eine Destabilisierung des endothelialen Zellrasens durch Cytochalasin D, Trifluperazin und EGTA zu unterdrücken.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass ein physiologischer hydrostatischer Druck zur Erhaltung der endothelialen Integrität und ihrer Barrierefunktion beiträgt und Caveolin-1-vermittelte Mechanismen bei der Mechanotransduktion des hydrostatischen Drucks eine Rolle spielen.

7. Literaturverzeichnis

- Aberle, H., A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert, and R. Kemler. 1997. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J.* 16:3797-804.
- Aberle, H., S. Butz, J. Stappert, H. Weissig, R. Kemler, and H. Hoschuetzky. 1994. Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci.* 107 (Pt 12):3655-63.
- Acevedo, A.D., S.S. Bowser, M.E. Gerritsen, and R. Bizios. 1993. Morphological and proliferative responses of endothelial cells to hydrostatic pressure: role of fibroblast growth factor. *J Cell Physiol.* 157:603-14.
- Adamson, R.H., B. Liu, G.N. Fry, L.L. Rubin, and F.E. Curry. 1998. Microvascular permeability and number of tight junctions are modulated by cAMP. *Am J Physiol.* 274:H1885-94.
- Adamson, R.H., F.E. Curry, G. Adamson, B. Liu, Y. Jiang, K. Aktories, H. Barth, A. Daigeler, N. Golenhofen, W. Ness, and D. Drenckhahn. 2002. Rho and rho kinase modulation of barrier properties: cultured endothelial cells and intact microvessels of rats and mice. *J Physiol.* 539:295-308.
- Adelstein, R.S., and M.A. Conti. 1975. Phosphorylation of platelet myosin increases actin-activated myosin ATPase activity. *Nature.* 256:597-8.
- Akhtar, N., and N.A. Hotchin. 2001. RAC1 regulates adherens junctions through endocytosis of E-cadherin. *Mol Biol Cell.* 12:847-62.
- Ali, M.H., P.T. Mungai, and P.T. Schumacker. 2006. Stretch-induced phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells: role of mitochondrial oxidants. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 291:L38-45.
- Anastasiadis, P.Z., and A.B. Reynolds. 2001. Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Curr Opin Cell Biol.* 13:604-10.
- Anderson, J.M., and C.M. Van Itallie. 1995. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol.* 269:G467-75.
- Ashkin, A., and J.M. Dziedzic. 1985. Observation of radiation-pressure trapping of particles by alternating light beams. *Phys Rev Lett.* 54:1245-1248.
- Awolesi, M.A., M.D. Widmann, W.C. Sessa, and B.E. Sumpio. 1994. Cyclic strain increases endothelial nitric oxide synthase activity. *Surgery.* 116:439-44; discussion 444-5.
- Bamforth, S.D., U. Kniesel, H. Wolburg, B. Engelhardt, and W. Risau. 1999. A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function. *J Cell Sci.* 112 (Pt 12):1879-88.
- Baumer, Y., D. Drenckhahn, and J. Waschke. 2008. cAMP induced Rac 1-mediated cytoskeletal reorganization in microvascular endothelium. *Histochem Cell Biol.* 129:765-78.
- Baumgartner, W., and D. Drenckhahn. 2002a. An expectation-maximisation algorithm for the deconvolution of the intrinsic distribution of single molecule's parameters. *Comput Chem.* 26:321-6.
- Baumgartner, W., and D. Drenckhahn. 2002b. Plasmalemmal concentration and affinity of mouse vascular endothelial cadherin, VE-cadherin. *Eur Biophys J.* 31:532-8.
- Baumgartner, W., N. Golenhofen, A. Weth, T. Hiiragi, R. Saint, M. Griffin, and D. Drenckhahn. 2004. Role of transglutaminase 1 in stabilisation of intercellular junctions of the vascular endothelium. *Histochem Cell Biol.* 122:17-25.
- Baumgartner, W., P. Hinterdorfer, W. Ness, A. Raab, D. Vestweber, H. Schindler, and

- D. Drenckhahn. 2000. Cadherin interaction probed by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:4005-10.
- Baumgartner, W., G.J. Schutz, J. Wiegand, N. Golenhofen, and D. Drenckhahn. 2003. Cadherin function probed by laser tweezer and single molecule fluorescence in vascular endothelial cells. *J Cell Sci*. 116:1001-11.
- Bar-Sagi, D., and J. Prives. 1983. Trifluoperazine, a calmodulin antagonist, inhibits muscle cell fusion. *J Cell Biol*. 97:1375-80.
- Bazzoni, G., and E. Dejana. 2004. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*. 84:869-901.
- Behrens, J., W. Birchmeier, S.L. Goodman, and B.A. Imhof. 1985. Dissociation of Madin-Darby canine kidney epithelial cells by the monoclonal antibody anti-arc-1: mechanistic aspects and identification of the antigen as a component related to uvomorulin. *J Cell Biol*. 101:1307-15.
- Behrens, J., J.P. von Kries, M. Kuhl, L. Bruhn, D. Wedlich, R. Grosschedl, and W. Birchmeier. 1996. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*. 382:638-42.
- Ben-Ze'ev, A., and B. Geiger. 1998. Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 10:629-39.
- Birukov, K.G., A.A. Birukova, S.M. Dudek, A.D. Verin, M.T. Crow, X. Zhan, N. DePaola, and J.G. Garcia. 2002. Shear stress-mediated cytoskeletal remodeling and cortactin translocation in pulmonary endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 26:453-64.
- Birukova, A.A., T. Zagranichnaya, P. Fu, E. Alekseeva, W. Chen, J.R. Jacobson, and K.G. Birukov. 2007. Prostaglandins PGE(2) and PGI(2) promote endothelial barrier enhancement via PKA- and Epac1/Rap1-dependent Rac activation. *Exp Cell Res*. 313:2504-20.
- Biswas, P., H.E. Abboud, H. Kiyomoto, U.O. Wenzel, G. Grandaliano, and G.G. Choudhury. 1995. PKC alpha regulates thrombin-induced PDGF-B chain gene expression in mesangial cells. *FEBS Lett*. 373:146-50.
- Blaschuk, O.W., and T.M. Rowlands. 2002. Plasma membrane components of adherens junctions (Review). *Mol Membr Biol*. 19:75-80.
- Boo, Y.C., J. Hwang, M. Sykes, B.J. Michell, B.E. Kemp, H. Lum, and H. Jo. 2002. Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 283:H1819-28.
- Bos, J.L. 2003. Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4:733-8.
- Breviario, F., L. Caveda, M. Corada, I. Martin-Padura, P. Navarro, J. Golay, M. Introna, D. Gulino, M.G. Lampugnani, and E. Dejana. 1995. Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 15:1229-39.
- Broman, M.T., D. Mehta, and A.B. Malik. 2007. Cdc42 regulates the restoration of endothelial adherens junctions and permeability. *Trends Cardiovasc Med*. 17:151-6.
- Bucci, M., J.P. Gratton, R.D. Rudic, L. Acevedo, F. Roviezzo, G. Cirino, and W.C. Sessa. 2000. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med*. 6:1362-7.
- Bucci, M., F. Roviezzo, I. Posadas, J. Yu, L. Parente, W.C. Sessa, L.J. Ignarro, and G.

