

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Universität Würzburg  
Lehrstuhl für Anatomie III  
Vorstand: Professor Dr. med. Jens Waschke

zum Thema

Reorganisation der Zellkontakte der Endothelbarriere bei der Stabilisierung  
durch cAMP und Rac1

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Dominik Peter  
aus Würzburg

Würzburg, Oktober 2012

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Universität Würzburg  
Lehrstuhl für Anatomie III  
Vorstand: Professor Dr. med. Jens Waschke

zum Thema

Reorganisation der Zellkontakte der Endothelbarriere bei der Stabilisierung  
durch cAMP und Rac1

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Dominik Peter  
aus Würzburg

Würzburg, Oktober 2012

Referent: Prof. Dr. med. Jens Waschke

Korreferentin: Prof. Dr. med. Michaela Kuhn

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2014

Der Promovend ist Arzt

**für meine Bambam**

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1      | Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der Endothelbarriere    | 1         |
| 1.2      | Strukturelle Komponenten der Endothelbarriere                            | 2         |
| 1.2.1    | Endotheliale Junctionen  | 2         |
| 1.2.1.1  | Adhärensjunctionen   | 4         |
| 1.2.1.2  | Occludensjunctionen (Tight junctions)                                    | 5         |
| 1.2.1.3  | Nexus (Gap junctions)  | 6         |
| 1.2.2    | Aktinzytoskelett   | 7         |
| 1.3      | cAMP und Rho-GTPasen in der Regulation der Endothelbarriere              | 9         |
| 1.3.1    | Rolle von cAMP bei der Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion | 9         |
| 1.3.2    | Bedeutung der Rho-GTPasen und des Epac/Rap 1-Signalweges                 | 12        |
| 1.3.2.1  | RhoA   | 13        |
| 1.3.2.2  | Rac1   | 14        |
| 1.3.2.3  | Cdc42  | 17        |
| 1.3.2.4  | Epac/Rap1  | 17        |
| 1.4      | Zielsetzung der Doktorarbeit   | 19        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden</b>   | <b>20</b> |
| 2.1      | Zellkultur   | 20        |
| 2.1.1    | Kulturzellen   | 20        |
| 2.1.2    | Kulturmedien   | 20        |
| 2.1.3    | PSEC-Präparation   | 21        |
| 2.2      | Antikörper und Testreagenzien  | 22        |
| 2.2.1    | Testreagenzien   | 22        |
| 2.2.2    | Antikörper und Aktinfilament-Darstellung                                 | 23        |
| 2.3      | Transmissions-Elektronenmikroskopie                                      | 23        |
| 2.3.1    | Fixierung und Epon-Einbettung  | 23        |
| 2.3.2    | Ultramikrotomie und Kontrastierung                                       | 24        |
| 2.3.3    | Herstellung von Gewebepreparaten aus Rattenmesenterium                   | 25        |

---

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.4      | Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie  | 26        |
| 2.4.1    | Methode  | 26        |
| 2.4.2    | Quantifizierung der Immunfluoreszenzsignale von Zellkontaktproteinen   | 27        |
| 2.4.3    | Immunfluoreszenzmikroskopie an Gewebepreparaten aus Rattenmesenterium  | 27        |
| 2.5      | Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TER)   | 28        |
| 2.6      | ELISA-basierte Messungen   | 28        |
| 2.6.1    | Messung der cAMP-Konzentration (cAMP-Assay)  | 28        |
| 2.6.2    | Messung der Aktivität von Rac1 (Rac-GLISA)   | 29        |
| 2.7      | Statistische Analyse   | 30        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse</b>  | <b>31</b> |
| 3.1      | Effekte von cAMP und Rac1 auf die Barrierefunktion kultivierter Endothelzellen                                     | 31        |
| 3.1.1    | Rolle von cAMP/Rac1 in der Regulation der Barrierefunktion mikrovaskulärer Endothelzellen (HDMECs)                 | 31        |
| 3.1.2    | Einfluss von cAMP auf die Barriere makrovaskulärer Endothelzellen (PSECs)  | 34        |
| 3.2      | Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Einflusses von cAMP und Rac1 auf Adhärens- und Occludensjunctionen | 36        |
| 3.2.1    | Rolle von cAMP und Rac1 in der Reorganisation der Adhärens- und Occludensjunctionen in HDMECs                      | 37        |
| 3.2.1.1  | Effekte von cAMP auf Adhärens- und Occludensjunctionen   | 37        |
| 3.2.1.2  | Rolle von Rac1 in der cAMP-vermittelten Reorganisation der Zellkontakte  | 41        |
| 3.2.2    | Einfluss von cAMP auf Adhärens- und Occludensjunctionen in PSECs   | 44        |
| 3.2.3    | Reorganisation der Junctionsproteine durch cAMP-Erhöhung in postkapillären Venulen <i>in vivo</i>                  | 46        |
| 3.3      | Ultrastrukturelle Veränderungen interzellulärer Kontakte durch cAMP-Erhöhung und Rac1-Aktivierung                  | 47        |
| 3.3.1    | Reorganisation des Zell-Zell-Kontaktbereiches in HDMECs  | 47        |
| 3.3.1.1  | Morphologische Charakteristika von HDMECs  | 47        |

---

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.3.1.2  | Einteilung der Zellkontaktzonen von HDMECs in morphologisch definierte Kategorien  | 51        |
| 3.3.1.3  | Weitere morphologische Charakterisierung der interzellulären Zellkontaktzone   | 54        |
| 3.3.2    | Morphologische Charakterisierung interzellulärer Zellkontaktzonen von PSECs  | 57        |
| 3.3.2.1  | Morphologische Charakteristika von PSECs   | 57        |
| 3.3.2.2  | Einteilung der Zellkontaktzonen von PSECs in morphologisch definierte Kategorien   | 58        |
| 3.3.3    | Ultrastrukturelle Darstellung postkapillärer Venulen   | 59        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion</b>  | <b>61</b> |
| 4.1      | Die cAMP-vermittelte Barrierestärkung in HDMECs wird von einer Umverteilung der Adhärens- und Occludensjunctionen begleitet                              | 61        |
| 4.2      | Die Barrierestabilisierung durch cAMP in mikrovaskulären Endothelien scheint über eine Reorganisation der interzellulären Kontaktzone vermittelt zu sein | 62        |
| 4.3      | Rolle von Rac1 in der cAMP-vermittelten Endothelbarrieresteigerung   | 65        |
| 4.4      | cAMP führt durch Rac1-Aktivierung zur Barrierestabilisierung in mikrovaskulären HDMECs, aber nicht in makrovaskulären PSECs                              | 67        |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung</b>   | <b>69</b> |
| <b>6</b> | <b>Literatur</b>   | <b>72</b> |
| <b>7</b> | <b>Anhang</b>  | <b>80</b> |
| 7.1      | Danksagung   |           |
| 7.2      | Lebenslauf   |           |

---

## Abkürzungsverzeichnis

|                 |  |
|-----------------|--|
| µl              | Mikroliter                               |
| µm              | Mikrometer                               |
| Abb.            | Abbildung                                |
| AC              | Adenylatcyclase                          |
| AJ              | Adhärensjunktion                         |
| Aqua dest.      | destilliertes Wasser                     |
| Arp2/3          | Actin related proteins 2/3               |
| ATP             | Adenosintriphosphat                      |
| A.U.            | Arbitrary unit; willkürliche Einheit     |
| BSA             | Bovine serum albumin; Rinderserumalbumin |
| cAMP            | Zyklisches Adenosinmonophosphat          |
| cm              | Zentimeter                               |
| CO <sub>2</sub> | Kohlenstoffdioxid                        |
| dag             | Donkey anti-goat                         |
| ELISA           | Enzyme-linked Immunosorbent Assay        |
| Epac            | Exchange protein activated by cyclic AMP |
| FCS             | Fetales Kälberserum                      |
| F/R             | Forskolin/Rolipram                       |
| g               | Erdbeschleunigung                        |
| g               | Gramm                                    |
| GAP             | GTPase-activating protein                |
| garb            | Goat anti-rabbit                         |
| GDP             | Guanosindiphosphat                       |
| GEF             | Guanotide exchange factor                |
| GJ              | Gap junction                             |
| GLISA           | GTPase-linked Immunosorbent Assay        |

---

|           |  |
|-----------|--|
| GTP       | Guanosintriphosphat  |
| h         | Stunde(n)  |
| HDMECs    | Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen   |
| IF        | Immunfluoreszenz   |
| IQGAP1    | IQRas GTPase-aktivierendes Protein1  |
| l         | Liter  |
| LPS       | Lipopolysaccharid  |
| LT        | Letales Toxin  |
| μ         | Mikro-   |
| M         | Molar [g/mol]  |
| mg        | Milligramm   |
| min       | Minute(n)  |
| ml        | Milliliter   |
| MLC       | Myosin-Leichtkette   |
| MLCK      | Myosin-Leichtketten-Kinase   |
| MLCP      | MLC-Phosphatase  |
| mm        | Millimeter   |
| MyEnds    | Mikrovaskuläre myokardiale Endothelzellen  |
| n         | Number; Anzahl   |
| nm        | Nanometer (Maß der Wellenlänge des Lichts)   |
| O-Me-cAMP | 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP  |
| OxPAPC    | Oxidierte Phospholipide (PAPC:<br>1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-phosphatidylcholine) |
| p         | Passage  |
| P/S       | Penicillin G/Streptomycin  |
| PAF       | platelet-activating factor   |
| PAK       | p21-activated kinase   |

---

|               |   |
|---------------|---|
| PBS           | Phosphate buffered saline                       |
| PDE           | Phosphodiesterase                               |
| PKA           | Proteinkinase A                                 |
| PSECs         | Pulmonale arterielle Schweineendothelzellen     |
| R             | Ratio   |
| Ras           | Rat sarcoma                                     |
| Rap1          | Ras-related protein 1                           |
| Rho           | Ras-Homologie-Protein                           |
| ROCK          | Rho-Kinase                                      |
| RT            | Raumtemperatur                                  |
| Tab.          | Tabelle   |
| TEM           | Transmissionselektronenmikroskopie              |
| TER           | Transendothelialer elektrischer Widerstand      |
| Tiam1         | T-cell lymphoma invasion and metastasis1-factor |
| TJ            | Tight junctions/Occludensjunktionen             |
| TNF- $\alpha$ | Tumor-Nekrose-Faktor alpha                      |
| Trio          | Triple functional domain protein                |
| U             | Unit(s) (Enzymeinheit)                          |
| UA            | Uranylacetat                                    |
| VE-Cadherin   | Vascular endothelial cadherin                   |
| VEGF          | Vascular endothelial growth factor              |
| x             | -Mal  |
| ZO1/2/3       | Zonula occludens-Protein 1/2/3                  |