- Cirino. 2005. Endothelial nitric oxide synthase activation is critical for vascular leakage during acute inflammation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:904-8.
- Bustelo, X.R., V. Sauzeau, and I.M. Berenjano. 2007. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays*. 29:356-70.
- Chappuis-Flament, S., E. Wong, L.D. Hicks, C.M. Kay, and B.M. Gumbiner. 2001. Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *J Cell Biol*. 154:231-43.
- Chen, X., S. Kojima, G.G. Borisy, and K.J. Green. 2003. p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J Cell Biol*. 163:547-57.
- Comerford, K.M., D.W. Lawrence, K. Synnestvedt, B.P. Levi, and S.P. Colgan. 2002. Role of vasodilator-stimulated phosphoprotein in PKA-induced changes in endothelial junctional permeability. *Faseb J*. 16:583-5.
- Corada, M., F. Liao, M. Lindgren, M.G. Lampugnani, F. Breviario, R. Frank, W.A. Muller, D.J. Hicklin, P. Bohlen, and E. Dejana. 2001. Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability. *Blood*. 97:1679-84.
- Corada, M., M. Mariotti, G. Thurston, K. Smith, R. Kunkel, M. Brockhaus, M.G. Lampugnani, I. Martin-Padura, A. Stoppacciaro, L. Ruco, D.M. McDonald, P.A. Ward, and E. Dejana. 1999. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:9815-20.
- Corada, M., L. Zanetta, F. Orsenigo, F. Breviario, M.G. Lampugnani, S. Bernasconi, F. Liao, D.J. Hicklin, P. Bohlen, and E. Dejana. 2002. A monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin inhibits tumor angiogenesis without side effects on endothelial permeability. *Blood*. 100:905-11.
- Cordenonsi, M., F. D'Atri, E. Hammar, D.A. Parry, J. Kendrick-Jones, D. Shore, and S. Citi. 1999. Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J Cell Biol*. 147:1569-82.
- Corson, M.A., N.L. James, S.E. Latta, R.M. Nerem, B.C. Berk, and D.G. Harrison. 1996. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res*. 79:984-91.
- Cullere, X., S.K. Shaw, L. Andersson, J. Hirahashi, F.W. Lusciuskas, and T.N. Mayadas. 2005. Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase. *Blood*. 105:1950-5.
- Curry, F.E., J.C. Mason, and C.C. Michel. 1973. Proceedings: The effect of bovine gamma-globulin and Ca²⁺ on the filtration coefficient of individual frog mesenteric capillaries. *J Physiol*. 234:43P-44P.
- Curry Fitz-Roy E., Ph.D. 2002. Microvascular Injury: Mechanisms and Modulation. *International Journal of Angiology* 11:1-6.
- Dartsch, P.C., and E. Betz. 1989. Response of cultured endothelial cells to mechanical stimulation. *Basic Res Cardiol*. 84:268-81.
- Davis, M.A., R.C. Ireton, and A.B. Reynolds. 2003. A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol*. 163:525-34.
- Dejana, E. 2004. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol*.

- 5:261-70.
- Dejana, E., F. Orsenigo, and M.G. Lampugnani. 2008. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci.* 121:2115-22.
- Del Maschio, A., A. De Luigi, I. Martin-Padura, M. Brockhaus, T. Bartfai, P. Fruscella, L. Adorini, G. Martino, R. Furlan, M.G. De Simoni, and E. Dejana. 1999. Leukocyte recruitment in the cerebrospinal fluid of mice with experimental meningitis is inhibited by an antibody to junctional adhesion molecule (JAM). *J Exp Med.* 190:1351-6.
- Del Maschio, A., A. Zanetti, M. Corada, Y. Rival, L. Ruco, M.G. Lampugnani, and E. Dejana. 1996. Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *J Cell Biol.* 135:497-510.
- Dewey, C.F., Jr., S.R. Bussolari, M.A. Gimbrone, Jr., and P.F. Davies. 1981. The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng.* 103:177-85.
- Dimmeler, S., I. Fleming, B. Fisslthaler, C. Hermann, R. Busse, and A.M. Zeiher. 1999. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 399:601-5.
- Drab, M., P. Verkade, M. Elger, M. Kasper, M. Lohn, B. Lauterbach, J. Menne, C. Lindschau, F. Mende, F.C. Luft, A. Schedl, H. Haller, and T.V. Kurzchalia. 2001. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science.* 293:2449-52.
- Drees, F., S. Pokutta, S. Yamada, W.J. Nelson, and W.I. Weis. 2005. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell.* 123:903-15.
- Drenckhahn, D. 2003. Zellenlehre. In Benninghoff-Drenckhahn Anatomie Band 1, Urban & Fischer, München/Jena, 16. Auflage: 26.
- Drenckhahn, D. und Ness 1997. The endothelial contractile cytoskelton. In: Vascular Endothelium: Physiology, Pathology and Therapeutic Opportunities (G.V.R. Born/C.J. Schwartz, Eds.). New Horizon Series 3, 1-125, (Schattauer, Stuttgart).
- Dudek, S.M., and J.G. Garcia. 2001. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol.* 91:1487-500.
- Dull, R.O., I. Mecham, and S. McJames. 2007. Heparan sulfates mediate pressure-induced increase in lung endothelial hydraulic conductivity via nitric oxide/reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 292:L1452-8.
- Esser, S., M.G. Lampugnani, M. Corada, E. Dejana, and W. Risau. 1998. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci.* 111 (Pt 13):1853-65.
- Farmer, P.J., S.G. Bernier, A. Lepage, G. Guillemette, D. Regoli, and P. Sirois. 2001. Permeability of endothelial monolayers to albumin is increased by bradykinin and inhibited by prostaglandins. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 280:L732-8.
- Feng, D., J.A. Nagy, H.F. Dvorak, and A.M. Dvorak. 2002. Ultrastructural studies define soluble macromolecular, particulate, and cellular transendothelial cell pathways in venules, lymphatic vessels, and tumor-associated microvessels in man and animals. *Microsc Res Tech.* 57:289-326.

- Förster, C. 2008. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol.* 130:55-70.
- Fra, A.M., M. Masserini, P. Palestini, S. Sonnino, and K. Simons. 1995. A photo-reactive derivative of ganglioside GM1 specifically cross-links VIP21-caveolin on the cell surface. *FEBS Lett.* 375:11-4.
- Franke, R.P., M. Grafe, H. Schnittler, D. Seiffge, C. Mittermayer, and D. Drenckhahn. 1984. Induction of human vascular endothelial stress fibres by fluid shear stress. *Nature.* 307:648-9.
- Fujita, Y., G. Krause, M. Scheffner, D. Zechner, H.E. Leddy, J. Behrens, T. Sommer, and W. Birchmeier. 2002. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol.* 4:222-31.
- Fukata, M., M. Nakagawa, S. Kuroda, and K. Kaibuchi. 1999. Cell adhesion and Rho small GTPases. *J Cell Sci.* 112 (Pt 24):4491-500.
- Fukuhara, A., K. Irie, H. Nakanishi, K. Takekuni, T. Kawakatsu, W. Ikeda, A. Yamada, T. Katata, T. Honda, T. Sato, K. Shimizu, H. Ozaki, H. Horiuchi, T. Kita, and Y. Takai. 2002. Involvement of nectin in the localization of junctional adhesion molecule at tight junctions. *Oncogene.* 21:7642-55.
- Fukuhara, S., A. Sakurai, H. Sano, A. Yamagishi, S. Somekawa, N. Takakura, Y. Saito, K. Kangawa, and N. Mochizuki. 2005. Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 25:136-46.
- Fulton, D., J.P. Gratton, T.J. McCabe, J. Fontana, Y. Fujio, K. Walsh, T.F. Franke, A. Papapetropoulos, and W.C. Sessa. 1999. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 399:597-601.
- Gao, X., P. Kouklis, N. Xu, R.D. Minshall, R. Sandoval, S.M. Vogel, and A.B. Malik. 2000. Reversibility of increased microvessel permeability in response to VE-cadherin disassembly. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279:L1218-25.
- Garcia, J.G., H.W. Davis, and C.E. Patterson. 1995. Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell Physiol.* 163:510-22.
- Gates, J., and M. Peifer. 2005. Can 1000 reviews be wrong? Actin, alpha-Catenin, and adherens junctions. *Cell.* 123:769-72.
- Gavard, J., and J.S. Gutkind. 2006. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol.* 8:1223-34.
- Gavard, J., and J.S. Gutkind. 2008. Protein kinase C-related kinase and ROCK are required for thrombin-induced endothelial cell permeability downstream from Galpha12/13 and Galpha11/q. *J Biol Chem.* 283:29888-96.
- Girard, P.R., and R.M. Nerem. 1993. Endothelial cell signaling and cytoskeletal changes in response to shear stress. *Front Med Biol Eng.* 5:31-6.
- Girard, P.R., and R.M. Nerem. 1995. Shear stress modulates endothelial cell morphology and F-actin organization through the regulation of focal adhesion-associated proteins. *J Cell Physiol.* 163:179-93.
- Glenney, J.R., Jr. 1989. Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J Biol Chem.* 264:20163-6.
- Glenney, J.R., Jr. 1992. The sequence of human caveolin reveals identity with VIP21, a component of transport vesicles. *FEBS Lett.* 314:45-8.
- Go, Y.M., Y.C. Boo, H. Park, M.C. Maland, R. Patel, K.A. Pritchard, Jr., Y. Fujio, K.