# 1 Einleitung

## 1.1 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der Endothelbarriere

Das Blutgefäßsystem beim Menschen wird in Gefäße der Makro- (Arterien, Venen) und Mikrozirkulation (Arteriolen, Kapillaren, Venulen) eingeteilt. In den Gefäßen der Mikrozirkulation erfolgt die Versorgung der Organe mit Sauerstoff und Nährstoffen (Gas- und Stoffaustausch). Das Gefäßendothel wird durch eine einzelne Schicht von Endothelzellen gebildet, die durch interzelluläre Junctionen miteinander verbunden sind. Die Endothelzellen kleiden als kontinuierlicher Zellverband die innere Oberfläche des gesamten Gefäßsystems aus. Sie bilden somit die Barriere zwischen Blutkompartiment und umliegenden Interstitium, welche den Austausch von Flüssigkeit und gelösten Substanzen auf trans- und parazellulären Weg begrenzt und reguliert (Vandenbroucke et al., 2008). Diese selektive Permeabilität sorgt für einen gerichteten Stofftransport zwischen Blut und Gewebe. Daneben erfüllt das Gefäßendothel im gesunden Organismus noch eine Reihe weiterer Aufgaben. Durch Ausschüttung vasoaktiver Substanzen nimmt es an der Regulation von Gefäßtonus und Blutfluss sowie an der Homöostase von Gerinnung und Fibrinolyse teil. Darüber hinaus besitzt das Endothel immunmodulatorische Eigenschaften, wodurch es Einfluss auf Entzündungsprozesse und Abwehrvorgänge nehmen kann. So ist es in der Lage, nach physikalischer oder chemischer Stimulation Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu präsentieren, die eine Rekrutierung und (Trans-) Migration von Abwehrzellen ermöglichen (Dvorak et al., 1999; Michiels, 2003; Springer, 1994).

Störungen in der Funktion und Regulation der Endothelbarriere sowie Schädigungen der Zelljunctionen führen zu vielen verschiedenen Krankheitsbildern beim Menschen, wie Ödemen, hämorrhagischem Schlaganfall und vaskulären Malformationen (Dejana et al., 2009). Bei inflammatorischen und allergischen Reaktionen kommt es ebenso zu einer gestörten endothelialen Barrierefunktion (Mehta and Malik, 2006). Insbesondere für die Pathogenese der akuten Entzündung und Sepsis scheint der Zusammenbruch der Endothelbarriere durch die Bildung von interzellulären Lücken zwischen benachbarten Endothelzellen von entscheidender Bedeutung zu sein. Diese bei Entzündungen stattfindenden Permeabilitätsänderungen finden weitgehend selektiv im Bereich der postkapillären Venulen statt (Aird, 2007; Michel

and Curry, 1999). Einen entscheidenden Beitrag in diesem Zusammenhang scheinen endotheliale interzelluläre Junctionen, insbesondere Adhärens- (AJ) und Occludens- (TJ) junctionen (Bazzoni and Dejana, 2004; Franke, 2009), zu leisten, die durch Entzündungsmediatoren wie Histamin oder bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) verändert werden und durch deren Schädigung der Zellverband gestört und so die Barriere destabilisiert wird (Aird, 2007; Baumer, 2008; Spindler et al., 2010).

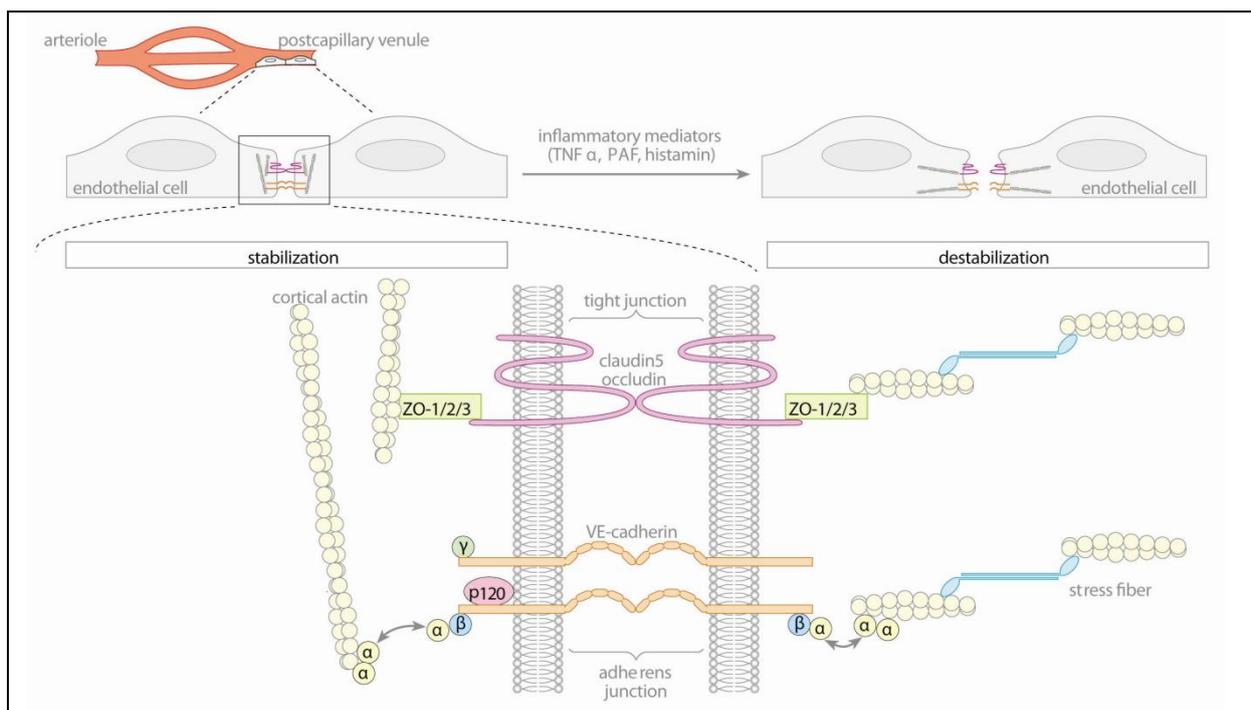
Neben den zahlreichen physiologischen Aufgaben nimmt die Endothelbarriere also eine zentrale Position in der Kontrolle der Gefäßpermeabilität und der Pathogenese vieler Krankheiten ein. Deshalb ist es wichtig, ihren Aufbau, ihre Funktion und ihre Regulation genau zu verstehen.

## **1.2 Strukturelle Komponenten der Endothelbarriere**

### **1.2.1 Endotheliale Junctionen**

Der Stoff- und Flüssigkeitstransport durch das Gefäßendothel erfolgt prinzipiell auf para- und auf transzellulärem Weg. Während beim parazellulären Weg die Substanzen durch die Interzellulärspalten transportiert werden, erfolgt der transzelluläre Stoffaustausch über Vermittlung bestimmter Rezeptoren direkt durch die Zelle (rezeptorvermittelte Endozytose). Auf die Mechanismen der transzellulären Permeabilität soll hier nicht näher eingegangen werden. Für die Begrenzung der parazellulären Permeabilität spielen interendotheliale Junctionen, welche die Endothelzellen miteinander verbinden, eine entscheidende Rolle (Mehta and Malik, 2006). Sie verhindern unter anderem eine Lückenbildung zwischen den Zellen und sind somit ganz wesentlich am Aufbau der Endothelbarriere beteiligt. Als wichtigste Vertreter sind Occludensjunctionen (Tight junctions, TJs) und Adhärensjunctionen (AJs) zu nennen (Abb. 1). TJs kontrollieren die parazelluläre Permeabilität, indem sie den interzellulären Spalt abdichten, AJs vermitteln die Adhäsion zwischen Endothelzellen und sind für deren mechanische Festigkeit verantwortlich. Eine gestörte Organisation der endothelialen Zelljunctionen geht mit vielen verschiedenen Krankheitsbildern beim Menschen einher (Dejana et al., 2009). Im Gegensatz zu Epithelzellen, bei denen die Zell-Zell-Junctionen typischerweise streng voneinander getrennt sind, befinden sich die AJs und TJs in Endothelzellen in räumlicher Nähe zueinander (Ruffer et al., 2004). Claudin5 und Occludin, die typischen

Transmembranproteine der endothelialen TJs, und Vascular endothelial cadherin (VE-Cadherin), das transmembrane Glykoprotein der AJs, sind über Adapterproteine der Zonula occludens-Protein (ZO)- oder Catenin-Familie an das kortikale Aktinzytoskelett gebunden (Franke, 2009). Durch diese Verbindung zwischen Aktinzytoskelett und Junctionen können Veränderungen in der Aktindynamik Einfluss auf die Integrität der AJs und TJs und somit auf die Funktion der Endothelbarriere nehmen (Vandenbroucke et al., 2008). Als weitere Junctionsmoleküle finden sich Nexus (Gap junctions, GJs). GJs bestehen aus Poren, die eine direkte Verbindung zwischen benachbarten Zellen herstellen und somit eine elektrische und metabolische Kommunikation der Zellen untereinander erlauben. Die Expression und Verteilung der einzelnen Junctionkomplexe können ganz unterschiedlich sein und sind abhängig vom Gefäßtyp und den spezifischen Anforderungen der jeweiligen Organe (Bazzoni and Dejana, 2004).



**Abb. 1: Aufbau der Endothelbarriere**

Adhärenz- und Occludensjunctionen sind wichtige strukturelle Komponenten der Endothelbarriere. Während VE-Cadherin das Transmembranprotein der AJs bildet, werden TJs durch Claudine und Occludine miteinander verbunden. Diese Proteine sind über spezifische Adaptermoleküle (Catenine, ZO) auf der zytoplasmatischen Seite mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Abb. modifiziert nach Spindler et al., 2010.