- Walsh, V. Darley-Usmar, and H. Jo. 2001. Protein kinase B/Akt activates c-Jun NH(2)-terminal kinase by increasing NO production in response to shear stress. *J Appl Physiol.* 91:1574-81.
- Goddette, D.W., and C. Frieden. 1986. Actin polymerization. The mechanism of action of cytochalasin D. *J Biol Chem.* 261:15974-80.
- Goeckeler, Z.M., and R.B. Wysolmerski. 1995. Myosin light chain kinase-regulated endothelial cell contraction: the relationship between isometric tension, actin polymerization, and myosin phosphorylation. *J Cell Biol.* 130:613-27.
- Golenhofen, N., W. Ness, E.F. Wawrousek, and D. Drenckhahn. 2002. Expression and induction of the stress protein alpha-B-crystallin in vascular endothelial cells. *Histochem Cell Biol.* 117:203-9.
- Gonzalez, E., A. Nagiel, A.J. Lin, D.E. Golan, and T. Michel. 2004. Small interfering RNA-mediated down-regulation of caveolin-1 differentially modulates signaling pathways in endothelial cells. *J Biol Chem.* 279:40659-69.
- Gorovoy, M., R. Neamu, J. Niu, S. Vogel, D. Predescu, J. Miyoshi, Y. Takai, V. Kini, D. Mehta, A.B. Malik, and T. Voyno-Yasenetskaya. 2007. RhoGDI-1 modulation of the activity of monomeric RhoGTPase RhoA regulates endothelial barrier function in mouse lungs. *Circ Res.* 101:50-8.
- Gotsch, U., E. Borges, R. Bosse, E. Boggemeyer, M. Simon, H. Mossmann, and D. Vestweber. 1997. VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci.* 110 (Pt 5):583-8.
- Gottardi, C.J., and B.M. Gumbiner. 2001. Adhesion signaling: how beta-catenin interacts with its partners. *Curr Biol.* 11:R792-4.
- Govers, R., and T.J. Rabelink. 2001. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol.* 280:F193-206.
- Grazia Lampugnani, M., A. Zanetti, M. Corada, T. Takahashi, G. Balconi, F. Breviario, F. Orsenigo, A. Cattelino, R. Kemler, T.O. Daniel, and E. Dejana. 2003. Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J Cell Biol.* 161:793-804.
- Hatakeyama, T., P.J. Pappas, R.W. Hobson, 2nd, M.P. Boric, W.C. Sessa, and W.N. Duran. 2006. Endothelial nitric oxide synthase regulates microvascular hyperpermeability in vivo. *J Physiol.* 574:275-81.
- He, P., and F.E. Curry. 1993. Albumin modulation of capillary permeability: role of endothelial cell [Ca²⁺]_i. *Am J Physiol.* 265:H74-82.
- Hippenstiel, S., M. Witzernath, B. Schmeck, A. Hocke, M. Krisp, M. Krull, J. Seybold, W. Seeger, W. Rascher, H. Schutte, and N. Suttorp. 2002. Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability. *Circ Res.* 91:618-25.
- Hixenbaugh, E.A., Z.M. Goeckeler, N.N. Papaiya, R.B. Wysolmerski, S.C. Silverstein, and A.J. Huang. 1997. Stimulated neutrophils induce myosin light chain phosphorylation and isometric tension in endothelial cells. *Am J Physiol.* 273:H981-8.
- Holinstat, M., N. Knezevic, M. Broman, A.M. Samarel, A.B. Malik, and D. Mehta. 2006. Suppression of RhoA activity by focal adhesion kinase-induced activation of p190RhoGAP: role in regulation of endothelial permeability. *J Biol Chem.* 281:2296-305.
- Holnthoner, W., M. Pillinger, M. Groger, K. Wolff, A.W. Ashton, C. Albanese, P. Neumeister, R.G. Pestell, and P. Petzelbauer. 2002. Fibroblast growth factor-2 induces Lef/Tcf-dependent transcription in human endothelial cells. *J Biol*

- Chem.* 277:45847-53.
- Hood, J.D., C.J. Meininger, M. Ziche, and H.J. Granger. 1998. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol.* 274:H1054-8.
- Hordijk, P.L., E. Anthony, F.P. Mul, R. Rientsma, L.C. Oomen, and D. Roos. 1999. Vascular-endothelial-cadherin modulates endothelial monolayer permeability. *J Cell Sci.* 112 (Pt 12):1915-23.
- Huber, A.H., D.B. Stewart, D.V. Laurents, W.J. Nelson, and W.I. Weis. 2001. The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J Biol Chem.* 276:12301-9.
- Huber, O., R. Korn, J. McLaughlin, M. Ohsugi, B.G. Herrmann, and R. Kemler. 1996. Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev.* 59:3-10.
- Ilan, N., and J.A. Madri. 2003. PECAM-1: old friend, new partners. *Curr Opin Cell Biol.* 15:515-24.
- Itoh, M., A. Nagafuchi, S. Yonemura, T. Kitani-Yasuda, S. Tsukita, and S. Tsukita. 1993. The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J Cell Biol.* 121:491-502.
- Jaffe, A.B., and A. Hall. 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:247-69.
- Jalali, S., M.A. del Pozo, K. Chen, H. Miao, Y. Li, M.A. Schwartz, J.Y. Shyy, and S. Chien. 2001. Integrin-mediated mechanotransduction requires its dynamic interaction with specific extracellular matrix (ECM) ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:1042-6.
- Kamei, T., T. Matozaki, T. Sakisaka, A. Kodama, S. Yokoyama, Y.F. Peng, K. Nakano, K. Takaiishi, and Y. Takai. 1999. Coendocytosis of cadherin and c-Met coupled to disruption of cell-cell adhesion in MDCK cells--regulation by Rho, Rac and Rab small G proteins. *Oncogene.* 18:6776-84.
- Kawamoto, S., A.R. Bengur, J.R. Sellers, and R.S. Adelstein. 1989. In situ phosphorylation of human platelet myosin heavy and light chains by protein kinase C. *J Biol Chem.* 264:2258-65.
- Knudsen, K.A., A.P. Soler, K.R. Johnson, and M.J. Wheelock. 1995. Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J Cell Biol.* 130:67-77.
- Knudsen, K.A., and M.J. Wheelock. 1992. Plakoglobin, or an 83-kD homologue distinct from beta-catenin, interacts with E-cadherin and N-cadherin. *J Cell Biol.* 118:671-9.
- Kogo, H., T. Aiba, and T. Fujimoto. 2004. Cell type-specific occurrence of caveolin-1alpha and -1beta in the lung caused by expression of distinct mRNAs. *J Biol Chem.* 279:25574-81.
- Kogo, H., and T. Fujimoto. 2000. Caveolin-1 isoforms are encoded by distinct mRNAs. Identification Of mouse caveolin-1 mRNA variants caused by alternative transcription initiation and splicing. *FEBS Lett.* 465:119-23.
- Koss, M., G.R. Pfeiffer, 2nd, Y. Wang, S.T. Thomas, M. Yerukhimovich, W.A. Gaarde, C.M. Doerschuk, and Q. Wang. 2006. Ezrin/radixin/moesin proteins are phosphorylated by TNF-alpha and modulate permeability increases in human

- pulmonary microvascular endothelial cells. *J Immunol.* 176:1218-27.
- Kouklis, P., M. Konstantoulaki, and A.B. Malik. 2003. VE-cadherin-induced Cdc42 signaling regulates formation of membrane protrusions in endothelial cells. *J Biol Chem.* 278:16230-6.
- Kowalczyk, A.P., and A.B. Reynolds. 2004. Protecting your tail: regulation of cadherin degradation by p120-catenin. *Curr Opin Cell Biol.* 16:522-7.
- Krebs, J., and E. Carafoli. 1982. Influence of Ca²⁺ and trifluoperazine on the structure of calmodulin. A ¹H-nuclear magnetic resonance study. *Eur J Biochem.* 124: 619-27.
- Kubes, P. 1995. Nitric oxide affects microvascular permeability in the intact and inflamed vasculature. *Microcirculation.* 2:235-44.
- Kuchan, M.J., and J.A. Frangos. 1993. Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. *Am J Physiol.* 264:H150-6.
- Kuroda, S., M. Fukata, K. Kobayashi, M. Nakafuku, N. Nomura, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1996. Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, Cdc42 and Rac1. *J Biol Chem.* 271:23363-7.
- Lal, B.K., S. Varma, P.J. Pappas, R.W. Hobson, 2nd, and W.N. Duran. 2001. VEGF increases permeability of the endothelial cell monolayer by activation of PKB/akt, endothelial nitric-oxide synthase, and MAP kinase pathways. *Microvasc Res.* 62:252-62.
- Lampugnani, M.G., M. Resnati, M. Raiteri, R. Pigott, A. Pisacane, G. Houen, L.P. Ruco, and E. Dejana. 1992. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol.* 118:1511-22.
- Le, T.L., A.S. Yap, and J.L. Stow. 1999. Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *J Cell Biol.* 146:219-32.
- Leckband, D., and S. Sivasankar. 2000. Mechanism of homophilic cadherin adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* 12:587-92.
- Levesque, M.J., and R.M. Nerem. 1985. The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress. *J Biomech Eng.* 107:341-7.
- Li, S., B.P. Chen, N. Azuma, Y.L. Hu, S.Z. Wu, B.E. Sumpio, J.Y. Shyy, and S. Chien. 1999. Distinct roles for the small GTPases Cdc42 and Rho in endothelial responses to shear stress. *J Clin Invest.* 103:1141-50.
- Li, S., M. Kim, Y.L. Hu, S. Jalali, D.D. Schlaepfer, T. Hunter, S. Chien, and J.Y. Shyy. 1997. Fluid shear stress activation of focal adhesion kinase. Linking to mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 272:30455-62.
- Li, S., T. Okamoto, M. Chun, M. Sargiacomo, J.E. Casanova, S.H. Hansen, I. Nishimoto, and M.P. Lisanti. 1995. Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J Biol Chem.* 270:15693-701.
- Li, Y.S., J.Y. Shyy, S. Li, J. Lee, B. Su, M. Karin, and S. Chien. 1996. The Ras-JNK pathway is involved in shear-induced gene expression. *Mol Cell Biol.* 16:5947-54.
- Liu, P., M. Rudick, and R.G. Anderson. 2002. Multiple functions of caveolin-1. *J Biol Chem.* 277:41295-8.
- Lu, Z., S. Ghosh, Z. Wang, and T. Hunter. 2003. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell.* 4:499-515.
- Majno, G., and G.E. Palade. 1961. Studies on inflammation. 1. The effect of histamine

- and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. *J Biophys Biochem Cytol.* 11:571-605.
- Majno, G., G.E. Palade, and G.I. Schoefl. 1961. Studies on inflammation. II. The site of action of histamine and serotonin along the vascular tree: a topographic study. *J Biophys Biochem Cytol.* 11:607-26.
- Malek, A.M., G.H. Gibbons, V.J. Dzau, and S. Izumo. 1993. Fluid shear stress differentially modulates expression of genes encoding basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor B chain in vascular endothelium. *J Clin Invest.* 92:2013-21.
- Martin-Padura, I., S. Lostaglio, M. Schneemann, L. Williams, M. Romano, P. Fruscella, C. Panzeri, A. Stoppacciaro, L. Ruco, A. Villa, D. Simmons, and E. Dejana. 1998. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* 142:117-27.
- Mehta, D., A. Rahman, and A.B. Malik. 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.
- Mehta, D., and A.B. Malik. 2006. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev.* 86:279-367.
- Michel, C.C., and F.E. Curry. 1999. Microvascular permeability. *Physiol Rev.* 79:703-61.
- Monier, S., D.J. Dietzen, W.R. Hastings, D.M. Lublin, and T.V. Kurzchalia. 1996. Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol. *FEBS Lett.* 388:143-9.
- Moon, R.T., B. Bowerman, M. Boutros, and N. Perrimon. 2002. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science.* 296:1644-6.
- Murata, M., J. Peranen, R. Schreiner, F. Wieland, T.V. Kurzchalia, and K. Simons. 1995. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:10339-43.
- Nagar, B., M. Overduin, M. Ikura, and J.M. Rini. 1996. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature.* 380:360-4.
- Navarro, P., L. Caveda, F. Breviario, I. Mandoteanu, M.G. Lampugnani, and E. Dejana. 1995. Catenin-dependent and -independent functions of vascular endothelial cadherin. *J Biol Chem.* 270:30965-72.
- Newton, A.C. 1995. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem.* 270:28495-8.
- Ni, C.W., D.L. Wang, S.C. Lien, J.J. Cheng, Y.J. Chao, and H.J. Hsieh. 2003. Activation of PKC- ϵ and ERK1/2 participates in shear-induced endothelial MCP-1 expression that is repressed by nitric oxide. *J Cell Physiol.* 195:428-34.
- Nishikawa, M., P. de Lanerolle, T.M. Lincoln, and R.S. Adelstein. 1984. Phosphorylation of mammalian myosin light chain kinases by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase and by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 259:8429-36.
- Noda, M., C. Yasuda-Fukazawa, K. Moriishi, T. Kato, T. Okuda, K. Kurokawa, and Y. Takuwa. 1995. Involvement of rho in GTP gamma S-induced enhancement of phosphorylation of 20 kDa myosin light chain in vascular smooth muscle cells: inhibition of phosphatase activity. *FEBS Lett.* 367:246-50.
- Nollet, F., P. Kools, and F. van Roy. 2000. Phylogenetic analysis of the cadherin

- superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol.* 299:551-72.
- Noren, N.K., B.P. Liu, K. Burrige, and B. Kreft. 2000. p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol.* 150:567-80.
- Ohashi, T., Y. Sugaya, N. Sakamoto, and M. Sato. 2007. Hydrostatic pressure influences morphology and expression of VE-cadherin of vascular endothelial cells. *J Biomech.* 40:2399-405.
- Ookawa, K., M. Sato, and N. Ohshima. 1992. Changes in the microstructure of cultured porcine aortic endothelial cells in the early stage after applying a fluid-imposed shear stress. *J Biomech.* 25:1321-8.
- Osborn, M., and K. Weber. 1980. Damage of cellular functions by trifluoperazine, a calmodulin-specific drug. *Exp Cell Res.* 130:484-8.
- Pahakis, M.Y., J.R. Kosky, R.O. Dull, and J.M. Tarbell. 2007. The role of endothelial glycocalyx components in mechanotransduction of fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 355:228-33.
- Patterson, C.E., H. Lum, K.L. Schaphorst, A.D. Verin, and J.G. Garcia. 2000. Regulation of endothelial barrier function by the cAMP-dependent protein kinase. *Endothelium.* 7:287-308.
- Peifer, M., S. Berg, and A.B. Reynolds. 1994. A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell.* 76:789-91.
- Pelech, S.L., and J.S. Sanghera. 1992. Mitogen-activated protein kinases: versatile transducers for cell signaling. *Trends Biochem Sci.* 17:233-8.
- Pokutta, S., K. Herrenknecht, R. Kemler, and J. Engel. 1994. Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur J Biochem.* 223:1019-26.
- Posy, S., L. Shapiro, and B. Honig. 2008. Sequence and structural determinants of strand swapping in cadherin domains: do all cadherins bind through the same adhesive interface? *J Mol Biol.* 378:952-66.
- Predescu, D., S. Predescu, J. Shimizu, K. Miyawaki-Shimizu, and A.B. Malik. 2005. Constitutive eNOS-derived nitric oxide is a determinant of endothelial junctional integrity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 289:L371-81.
- Prozialeck, W.C., and B. Weiss. 1982. Inhibition of calmodulin by phenothiazines and related drugs: structure-activity relationships. *J Pharmacol Exp Ther.* 222:509-16.
- Qiao, J., F. Huang, and H. Lum. 2003. PKA inhibits RhoA activation: a protection mechanism against endothelial barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 284:L972-80.
- Rabiet, M.J., J.L. Plantier, Y. Rival, Y. Genoux, M.G. Lampugnani, and E. Dejana. 1996. Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16:488-96.
- Ramirez, M.M., S.M. Quardt, D. Kim, H. Oshiro, M. Minnicozzi, and W.N. Duran. 1995. Platelet activating factor modulates microvascular permeability through nitric oxide synthesis. *Microvasc Res.* 50:223-34.
- Razani, B., and M.P. Lisanti. 2001. Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease. *J Clin Invest.* 108:1553-61.
- Rizzo, V., D.P. McIntosh, P. Oh, and J.E. Schnitzer. 1998. In situ flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid

- caveolin dissociation and calmodulin association. *J Biol Chem.* 273:34724-9.
- Roufogalis, B.D., A.M. Minocherhomjee, and A. Al-Jobore. 1983. Pharmacological antagonism of calmodulin. *Can J Biochem Cell Biol.* 61:927-33.
- Rubinfeld, B., I. Albert, E. Porfiri, C. Fiol, S. Munemitsu, and P. Polakis. 1996. Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science.* 272:1023-6.
- Rumbaut, R.E., M.K. McKay, and V.H. Huxley. 1995. Capillary hydraulic conductivity is decreased by nitric oxide synthase inhibition. *Am J Physiol.* 268:H1856-61.
- Salwen, S.A., D.H. Szarowski, J.N. Turner, and R. Bizios. 1998. Three-dimensional changes of the cytoskeleton of vascular endothelial cells exposed to sustained hydrostatic pressure. *Med Biol Eng Comput.* 36:520-7.
- Sandoval, R., A.B. Malik, T. Naqvi, D. Mehta, and C. Tiruppathi. 2001. Requirement for Ca²⁺ signaling in the mechanism of thrombin-induced increase in endothelial permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 280:L239-47.
- Sato, M., and T. Ohashi. 2005. Biorheological views of endothelial cell responses to mechanical stimuli. *Biorheology.* 42:421-41.
- Scheiffele, P., P. Verkade, A.M. Fra, H. Virta, K. Simons, and E. Ikonen. 1998. Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells. *J Cell Biol.* 140:795-806.
- Scherer, P.E., R.Y. Lewis, D. Volonte, J.A. Engelman, F. Galbiati, J. Couet, D.S. Kohtz, E. van Donselaar, P. Peters, and M.P. Lisanti. 1997. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem.* 272:29337-46.
- Schnittler, H.J., R.P. Franke, U. Akbay, C. Mrowietz, and D. Drenckhahn. 1993. Improved in vitro rheological system for studying the effect of fluid shear stress on cultured cells. *Am J Physiol.* 265:C289-98.
- Schnittler, H.J., A. Wilke, T. Gress, N. Suttorp, and D. Drenckhahn. 1990. Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium. *J Physiol.* 431:379-401.
- Schubert, W., P.G. Frank, B. Razani, D.S. Park, C.W. Chow, and M.P. Lisanti. 2001. Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *J Biol Chem.* 276:48619-22.
- Schubert, W., P.G. Frank, S.E. Woodman, H. Hyogo, D.E. Cohen, C.W. Chow, and M.P. Lisanti. 2002. Microvascular hyperpermeability in caveolin-1 (-/-) knock-out mice. Treatment with a specific nitric-oxide synthase inhibitor, L-NAME, restores normal microvascular permeability in Cav-1 null mice. *J Biol Chem.* 277:40091-8.
- Schweighofer, B., J. Schultes, J. Pomyje, and E. Hofer. 2007. Signals and genes induced by angiogenic growth factors in comparison to inflammatory cytokines in endothelial cells. *Clin Hemorheol Microcirc.* 37:57-62.
- Sedding, D.G., J. Hermsen, U. Seay, O. Eickelberg, W. Kummer, C. Schwencke, R.H. Strasser, H. Tillmanns, and R.C. Braun-Dullaeus. 2005. Caveolin-1 facilitates mechanosensitive protein kinase B (Akt) signaling in vitro and in vivo. *Circ Res.* 96:635-42.
- Shaul, P.W. 2002. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol.* 64:749-74.
- Shen, L., and J.R. Turner. 2005. Actin depolymerization disrupts tight junctions via caveolae-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell.* 16:3919-36.

- Shikata, Y., A. Rios, K. Kawkitinarong, N. DePaola, J.G. Garcia, and K.G. Birukov. 2005. Differential effects of shear stress and cyclic stretch on focal adhesion remodeling, site-specific FAK phosphorylation, and small GTPases in human lung endothelial cells. *Exp Cell Res.* 304:40-9.
- Simionescu, M., and N. Simionescu. 1991. Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. A look from cell biology. *Cell Biol Rev.* 25:1-78.
- Simon, A.M. 1999. Gap junctions: more roles and new structural data. *Trends Cell Biol.* 9:169-70.
- Sivasankar, S., B. Gumbiner, and D. Leckband. 2001. Direct measurements of multiple adhesive alignments and unbinding trajectories between cadherin extracellular domains. *Biophys J.* 80:1758-68.
- Song, K.S., P.E. Scherer, Z. Tang, T. Okamoto, S. Li, M. Chafel, C. Chu, D.S. Kohtz, and M.P. Lisanti. 1996. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem.* 271:15160-5.
- Stan, R.V. 2005. Structure of caveolae. *Biochim Biophys Acta.* 1746:334-48.
- Steinberg, M.S., and M. Takeichi. 1994. Experimental specification of cell sorting, tissue spreading, and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:206-9.
- Steinbrenner, J. 2001. Untersuchungen zur Permeabilität von Endothelzellen und der Wirkung von hydrostatischem druck auf das Zytoskelett im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit an der Universität Würzburg.
- Stelzner, T.J., J.V. Weil, and R.F. O'Brien. 1989. Role of cyclic adenosine monophosphate in the induction of endothelial barrier properties. *J Cell Physiol.* 139:157-66.
- Sumpio, B.E., M.D. Widmann, J. Ricotta, M.A. Awolesi, and M. Watase. 1994. Increased ambient pressure stimulates proliferation and morphologic changes in cultured endothelial cells. *J Cell Physiol.* 158:133-9.
- Suttorp, N., T. Fuchs, W. Seeger, A. Wilke, and D. Drenckhahn. 1989. Role of Ca²⁺ and Mg²⁺ for endothelial permeability of water and albumin in vitro. *Lab Invest.* 61:183-91.
- Suzuki, S., K. Sano, and H. Tanihara. 1991. Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue. *Cell Regul.* 2:261-70.
- Takeichi, M., H. Inuzuka, K. Shimamura, M. Matsunaga, and A. Nose. 1990. Cadherin-mediated cell-cell adhesion and neurogenesis. *Neurosci Res Suppl.* 13:S92-6.
- Tsukita, S., and S. Yonemura. 1999. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem.* 274:34507-10.
- Tzima, E., M.A. Del Pozo, W.B. Kiosses, S.A. Mohamed, S. Li, S. Chien, and M.A. Schwartz. 2002. Activation of Rac1 by shear stress in endothelial cells mediates both cytoskeletal reorganization and effects on gene expression. *Embo J.* 21:6791-800.
- Tzima, E. 2006. Role of small GTPases in endothelial cytoskeletal dynamics and the shear stress response. *Circ Res.* 98:176-85.
- van Nieuw Amerongen, G.P., and V.W. van Hinsbergh. 2002. Targets for pharmacological intervention of endothelial hyperpermeability and barrier function. *Vascul Pharmacol.* 39:257-72.
- Vandenbroucke, E., D. Mehta, R. Minshall, and A.B. Malik. 2008. Regulation of