### 1.2.1.1 Adhärensjunktionen

AJs sind für die Haftung und mechanische Stabilität angrenzender Zellen verantwortlich. Als klassischer Vertreter der Adhäsionsmoleküle in Endothelzellen wird VE-Cadherin exprimiert. Die Cadherine (Calcium-dependent adhesion proteins) bestehen aus einer Transmembrandomäne, einem intrazellulären Teil und einem für die Zelladhäsion erforderlichen extrazellulären Bereich. Durch homophile Bindungen überbrücken sie den Extrazellulärraum zwischen den sich gegenüberliegenden Zellen. Im Gegensatz zur direkten Membranberührung bei TJs besteht bei AJs noch ein Abstand von 15-20 nm zwischen den Zellmembranen (Tsukita et al., 2001). Antikörper gegen VE-Cadherin führten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu einem deutlichen Anstieg der Permeabilität, was die Bedeutung von VE-Cadherin für die Integrität der Endothelbarriere verdeutlicht (Corada et al., 1999; Gotsch et al., 1997; Gulino et al., 1998; Heupel et al., 2009). An die zytoplasmatischen Domänen von VE-Cadherin binden Adaptermoleküle wie  $\beta$ -Catenin oder  $\gamma$ -Catenin (Plakoglobin) und stellen eine Verbindung zum Aktinzytoskelett her. Hierdurch nehmen sie Einfluss auf die Regulation der Zelladhäsion. Man nimmt an, dass  $\alpha$ -Catenin wiederum an  $\beta$ -Catenin und  $\gamma$ -Catenin binden kann und den Cadherin/Catenin-Komplex am Aktinfilamentsystem verankert (Mehta and Malik, 2006). Neuere Daten stellen diese statische Adapterfunktion von  $\alpha$ -Catenin jedoch in Frage (Drees et al., 2005; Yamada et al., 2005). In einer Studie von Carmeliet konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion zwischen Endothelzellen durch eine VE-Cadherin-Mutante, die keine Bindedomäne für  $\beta$ -Catenin hatte, vermindert war (Carmeliet et al., 1999). In Epithelzellen ist IQRasGTPase-aktivierendes Protein1 (IQGAP1) in der Lage, an die  $\alpha$ -Catenin-Bindedomäne von  $\beta$ -Catenin zu binden, was zur Dissoziation des  $\alpha$ -Catenins vom Cadherin-Catenin-Komplex führt und damit eine verminderte E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion zur Folge hat (Kuroda et al., 1998; Noritake et al., 2005). Ob dieser Mechanismus auch in Endothelzellen eine Rolle spielt, ist bisher ungeklärt. p120-Catenin ist ein weiteres Adapterprotein, das an der Regulation der Endothelbarriere beteiligt ist, indem es Einfluss auf die Stabilität der AJs und den Aktivitätszustand von Ras-Homologie Protein (Rho)-Guanosintriphosphat (GTP)asen nimmt (Anastasiadis and Reynolds, 2001; Davis et al., 2003; Grosheva et al., 2001; Ireton et al., 2002; Noren et al., 2000; Xiao et al., 2003). Ein Mangel an p120-Catenin hatte eine Destabilisierung der AJs zur Folge (Erez et al., 2005). Desweiteren scheint die endotheliale Permeabilität sowie die Zelladhäsion durch Phosphorylierung von

---

Komponenten des Cadherin-Catenin-Komplexes reguliert zu werden (Kim et al., 2009; Miyoshi and Takai, 2005; Reynolds, 2007). Mehrere Barriere-destabilisierende Entzündungsmediatoren wie Vascular endothelial growth factor (VEGF), Thrombin, Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- $\alpha$ ) oder Histamin induzierten die Phosphorylierung von Tyrosinresten von VE-Cadherin oder Cateninen, was zur Dissoziation der AJs vom Aktinzytoskelett führte (Andriopoulou et al., 1999; Dejana et al., 2008). Eine Depletion der VE-Cadherin-assoziierten vaskulären endothelialen Tyrosinphosphatase (VE-PTP) resultierte in einer gesteigerten Permeabilität (Nottebaum et al., 2008; Vestweber, 2008), was die Bedeutung des Phosphorylierungs-Zustandes weiter unterstreicht.

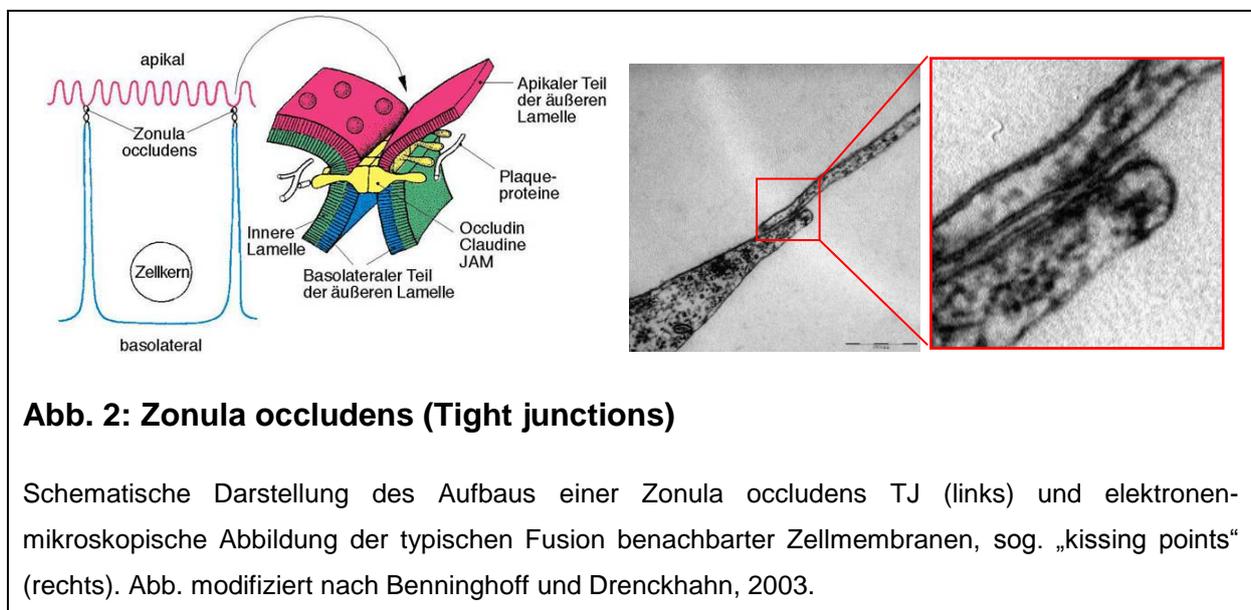
Die durch AJs vermittelte Zelladhäsion ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Endothelbarriere und stellt somit einen wichtigen Mechanismus zur Regulation der parazellulären Permeabilität dar. Störungen im Bereich der AJs haben deshalb weitreichende Konsequenzen.

#### **1.2.1.2 Occludensjunctionen (Tight junctions)**

TJs oder Zonulae occludentes sind Zell-Zell-Verbindungen, welche die äußeren Lipidlamellen zweier benachbarter Zellen gürtelähnlich miteinander verbinden. Sie verschließen den Interzellulärspalt so dicht, dass eine Barriere für die parazelluläre Diffusion von Flüssigkeit und gelösten Stoffen sowie die Migration von Zellen und Pathogenen entsteht. Je nach organspezifischen Bedürfnissen sind die TJs mehr oder weniger komplex aufgebaut. So finden sich an der Blut-Hirn-Schranke, wo die Permeabilität sehr gering ist, mehr und funktionell dichtere TJs als in postkapillären Venulen (Rubin and Staddon, 1999). Ultrastrukturell imponieren TJs als sehr enge Kontakte benachbarter Zellmembranen, die an einzelnen Stellen sogar miteinander fusionieren und als „kissing points“ bezeichnet werden (Tsukita et al., 2001). Molekular sind TJs durch Transmembranproteine und membranassoziierte Plaqueproteine aufgebaut. Zu den wichtigsten Vertretern der Transmembranproteine gehören Occludin und Proteine der Claudin-Familie, ferner zählen noch die so genannten Junctional adhesion molecules (JAMs) zu dieser Gruppe. Diese integralen Membranproteine durchziehen den Interzellulärspalt und treten homophil mit Transmembranproteinen der Nachbarzelle in Kontakt. Intrazytoplasmatisch interagieren sie mit den plaque-bildenden Adaptermolekülen ZO-1, -2, -3 und

Cingulin, welche wiederum eine Verbindung zum Aktinzytoskelett herstellen (Furuse et al., 1994; Schneeberger and Lynch, 2004; Tsukita et al., 2001). Außerdem können die ZO über Bindung zahlreicher Proteine Einfluss auf die Organisation der TJs nehmen. Daneben scheinen kleine GTPasen an der Regulation der endothelialen TJs beteiligt zu sein (Deng et al., 2011; Jou et al., 1998; Vandenbroucke et al., 2008).

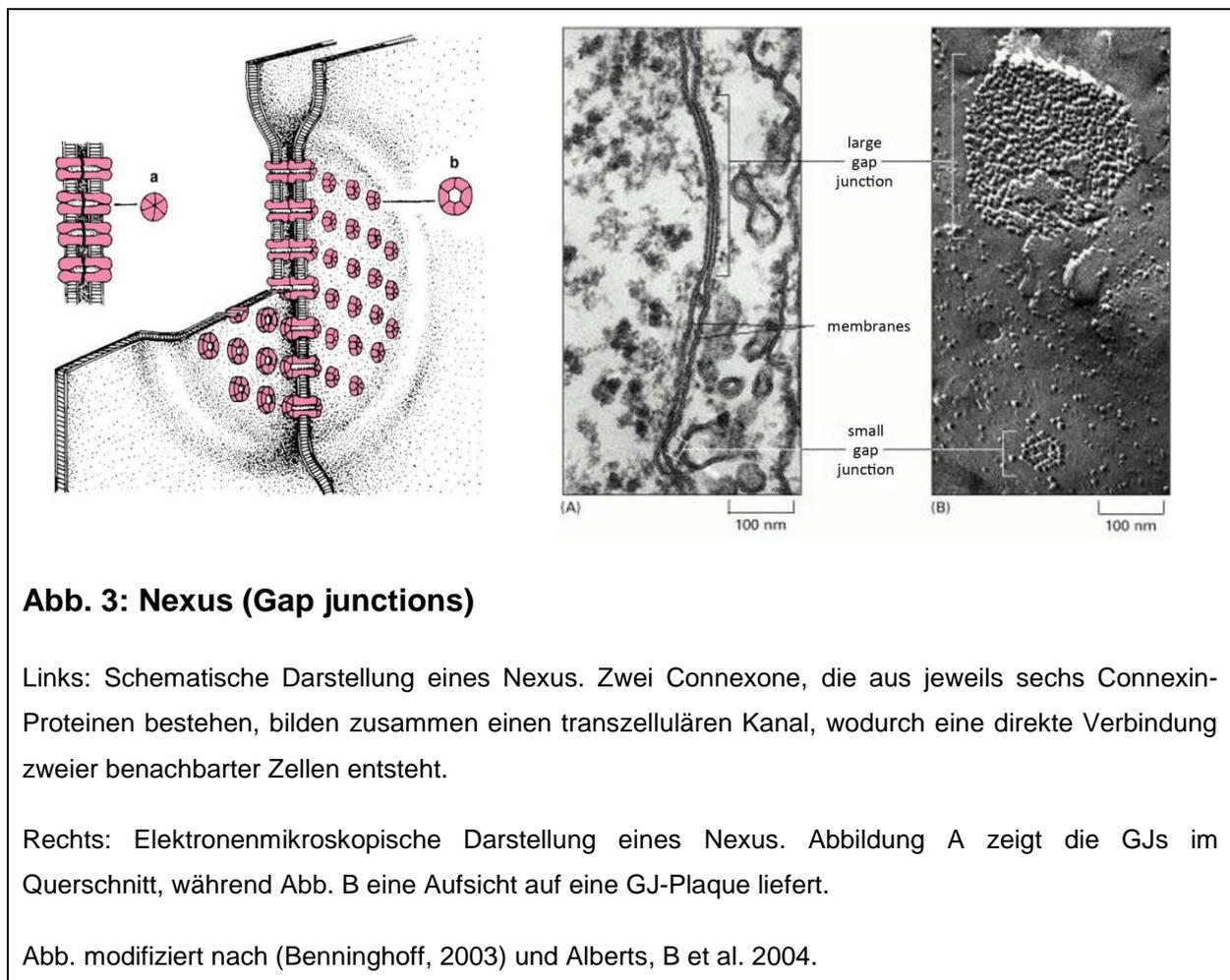
Da TJs eine zentrale Rolle für die Begrenzung der parazellulären Permeabilität spielen, liegt es nahe, dass sie in Entzündungsprozesse involviert sind. So konnten beispielsweise Thrombin und Histamin den Abbau der Junctionen induzieren und LPS eine ausgeprägte Reduktion der Claudin5-Immunfärbung an den Zellgrenzen verursachen (Schlegel et al., 2009; Wojciak-Stothard et al., 2001).



### 1.2.1.3 Nexus (Gap junctions)

GJs sind Zell-Zell-Verbindungen, die der interzellulären Kommunikation dienen. Sie bestehen aus Proteinkomplexen, die Kanäle zwischen benachbarten Zellen bilden, so dass eine direkte Verbindung der Zytoplasmata entsteht. Dies erlaubt im Zellverband die Diffusion von Molekülen und die Reizweiterleitung von elektrischen Impulsen, wie zum Beispiel in der Herzmuskulatur oder in neuronalen Zellen. In Bereichen, in denen zwei Zellen durch GJs miteinander in Kontakt treten, sind die Plasmamembranen nur durch einen schmalen Spalt (engl. gap) voneinander getrennt (Abb. 3). Ein GJ-Kanal wird durch die Kopplung zweier Halbkanäle

(Connexone) gebildet (Kumar and Gilula, 1996). Dabei setzt sich ein Connexon aus sechs Connexin43-Molekülen zusammen. Connexine sind Transmembranproteine, die sich in der Plasmamembran zu einer porenbildenden Struktur formen. Mehrere GJ-Kanäle reihen sich in der Zellmembran lokal aneinander und bilden GJ-Plaques (Caspar et al., 1977). In der Familie der Connexine unterscheidet man verschiedene Isoformen. Je nach Zusammensetzung eines Connexons bzw. eines GJ-Kanals ergeben sich unterschiedliche Eigenschaften der GJs bezüglich Permeabilität und elektrischer Leitfähigkeit (Bevans et al., 1998; Desplantez et al., 2007).



### 1.2.2 Aktinzytoskelett

Zur Aufrechterhaltung einer intakten Barrierefunktion des Endothels wird auch eine fein regulierte Dynamik der Aktinpolymerisation benötigt. Die Depolymerisation des Aktinzytoskeletts durch Cytochalasin D ging *in vivo* mit einer deutlichen Steigerung der vaskulären Permeabilität einher; *in vitro* entstanden infolge dieser Behandlung große Lücken zwischen den Endothelzellen (Waschke et al., 2005). Einen

---

besonderen Stellenwert in der Stabilisierung der Barriere scheint ein kortikaler Aktinring entlang der Zellgrenzen zu haben (Ridley et al., 1992). Das Aktin-bindende Protein Cortactin („cortical actin binding protein“) und Proteine der Wiskott-Aldrich-Syndrome Protein (WASP)-Familie können durch Induktion einer Konformationsänderung den Arp2/3-Komplex, der für Bildung und Verzweigung von Aktinfilamenten nötig ist, aktivieren und so die Aktinpolymerisation in der Zellperipherie stimulieren. So konnte gezeigt werden, dass die Barriestabilisierung durch Adenosintriphosphat (ATP) oder Sphingosine-1-phosphate (S1P) von einer Akkumulation von Cortactin entlang den Zellgrenzen begleitet war (Dudek et al., 2004; Garcia et al., 2001; Jacobson et al., 2006). Außerdem führte die reduzierte Expression von Cortactin zu einer Abschwächung der S1P- oder ATP-induzierten Barriesteigerung (Dudek et al., 2004; Jacobson et al., 2006; Zhao et al., 2009). Ein weiterer Mechanismus zumindest in Epithelzellen zur Regulation des kortikalen Aktinnetzwerkes erfolgt über die Modulation von Cofilin. Im nicht-phosphorylierten aktiven Zustand bewirkt Cofilin eine Depolymerisation der Aktinfilamente (Bamburg and Wiggan, 2002). Infolge Phosphorylierung durch LIM-Kinasen (LIMK), die durch p21-activated kinase (PAK) aktiviert werden, wird Cofilin inaktiviert und das kortikale Aktin stabilisiert (Bernard, 2007; Ridley, 2001). Darüber hinaus nimmt man an, dass das komplexe kortikale Aktinnetzwerk mit den endothelialen AJs und TJs assoziiert ist und so zur Stabilität der Zelljunctionen beiträgt (Bazzoni and Dejana, 2004; Drenckhahn D, 1997).

Die Aktin-Myosin-Kontraktion der Endothelzellen stellt einen weiteren Mechanismus dar, der an der Regulation der parazellulären Permeabilität beteiligt sein könnte. Die Myosinleichtketten-Kinase (MLCK) phosphoryliert die Myosinleichtketten (MLC), wodurch die Interaktion von Myosin mit Aktin gefördert wird und kontraktile Stressfasern (Bündel aus Aktin- und Myosinfilamenten) entstehen. Als Folge der gesteigerten Kontraktilität könnte es zur Lückenbildung zwischen benachbarten Endothelzellen und zum Zusammenbruch der Endothelbarriere kommen (Drenckhahn D, 1997; Michel and Curry, 1999). Die MLC-Phosphatase (MLCP) als Gegenspieler der MLCK führt dagegen zur Dephosphorylierung der MLC und somit zur verminderten Kontraktilität. *In vitro* ist Thrombin in der Lage, sowohl über die Aktivierung der MLCK als auch über die Inaktivierung der MLCP durch eine gesteigerte Stressfaserbildung die Kontraktion der Endothelzellen und damit einen Permeabilitätsanstieg zu induzieren (Essler et al., 1998; Vandenbroucke et al., 2008).

---

Damit sind durch die beiden Enzyme MLCK und MLCP gegensinnige Angriffspunkte für die Regulation der Endothelbarriere gegeben. Kleine GTPasen sind an der Regulation der Aktin-Myosin-Kontraktion wesentlich beteiligt.

### **1.3 cAMP und Rho-GTPasen in der Regulation der Endothelbarriere**

Dem intrazellulären Botenstoff cAMP sowie kleinen GTPasen der Rho- und Ras-Familie wurden in der Regulation der parazellulären Permeabilität eine große Bedeutung zugeschrieben und werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

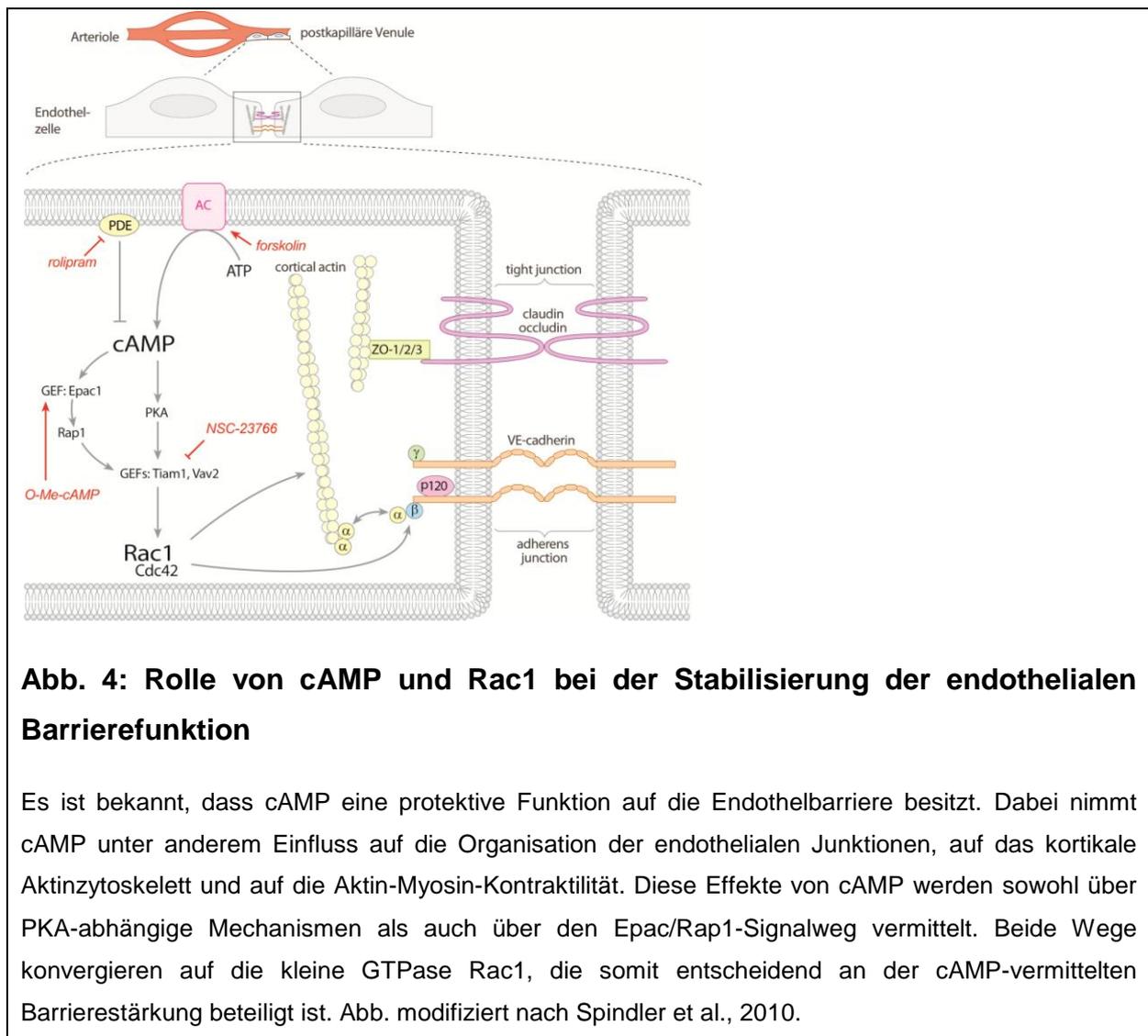
#### **1.3.1 Rolle von cAMP bei der Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion**