- endothelial junctional permeability. *Ann NY Acad Sci.* 1123:134-45.
- Venkiteswaran, K., K. Xiao, S. Summers, C.C. Calkins, P.A. Vincent, K. Pumiglia, and A.P. Kowalczyk. 2002. Regulation of endothelial barrier function and growth by VE-cadherin, plakoglobin, and beta-catenin. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283:C811-21.
- Verin, A.D., A. Birukova, P. Wang, F. Liu, P. Becker, K. Birukov, and J.G. Garcia. 2001. Microtubule disassembly increases endothelial cell barrier dysfunction: role of MLC phosphorylation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 281:L565-74.
- Vincent, P.A., K. Xiao, K.M. Buckley, and A.P. Kowalczyk. 2004. VE-cadherin: adhesion at arm's length. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286:C987-97.
- Vouyouka, A.G., Y. Jiang, R. Rastogi, and M.D. Basson. 2006. Ambient pressure upregulates nitric oxide synthase in a phosphorylated-extracellular regulated kinase- and protein kinase C-dependent manner. *J Vasc Surg.* 44:1076-84.
- Wallez, Y., and P. Huber. 2008. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1778:794-809.
- Waschke, J., F.E. Curry, R.H. Adamson, and D. Drenckhahn. 2005. Regulation of actin dynamics is critical for endothelial barrier functions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288:H1296-305.
- Waschke, J., D. Drenckhahn, R.H. Adamson, and F.E. Curry. 2004. Role of adhesion and contraction in Rac 1-regulated endothelial barrier function in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287:H704-11.
- Waschke, J., N. Golenhofen, T.V. Kurzchalia, and D. Drenckhahn. 2006. Protein kinase C-mediated endothelial barrier regulation is caveolin-1-dependent. *Histochem Cell Biol.* 126:17-26.
- Watson, P.A. 1991. Function follows form: generation of intracellular signals by cell deformation. *Faseb J.* 5:2013-9.
- Way, M., and R.G. Parton. 1995. M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett.* 376:108-12.
- Wheelock, M.J., and K.R. Johnson. 2003. Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 15:509-14.
- Wilke, A. 1987. Morphologische und Immunzytochemische Charakterisierung eines In-Vitro Modelles zur Untersuchung der Permeabilität von Endothelzellmonolayern. Diplomarbeit im Fach Humanbiologie der Philipps-Universität Marburg.
- Wojciak-Stothard, B., and A.J. Ridley. 2003. Shear stress-induced endothelial cell polarization is mediated by Rho and Rac but not Cdc42 or PI 3-kinases. *J Cell Biol.* 161:429-39.
- Xiao, K., D.F. Allison, K.M. Buckley, M.D. Kottke, P.A. Vincent, V. Faundez, and A.P. Kowalczyk. 2003a. Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *J Cell Biol.* 163:535-45.
- Xiao, K., D.F. Allison, M.D. Kottke, S. Summers, G.P. Sorescu, V. Faundez, and A.P. Kowalczyk. 2003b. Mechanisms of VE-cadherin processing and degradation in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 278:19199-208.
- Yamada, S., S. Pokutta, F. Drees, W.I. Weis, and W.J. Nelson. 2005. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell.* 123:889-901.

- Yoshioka, K., N. Sugimoto, N. Takuwa, and Y. Takuwa. 2007. Essential role for class II phosphoinositide 3-kinase alpha-isoform in Ca²⁺-induced, Rho- and Rho kinase-dependent regulation of myosin phosphatase and contraction in isolated vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.* 71:912-20.
- Yuan, S.Y. 2002. Protein kinase signaling in the modulation of microvascular permeability. *Vascul Pharmacol.* 39:213-23.
- Zhu, L., D. Schwegler-Berry, V. Castranova, and P. He. 2004. Internalization of caveolin-1 scaffolding domain facilitated by Antennapedia homeodomain attenuates PAF-induced increase in microvessel permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286:H195-201.

Anhang

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Detlev Drenckhahn für die Überlassung des Themas und die immer freundliche und lehrreiche Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit.

Besonders danken möchte ich Herrn Professor Dr. med. Jens Waschke für seine große Einsatzbereitschaft während der Betreuung meiner Arbeit, das Korrekturlesen und die Bemühungen, die eine Publikation der gewonnenen Ergebnisse ermöglicht haben. Sowie für die vielen wertvollen fachlichen und persönlichen Ratschläge.

Großer Dank gebührt ebenfalls den Mitarbeitern und naturwissenschaftlichen Doktoranden der Anatomie für ihre Unterstützung und ihre Geduld bei der Weitergabe ihres Wissens über die technische Umsetzung der Versuche, namentlich Frau Stefanie Imhof, Frau Nadja Niedermeier, Frau Lisa Bergauer und Frau Agnes Weth sowie allen anderen Mitarbeitern der Anatomie.

Mein herzlicher Dank geht auch an die weiteren medizinischen Doktoranden Frau Nina Harke und Herrn Volker Spindler für die viele schönen Stunden während und nach der Arbeit.

Ich danke meinen Eltern und Großeltern, die mir dieses Studium und somit die Promotion ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen guten Freundinnen Kerstin Stahl und Yvonne Baumer für ihre bedingungslose Unterstützung und aufmunternde Worte in schwierigen Phasen, sowie Anja Hofer für ihr offenes Ohr.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Katharina Ingrid Ursula Müller-Marschhausen
Geburtsdatum: 21.02.1982 in Schlüchtern, Deutschland
Staatsbürgerschaft: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1988- 1992 Emil von Behring Grundschule, Marburg an der Lahn
1992- 2001 Gymnasium am Stadtpark, Krefeld
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

10/2001-12/2008 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
08/2003 Physikum
02/2007- 01/2008 Praktisches Jahr
02/2007- 04/2007 Gynäkologie und Geburtshilfe (Sane Guruji Argoya Kendra Hospital, Pune, Indien)
04/2007- 06/2007 Gynäkologie und Geburtshilfe (Universitätsklinik, Würzburg)
06/2007- 10/2007 Innere Medizin (Universitätsklinik, Würzburg)
10/2007- 02/2008 Chirurgie (Spital Bülach, Schweiz)
10/2008 2. Ärztliche Prüfung
12/2008 Approbation als Ärztin
04/2009 Assistenzärztin in der Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinik, Marburg