Botenstoffe wie das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) dienen der intrazellulären Signaltransduktion. cAMP wird durch die Adenylatcyclase (AC) aus ATP gebildet und über Phosphodiesterasen (PDE) abgebaut.

Seit langem ist bekannt, dass gesteigerte intrazelluläre cAMP-Spiegel einen stabilisierenden Effekt auf die Endothelbarriere bewirken (Michel and Curry, 1999). So konnten cAMP-steigernde Substanzen wie Forskolin oder Cholera toxin (CT), die beide die AC stimulieren, die Permeabilität *in vitro* reduzieren (Stelzner et al., 1989). Auch *in vivo* stärkte cAMP die Endothelbarriere (Michel and Curry, 1999; Seibert et al., 1992). Darüber hinaus ist cAMP in der Lage, durch Inhibition des RhoA/Rho-Kinase (ROCK)-Signalweges die durch das bakterielle Endotoxin LPS induzierte Phosphorylierung der MLC zu verhindern (Essler et al., 2000). Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenbruch der Barriere mit verminderten cAMP-Konzentrationen einherging. Der durch LPS sowie die Entzündungsmediatoren Thrombin oder TNF- $\alpha$  induzierte Permeabilitätsanstieg war von einer signifikanten Reduktion der cAMP-Spiegel begleitet (Baumer et al., 2009; Curry, 2002; Koga et al., 1995; Schlegel et al., 2009; Schlegel and Waschke, 2009; Werthmann et al., 2009). Während TNF- $\alpha$  wahrscheinlich zur Aktivierung von PDE führt (Koga et al., 1995; Seybold et al., 2005), bewirkt Thrombin möglicherweise durch eine rasche Inhibition der AC einen verminderten Spiegel an intrazellulären cAMP (Werthmann et al., 2009). Durch Anheben der cAMP-Spiegel bzw. durch Inhibition der PDE konnten die barriere destabilisierenden Effekte von LPS und TNF- $\alpha$  reduziert werden (Coimbra et al., 2006; Koga et al., 1995; Schlegel et al., 2009).

Die Mechanismen der cAMP-vermittelten Barrierestabilisierung beinhalten Proteinkinase A (PKA)-abhängige und PKA-unabhängige Signalwege. cAMP aktiviert die PKA, die wiederum über Phosphorylierung eine Reihe weiterer Prozesse reguliert. Durch die PKA-bedingte Phosphorylierung der MLCK wurde diese in ihrer Aktivität gehemmt und folglich die Aktin-Myosin-Kontraktion reduziert (Gallagher et al., 1997; Garcia et al., 1997). Ebenso wurde die Aktivität der GTPase RhoA infolge Phosphorylierung durch PKA gehemmt (Dong et al., 1998). Der durch Thrombin verursachte Permeabilitätsanstieg wurde durch cAMP unter anderem auf PKA-abhängige Weise gesenkt (Birukova et al., 2010). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch die Inhibition von PKA die Thrombin-induzierte RhoA-Aktivierung verhindert wurde (Qiao et al., 2003). Ähnlich reduzierte die Hemmung der PKA den protektiven cAMP-Effekt auf den Letales Toxin (LT)-induzierten Hydraulischen Konduktivitäts ( $L_p$ )-Anstieg *in vivo* und die Lückenbildung *in vitro* (Waschke et al., 2004b). Auch die Barriere-protektiven Effekte von Atriale natriuretischem Peptid (ANP) sowie den Prostaglandinen  $E_2$  ( $PGE_2$ ) und  $I_2$  ( $PGI_2$ ) scheinen über PKA-abhängige Signalwege reguliert zu werden (Birukova et al., 2008; Birukova et al., 2007b). Neben der Aktivierung von PKA nimmt cAMP zusätzlich Einfluss auf die Aktivität von kleinen GTPasen. In einer Studie (Fukuhara et al., 2005) führte die spezifische Inhibition von PKA nicht zum Aufheben der cAMP-bedingten Effekte auf die Permeabilität und die VE-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion, was zeigt, dass andere cAMP-nachgeschaltete Mechanismen nötig für die Barriereprotektion zu sein scheinen. Interessanterweise kam es durch die Behandlung mit dem cAMP-Analogen 8-pCT-2'-O-Me-cAMP (O-Me-cAMP), welches die GTPase Ras-related protein1 (Rap1) durch das Guanotide exchange factor (GEF) Exchange protein activated by cyclic AMP (Epac) aktiviert, exakt zu den oben genannten Veränderungen (Fukuhara et al., 2005). In mesenterialen Venulen schwächte O-Me-cAMP ebenso die durch den platelet-activating factor (PAF)-verursachte Permeabilitätsänderung ab und hob vollständig die VE-Cadherin-Reorganisation auf (Adamson et al., 2008). Der Epac/Rap1-Signalweg stellt somit einen weiteren Mechanismus in der cAMP-vermittelten Barriereregulation dar und wird im folgenden Kapitel noch genauer betrachtet. O-Me-cAMP, welches wie oben beschrieben vorzugsweise den Epac/Rap1-Signalweg stimuliert, versagte jedoch bei gleichzeitiger Rac1-Inhibition durch NSC-23766, den Transendothelialen elektrischen Widerstand (TER) zu steigern, was darauf hinweist, dass für die Rap1-vermittelte Barrierestabilisierung die

Aktivierung der Rho-GTPase Rac1 nötig ist (Baumer et al., 2009). Durch Rac1-Reduktion wurden jedoch nicht nur die protektiven Effekte von Epac/Rap1, sondern auch die von PKA unterdrückt, was zeigt, dass Rac1 im Zentrum der cAMP-vermittelten Barrierestabilisierung steht (Birukova et al., 2010; Spindler et al., 2010). Auch andere Studien verdeutlichen die Bedeutung von Rac1 für die Aufrechterhaltung einer intakten Barrierefunktion (Baumer et al., 2008b; Birukova et al., 2007b). All diese Daten deuten darauf hin, dass eine cAMP-Rac1-Achse besteht, die entscheidend an der Regulation der Endothelbarriere beteiligt ist.



### 1.3.2 Bedeutung der Rho-GTPasen und des Epac/Rap 1-Signalweges

#### Kleine GTPasen

Die kleinen GTPasen (21-25 kDa Molekulargewicht) gehören zur Gruppe der Guaninnukleotid-bindenden Proteine (G-Proteine) (Bourne et al., 1990), die eine zentrale Position in intrazellulären Signaltransduktionskaskaden einnehmen. Dabei leiten sie als molekulare Schalter Signale über Effektormoleküle weiter und nehmen so Einfluss auf verschiedenste zelluläre Prozesse. Die Rat sarcoma virus (Ras)-Superfamilie der kleinen GTPasen wird unterteilt in 5 Familien: Rho, Ras, Rab, Ran, Arf (Wennerberg et al., 2005). Die Familie der Ras homologous (Rho)-GTPasen besteht bis heute aus 23 Proteinen, für die Ras-Familie sind 36 Mitglieder bekannt (Bustelo et al., 2007; Rossman et al., 2005; Wennerberg et al., 2005). Die Rho-GTPasen haben entscheidenden Einfluss auf die Regulation des Zytoskeletts und der Zelladhäsion. Darüber hinaus sind sie an der Kontrolle der Genexpression und des Zellzyklus beteiligt (Bishop and Hall, 2000; Fritz et al., 1999; Jaffe and Hall, 2005; Ridley, 2004). Für Rap1 wurde ebenso eine regulatorische Funktion in der Verteilung von AJs beschrieben (Bos, 2005; Knox and Brown, 2002; Kooistra et al., 2007). Im Hinblick auf die Funktion der Endothelbarriere sind die Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 sowie die kleine GTPase Rap1 am besten charakterisiert.

Kleine GTPasen besitzen eine geringe intrinsische (GTP)-hydrolysierende Aktivität. Sie wechseln zyklisch zwischen einem aktiven, d.h. GTP-gebundenen Zustand, und einem inaktiven Guanosindiphosphat (GDP)-gebundenen Zustand (Wojciak-Stothard and Ridley, 2002). Der Austausch von GDP zu GTP bewirkt eine Konformationsänderung in den Switch-I- und Switch-II-Regionen und eine Aktivierung der GTPase. Nur im aktiven Zustand sind die GTPasen in der Lage, bestimmte Effektormoleküle zu binden und als molekulare Schalter in einer Vielzahl von Signalkaskaden zu agieren.

Der Zyklus der kleinen GTPasen ist streng reguliert und wird im Wesentlichen durch drei Proteinklassen kontrolliert: Guanine nucleotide exchange factors (GEFs), GTPase-activating proteins (GAPs), Guanine nucleotide dissociation inhibitors (GDIs).

GEFs sind Guaninnukleotid- (GDP/GTP-) Austauschfaktoren, welche die GTPasen in einen „aktiven Zustand“ überführen, indem sie die Dissoziation von GDP und

Magnesium ( $Mg^{2+}$ ) beschleunigen (Beckers et al., 2010). Die Spezifität der GEFs gegenüber verschiedenen Rho-GTPasen ist unterschiedlich. So interagieren z.B. T-cell lymphoma invasion and metastasis1-factor (Tiam1) und Triple functional domain protein (Trio) spezifisch mit Rac1 (Gao et al., 2001; Habets et al., 1994) und Frabin spezifisch mit Cdc42 (Obaishi et al., 1998).

GAPs steigern die intrinsische Hydrolyseaktivität, was zur Inaktivierung der GTPasen führt (Bishop and Hall, 2000; Ridley et al., 1993; Tcherkezian and Lamarche-Vane, 2007).

GDI's inhibieren die Aktivierung der kleinen GTPasen, indem sie den GTPase-GDP-Komplex stabilisieren und damit die Abspaltung von GDP verhindern (DerMardirossian and Bokoch, 2005; Longenecker et al., 1999).

### 1.3.2.1 RhoA

Die GTPase RhoA kann auf verschiedene Weise auf die Funktion der Endothelbarriere Einfluss nehmen. Ein Hauptmechanismus zumindest *in vitro* scheint dabei die Regulation der Aktin-Myosin-Kontraktilität zu sein. RhoA werden Barriere-destabilisierende Effekte zugeschrieben. Diese werden vor allem über ROCK, welche durch RhoA aktiviert wird, vermittelt (Matsui et al., 1996). ROCK führt zum einen zur Phosphorylierung der MLCP, wodurch diese in ihrer Funktion gehemmt wird und deshalb vermehrt phosphorylierte MLC vorliegen (Birukova et al., 2004; Kimura et al., 1996). Außerdem kann ROCK auch direkt MLC phosphorylieren (Amano et al., 1996). Insgesamt kommt es so über eine verstärkte Stressfaserbildung zur gesteigerten Kontraktilität und daraus folgend zur erhöhten Permeabilität. Für einige Entzündungsmediatoren wie Thrombin, Histamin, VEGF, LPS oder TNF- $\alpha$  konnte gezeigt werden, dass sie unter anderem über RhoA/ROCK-vermittelte Kontraktion einen Permeabilitätsanstieg verursachen (Essler et al., 2000; van Nieuw Amerongen et al., 2000; Vandenbroucke et al., 2008; Wojciak-Stothard and Ridley, 2002). Durch die Inhibition von RhoA durch C3-Transferase konnten die Barriere-destabilisierenden Effekte von Thrombin, Histamin und TNF- $\alpha$  *in vitro* vermindert werden (Carbajal and Schaeffer, 1999; Essler et al., 1998; Wojciak-Stothard et al., 1998; Wojciak-Stothard et al., 2001). Ebenso wurde der Thrombin-induzierte Barrierezusammenbruch durch den ROCK-Inhibitor Y-27632 in kultivierten mikro-

und makrovaskulären Endothelzellen gehemmt (Baumer et al., 2009; Birukova et al., 2004; van Nieuw Amerongen et al., 2000). Die RhoA/ROCK-vermittelte Kontraktion scheint *in vitro* entscheidenden Einfluss auf die Funktion der Endothelbarriere zu nehmen. Auch in intakten isolierten Koronarvenulen konnte die Blockade des RhoA/ROCK-Signalweges die VEGF-induzierte Barrierschädigung verhindern (Sun et al., 2006). Allerdings konnte in einigen *in vivo*-Studien, in denen  $L_p$ -Messungen als Maß der Permeabilität durchgeführt wurden, gezeigt werden, dass durch die Inhibition von ROCK mit Y-27632 oder durch die Hemmung der MLCK zwar die Grundpermeabilität reduziert werden konnte, diese Inhibitoren jedoch nicht in der Lage waren, den TNF- $\alpha$ -, PAF-, Bradykinin- oder LT-induzierten Permeabilitätsanstieg in intakten Mikrogefäßen abzuschwächen (Adamson et al., 2002; Adamson et al., 2003; Schlegel and Waschke, 2009; Waschke et al., 2004c). Damit scheint die Aktin-Myosin-Kontraktion als ein Mechanismus zur Permeabilitätssteigerung eine unterschiedliche Relevanz für *in vitro*- und *in vivo*-Bedingungen zu besitzen, was zeigt, dass weitere Mechanismen die Funktion der Endothelbarriere regulieren und die RhoA/ROCK-vermittelte Kontraktion nicht in jedem Fall für den Zusammenbruch der Endothelbarriere verantwortlich ist. So könnte RhoA und ROCK ihre Barriernegativen Wirkungen auch über Modulation der endothelialen Junctionen vermitteln. Permeabilitätserhöhende Mediatoren wie Thrombin oder TNF- $\alpha$  induzierten die Aktivierung von RhoA, was von einem Zusammenbruch der Junctionen begleitet war (Vandenbroucke et al., 2008; Wojciak-Stothard and Ridley, 2002). Durch Hemmung der GTPase RhoA oder ihres Effektors ROCK konnte der Abbau der AJs und TJs, der durch Thrombin oder Histamin veranlasst wurde, verhindert werden (Wojciak-Stothard et al., 2001). Ferner konnte gezeigt werden, dass eine wechselseitige Beziehung zwischen RhoA und der Bildung von TJs besteht. Durch Bindung von Cingulin, einem Adapterprotein der TJs, an GEF-H1, das als GTP-Austauschfaktor von RhoA fungiert, wurde RhoA inaktiviert (Aijaz et al., 2005). Insgesamt trägt der Aktivitätszustand von RhoA somit wesentlich zur Regulation der Endothelbarriere bei.

### 1.3.2.2 Rac1

Im Vergleich zu RhoA, der eine negative Wirkung auf die endotheliale Barrierefunktion zugeschrieben wird, zeichnet sich die kleine GTPase Rac1 überwiegend durch protektive Effekte aus. RhoA und Rac1 verhalten sich somit

antagonistisch in der Regulation der Endothelbarriere (Wojciak-Stothard and Ridley, 2002). Die cAMP-nachgeschalteten Signalwege über PKA und Epac/Rap1 münden unter anderem in der Aktivierung von Rac1, was entscheidend zur Barriestabilisierung beiträgt (Birukova et al., 2010; Birukova et al., 2007b). Sowohl die Inhibition von Rac1 mit NSC-23766 als auch die Expression einer konstitutiv inaktiven Rac1-Mutante in Endothelzellen gingen mit einer gestörten Barrierefunktion *in vitro* einher (Baumer et al., 2009; Vouret-Craviari et al., 2002; Wojciak-Stothard et al., 2001). Auch in der Pathogenese des LPS-induzierten Barrierezusammenbruchs scheint die Inaktivierung von Rac1 eine zentrale Rolle zu spielen (Peng et al., 2004; Schlegel et al., 2009). Die GTPase Rac1 vermittelt ihre Effekte über verschiedene Mechanismen. Einen wesentlichen Beitrag zur endothelialen Stabilisierung durch Rac1 könnte die Stärkung des kortikalen Aktinringes leisten (Ridley, 2001). Aktivierung von Rac1 und Cdc42 konnte die Barriere in mikrovaskulären myokardialen Endothelzellen der Maus (MyEnds) stärken, indem es die Translokation der Aktin-bindenden Proteine Cortactin und Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) an die Zelljunctionen und darauf folgend den Aufbau eines komplexen Aktinnetzwerkes an den Junctionen induzierte (Waschke et al., 2006). Ein ähnliches Bild zeigte sich durch die Behandlung von mikrovaskulären Endothelzellen mit Forskolin/Rolipram (F/R) oder O-Me-cAMP, die beide zu einer Aktivierung von Rac1 führten (Baumer et al., 2008b). Eine Schlüsselrolle in der Verstärkung des kortikalen Aktinzytoskeletts spielt die Aktivierung des Arp 2/3-Komplexes, welcher den Ausgangspunkt für die Bildung der verzweigten Aktinfilamente darstellt (Weed and Parsons, 2001). Durch Bindung von IQGAP1 verhinderte Rac1 die Interaktion von IQGAP1 mit  $\beta$ -Catenin, was zur verstärkten Anheftung von  $\beta$ -Catenin an  $\alpha$ -Catenin führte und so den Cadherin-Catenin-Komplex stabilisierte (Fukata et al., 1999; Kuroda et al., 1998). Desweiteren ist Rac1 in der Lage, durch Aktivierung von Proteinen der PAK-Familie Einfluss auf die Aktin-Myosin-Kontraktilität und die Organisation der kortikalen Aktinfilamente zu nehmen. PAKs hemmen zum einen die Zellkontraktion durch Inhibition der MLCK. Außerdem aktivieren sie in Epithelzellen die LIMK, die wiederum Cofilin phosphoryliert und inaktiviert, was zur Stabilisierung des kortikalen Aktinzytoskeletts führt (Bernard, 2007; Ridley, 2001). Ein entscheidender Mechanismus, um die Endothelbarriere zu stabilisieren, könnte durch Modulation der endothelialen Junctionen erfolgen. Während unter Bedingungen verbesserter Barrierefunktion die VE-Cadherin-vermittelte Adhäsion gesteigert war

(Fukuhara et al., 2005; Kooistra et al., 2005), kam es durch die inhibierende Glykosylierung von Rac1 durch LT neben einem Permeabilitätsanstieg zur reduzierten Adhäsion VE-Cadherin-beschichteter Mikroperlen an der Oberfläche kultivierter Endothelzellen (Baumer et al., 2008a; Waschke et al., 2004a; Waschke et al., 2004c). Der *in vivo* und *in vitro* durch LPS hervorgerufene Permeabilitätsanstieg war von deutlicher interzellulärer Lückenbildung und reduzierter Rac1-Aktivität begleitet, ferner zeigten sich eine fragmentierte VE-Cadherin- und eine reduzierte Claudin5-Immunfärbung entlang den Zellgrenzen (Schlegel et al., 2009). Darüber hinaus nimmt Rac1 Einfluss auf die Organisation der TJs und ihrer Adapterproteine (ZO-1) (Jou and Nelson, 1998; Popoff and Geny, 2009; Wojciak-Stothard et al., 2001).

Einige dieser Rac1-vermittelten Effekte scheinen über das Rac1-spezifische GEF Tiam1 reguliert zu werden (Birukova et al., 2008; Birukova et al., 2007b). Hepatocyte growth factor (HGF) und Oxidierte Phospholipide (PAPC: 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-phosphatidylcholine) (OxPAPC) vermitteln ihre barriereprotektiven Eigenschaften, indem sie die Aktivierung von Rac1 über Tiam1 induzieren. So wurden durch die Transfektion der Endothelzellen mit Tiam1-spezifischer Small interfering RNA (siRNA) die HGF- oder OxPAPC-vermittelte Barrierestabilisierung, ebenso wie die periphere Translokation des Rac1-Effektors Cortactin oder die kortikale Aktinringbildung abgeschwächt (Birukova et al., 2007a; Cullere et al., 2005). Ausserdem könnte eine gewisse Hierarchie unter den kleinen GTPasen bestehen, in der Rac1 die Aktivität von RhoA kontrolliert. HGF beispielsweise vermittelte seine protektiven Effekte, indem es durch Rac1 die Assoziation von RhoA mit p115-RhoGEF und damit die Thrombin-induzierte Aktivierung von RhoA inhibierte (Birukova et al., 2007a). Daneben führte Rac1 in Epithelzellen zur Translokation von p190RhoGAP an AJ-Proteine, wo es mit p120-Catenin interagierte. Dadurch wurde eine lokalisierte Inhibition von RhoA erreicht, was für eine korrekte Bildung der AJs erforderlich war (Wildenberg et al., 2006). Ein weiterer Beleg für die übergeordnete Funktion von Rac1 zeigte sich dadurch, dass durch Hypoxie Rac1 vorübergehend inhibiert wurde und dies zur Aktivierung von RhoA führte, was von Stressfaserbildung und gesteigerter Permeabilität begleitet war (Wojciak-Stothard et al., 2005). Schließlich gibt es Hinweise darauf, dass nicht nur die Rho-GTPasen Einfluss auf die Zelladhäsion nehmen können, sondern auch umgekehrt die VE-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion die Aktivität der GTPasen so modulieren

können, dass die endothelialen AJs verstärkt werden (Watanabe et al., 2009). Die Unterbrechung dieser positiven Signalschleife könnte einen weiteren Angriffspunkt für entzündliche Prozesse darstellen.

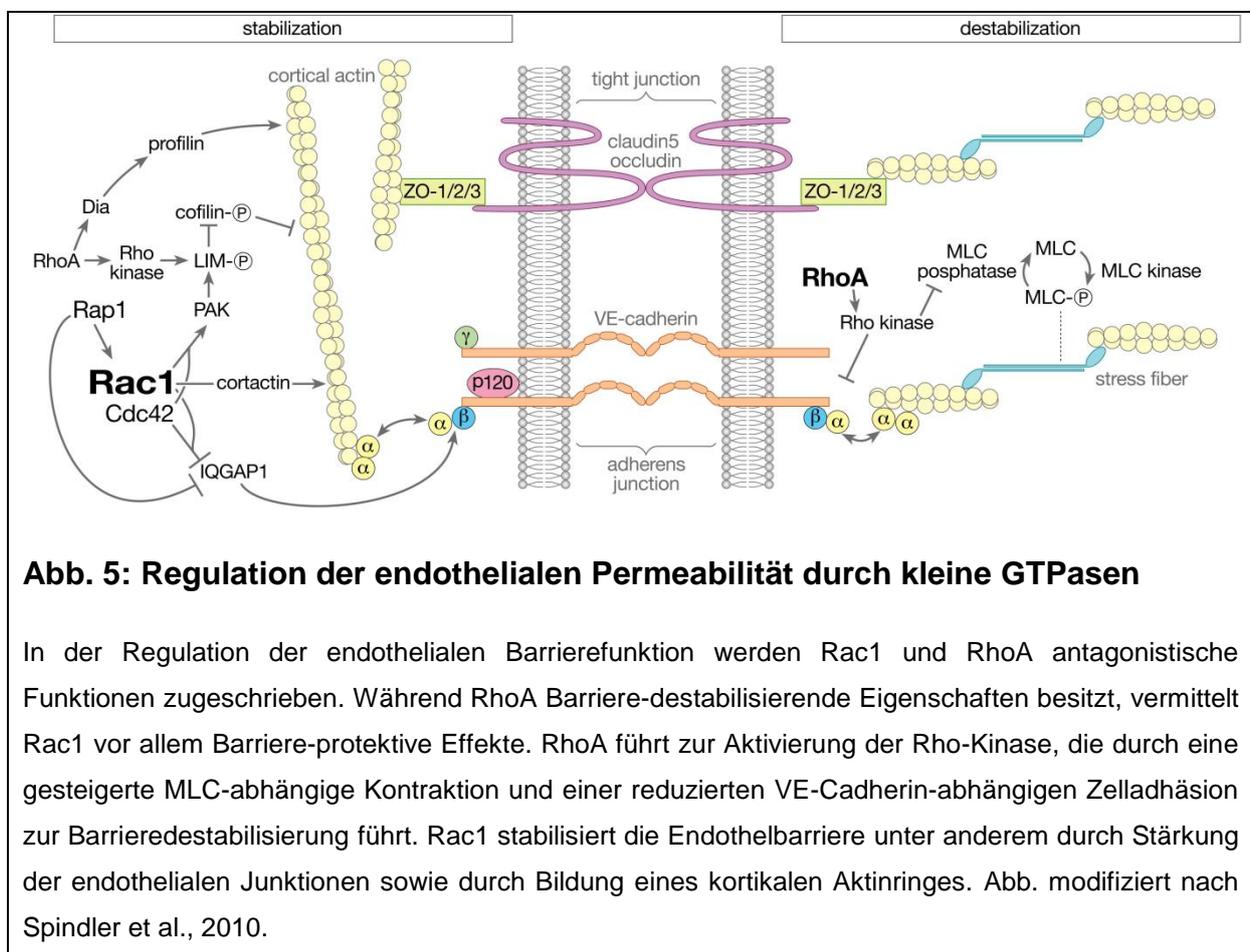
### **1.3.2.3 Cdc42**

Die Rho-GTPase Cdc42 scheint ebenso wie Rac1 positiv regulierend auf die Endothelbarriere einzuwirken. Durch die Expression von konstitutiv aktivem Cdc42 konnte der LPS-induzierte Anstieg der pulmonalen Permeabilität abgeschwächt werden (Ramchandran et al., 2008). Ähnlich konnten die protektiven Effekte von OxPAPCs durch eine dominant-negative Cdc42-Mutante gehemmt werden (Birukov et al., 2004). Einen besonderen Stellenwert scheint Cdc42 in der Wiederherstellung der Endothelbarriere zu haben. Etwa eine Stunde nach Exposition der Endothelzellen mit Thrombin, das durch Destabilisierung der AJs zum Zusammenbruch der Barriere führte, kam es zur Aktivierung von Cdc42 und gleichzeitig zu dessen Translokation an die Zellmembran. Parallel dazu erholten sich die AJs und die Endothelbarriere wurde funktionell erneuert. Durch Expression einer konstitutiv negativen Cdc42-Mutante verlief die Wiederherstellung der Barriere deutlich verzögert (Kouklis et al., 2004).

### **1.3.2.4 Epac/Rap1**

Rap1 ist eine weitere GTPase, die regulierend auf die Funktion der Endothelbarriere eingreift. Es ist bekannt, dass Rap1 entscheidend zur Aufrechterhaltung und Stabilisierung der Barriere beiträgt. Epac ist ein spezifisches GEF für Rap1 und wird direkt und somit unabhängig von PKA durch cAMP aktiviert (de Rooij et al., 1998). Daher besteht neben PKA ein weiterer Signalweg, über den cAMP Einfluss auf zelluläre Prozesse nehmen kann. Mithilfe des cAMP-Analogons O-Me-cAMP, das selektiv Epac/Rap1 aktiviert, können Effekte dieser Signalkaskade besser untersucht werden. In postkapillären Venulen von Rattenmesenterium reduzierte O-Me-cAMP deutlich den Permeabilitätsanstieg durch PAF (Adamson et al., 2008). Auch in HDMECs führte die Behandlung mit O-Me-cAMP zur Steigerung der Barrierefunktion (Baumer et al., 2008b). Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass durch Ausschalten von Rap1 via siRNA sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die protektiven Effekte von

Iloprost (PGI<sub>2</sub>) verhindert wurden (Birukova et al., 2009). Durch Aktivierung von Rac1 trägt der Epac/Rap1-Signalweg zur Stabilisierung der Endothelbarriere bei (Baumer et al., 2008b; Birukova et al., 2010; Birukova et al., 2007b). Als Mechanismen der Rap1-vermittelten Barrierestärkung konnten eine gesteigerte VE-Cadherin-abhängige Adhäsion, eine Reorganisation der AJ- und TJ-Moleküle und ein stark ausgebildetes kortikales Aktinzytoskelett nachgewiesen werden (Cullere et al., 2005; Fukuhara et al., 2005; Kooistra et al., 2005). Desweiteren könnte Rap1 durch Einfluss auf die RhoA-Aktivität oder auf IQGAP1 in der Regulation der Endothelbarriere eingreifen (Jeong et al., 2007; Krugmann et al., 2004). Insgesamt stellt Epac/Rap1 einen essenziellen Baustein in der Barriere-protectiven cAMP/Epac-Rap1/Rac1-Signalachse dar.



## 1.4 Zielsetzung der Doktorarbeit

Die Endothelbarriere spielt eine zentrale Rolle in der Kontrolle der Gefäßpermeabilität. Bereits kleinste Störungen in der Funktion und der Regulation der Barriere führen zu zahlreichen pathologischen Zuständen im menschlichen Organismus. Einen wesentlichen Beitrag für eine intakte Barrierefunktion leisten dabei die endothelialen Junctionen, vor allem AJs und TJs. Seit längerem ist bekannt, dass intrazelluläre Botenstoffe wie cAMP und kleine GTPasen der Rho- und Ras-Familie an der Regulation der Barriere beteiligt sind, indem sie Einfluss auf die endothelialen Junctionen, das Aktinzytoskelett und die Aktin-Myosin-Kontraktilität nehmen. Ziel dieser Arbeit war es nun zum einen herauszufinden, über welche Signalwege die Barriere-stabilisierenden Effekte von cAMP vermittelt werden, welchen Beitrag der Epac/Rap1-Signalweg dabei leistet und wie stark die Effekte von Rac1 abhängig sind. Da es bisher nur wenige Daten gibt, welche morphologischen Veränderungen den Barriere-protectiven Effekten zugrunde liegen, zielte die gegenwärtige Studie außerdem darauf ab, die interzelluläre Kontaktzone genauer mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ultrastrukturell zu untersuchen und die morphologischen Charakteristika, die sich durch cAMP-Anstieg und Rac1-Aktivierung ergaben, mit biochemischen und funktionellen Veränderungen *in vivo* und *in vitro* zu korrelieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Kulturzellen

Es wurden drei Zelllinien in Kultur gehalten. Dabei handelte es sich sowohl um makrovaskuläre als auch um mikrovaskuläre Endothelzellen. Makrovaskuläre pulmonale Schweineendothelzellen (PSECs) wurden aus der Arteria pulmonalis durch eigenständige Präparation gewonnen. Als mikrovaskuläre Zelllinien dienten primäre humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMECs) und mikrovaskuläre myokardiale Endothelzellen (MyEnds). HDMECs wurden aus Brustexplantaten isoliert und von der Firma PromoCell (Heidelberg) bezogen. MyEnds wurden aus Herzen neonataler Mäuse in unserem Labor präpariert und nach Immortalisierung kultiviert.

**Tab.1: Überblick Zelllinien**

|        |               |                |                           |         |
|--------|---------------|----------------|---------------------------|---------|
| PSECs  | makrovaskulär | Primärzellen   | (Schnittler et al., 1990) | Schwein |
| HDMECs | mikrovaskulär | Primärzellen   | PromoCell (Heidelberg)    | Mensch  |
| MyEnds | mikrovaskulär | immortalisiert | (Golenhofen et al., 1999) | Maus    |

#### 2.1.2 Kulturmedien

PSECs wurden in Medium 199 (M199, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) kultiviert und wuchsen auf Kollagen I-beschichteten Deckgläschen bis zur Konfluenz. Dem Medium wurde 50 U/ml PenicillinG, 50 µg Streptomycin (P/S) (beide Sigma-Aldrich) und in Passage (p)0 20% fetales Kälberserum (FCS) (Biochrom, Berlin, Deutschland), anschließend ab p1 10% FCS zugesetzt. Für die jeweiligen Versuche wurden die Zellen in den p2-3 verwendet.

HDMECs wurden auf unbeschichteten Deckgläschen ausgesät und in Endothelial Growth Medium (PromoCell) gehalten. Dem Nährmedium wurde ein Supplement-Mix (PromoCell) und ebenso P/S wie bei M199-Medium zugegeben. Der Gebrauch der Zellen erfolgte in den p2-5.

MyEnd-Zellen wuchsen auf Kollagen I-beschichteten Deckgläschen in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), das mit 10% FCS und P/S versetzt wurde.

Alle Zelllinien wurden in einem offenen System in einem Brutschrank bei 37°C, 5% Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) und ca. 80% Luftfeuchtigkeit gehalten.

**Tab. 2: Überblick Medien**

| <u>Zelllinie</u> | <u>Medium</u>                | <u>Hersteller des Mediums</u> | <u>Zusätze</u>                   |
|------------------|------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| PSECs            | M199                         | Sigma-Aldrich, Steinheim      | P/S; p0: 20% FCS; ab p1: 10% FCS |
| HDMECs           | Endothelial<br>Growth Medium | PromoCell, Heidelberg         | P/S; Supplement Mix-Zugabe       |
| MyEnds           | DMEM                         | Life Technologies, Karlsruhe  | P/S; 10% FCS                     |

### 2.1.3 PSEC-Präparation

Die Präparation aus frischen Truncus pulmonalis-Präparaten erfolgte unter sterilen Bedingungen. Nach Abtrennen der Aorta wurde der Truncus pulmonalis weiter von Bindegewebe befreit und mit sterilem PBS gewaschen. Das Gefäß wurde mit Kollagenose-Lösung gefüllt und nach beidseitigem Abklemmen in warme Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) in ein 37°C-Wasserbad für ca. 10 min gegeben. Anschließend wurde die Lösung abgegossen und durch 5 ml warmes M199 ohne FCS ersetzt und die Arterie vorsichtig massiert. Durch die Ablösung der Endothelzellen entstand eine Zellsuspension, die in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt wurde. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1000 g wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in 5 ml M199 mit 20% FCS aufgenommen und anschließend in eine Kollagen I-beschichtete Zellkulturflasche übertragen. 2 h später sowie 24 h nach Präparation wurde das Medium gewechselt. Während bei p0 die Zellen mit 20% FCS in Kultur gehalten wurden, wurde ab p1 auf 10% FCS reduziert.

## 2.2 Antikörper und Testreagenzien

### 2.2.1 Testreagenzien

#### Forskolin und Rolipram (F/R):

Um den cAMP-Spiegel in den Zellen zu erhöhen, wurden Forskolin und Rolipram (beide Sigma-Aldrich) in Kombination für 60 min auf die Zellen gegeben. Forskolin (5  $\mu\text{M}$ ) stimuliert die AC. Rolipram (10  $\mu\text{M}$ ) ist ein Hemmstoff des Enzyms PDE-4, wodurch der intrazelluläre Abbau von cAMP inhibiert wird.

#### O-Me-cAMP: (8-(4-chloro-phenylthio)-2'-O-methyladenosine-3'-5'-cyclic monophosphate)

Das cAMP-Analogon O-Me-cAMP (Biolog, Bremen, Deutschland; 200  $\mu\text{M}$  für 60 min) stellt einen selektiven Aktivator des cAMP nachgeschalteten Epac/Rap1-Signalweges dar. Die durch die PKA vermittelten Signalwege werden in den hier verwendeten Konzentrationen nicht stimuliert (Adamson et al., 2008; Baumer et al., 2009; Fukuhara et al., 2005).

#### NSC-23766:

Das lichtempfindliche NSC-23766 (Calbiochem/Merck, Darmstadt, Deutschland; 200  $\mu\text{M}$  für 30 min) hemmt die Aktivierung von Rac1, indem es die Bindung der Rac1-spezifischen GEFs Trio und Tiam1 blockiert. Dadurch wird die Rac1-GDP/GTP-Austauschaktivität gestört und Rac1 reversibel gehemmt (Gao et al., 2004).

## 2.2.2 Antikörper und Aktinfilament-Darstellung

Die Antikörper wurden für die indirekte IF-Mikroskopie eingesetzt.

**Tab. 3: Übersicht Antikörper**

### Primärantikörper

| <u>Zielstruktur</u> | <u>Typ</u> | <u>Verdünnung</u> | <u>Hersteller</u>      | <u>Sekundärantikörper</u> | <u>Wirt</u> |
|---------------------|------------|-------------------|------------------------|---------------------------|-------------|
| Claudin-5           | polyklonal | 1:50              | Invitrogen, Darmstadt  | garb                      | rabbit      |
| VE-Cadherin         | polyklonal | 1:100             | Santa Cruz, Heidelberg | dag                       | goat        |

### Sekundärantikörper

| <u>Antikörper</u> | <u>Abk.</u> | <u>Verdünnung</u> | <u>Hersteller</u> |
|-------------------|-------------|-------------------|-------------------|
| goat anti-rabbit  | garb        | 1:600             | Dianova, Hamburg  |
| donkey anti-goat  | dag         | 1:600             | Dianova, Hamburg  |

Zur Darstellung der Aktinfilamente wurde Alexa488-Phalloidin verwendet (1:60 in PBS; Mobitec, Göttingen). Phalloidin ist eines der Toxine des Grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*), welches eine hohe Affinität zu F-Aktin besitzt. Durch die Kopplung an den fluoreszierenden Farbstoff Alexa 488 können die Aktinfilamente sichtbar gemacht werden.

## 2.3 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Für die ultrastrukturellen Untersuchungen am Elektronenmikroskop wurden die Proben nach einem Standardprotokoll vorbereitet (Wijsman and Shivers, 1998).

### 2.3.1 Fixierung und Epon-Einbettung

Nach Inkubation konfluenter Endothelzellschichten mit den verschiedenen Reagenzien wurden diese mit 2,5% Glutaraldehyd (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 0,01% Ruthenium Red (Serva, Heidelberg, Deutschland) in 0,1 M Cacodylsäurepuffer pH 7,35 (Roth, Karlsruhe, Deutschland) für mindestens 1 h bei 4°C fixiert. Danach wurden die Zellen in Epon 812 (Serva, Heidelberg, Deutschland) eingebettet. Hierzu wurden die fixierten Zellen 3x für jeweils 5 min mit 0,1 M

Cacodylsäurepuffer gespült und mit 2% Osmiumtetroxid ( $\text{OsO}_4$ ) in 0,1 M Cacodylsäurepuffer für 1 h bei RT nachfixiert. Da das Einbettungsmedium nicht wasserlöslich ist, mussten die Zellen nach erneutem Spülen mit 0,1 M Cacodylsäurepuffer (jeweils 3x 5 min) nun in Methanol in aufsteigender Konzentration dehydriert werden. Dafür wurden die Zellen jeweils für 10 min in 25%, dann in 50% und schließlich in 70% Methanol entwässert. Anschließend erfolgte unter Abdunkelung die einstündige Inkubation in gesättigtem Uranylacetat (UA) in 70% Methanol. Nach Fortsetzung der Entwässerungsreihe (80%, 2x 95%, 2x 100%; jeweils 10 min) wurden die Proben mit Ethoxy-Propanol (2x 10 min) behandelt und schließlich mit Epon 812 (Herstellung s.o.) für ca. 1 h eingebettet.

Die frisch mit Epon gegossenen Beemkapseln wurden auf die Deckgläschen gestülpt und dann 48 h bei 60° auspolymerisiert. Anschließend wurden die Deckgläschen mit Flußsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim) abgelöst und es wurde ein die Zellschicht tragender Keil aus dem Block ausgesägt, der um 90° gedreht in eine neue mit Epon gefüllte Flacheinbettungsform platziert wurde, die mit Epon aufgefüllt wurde und für weitere 2 Tage auspolymerisierte. Ziel dieses „Umblockens“ war es, dass die Zellen orthogonal angeschnitten und als einschichtiger Zellverband sichtbar werden.

### **2.3.2 Ultramikrotomie und Kontrastierung**

Vor dem Schneiden wurden die Kunstharzblöcke von Hand getrimmt. Dazu wurde der Block in einen Präparatehalter fest eingespannt und unter lichtmikroskopischer Kontrolle (Auflichtmikroskop) mit einer scharfen Rasierklinge zunächst das oberflächliche Harz parallel zur Oberfläche abgetragen bis der Zellverband als schmaler schimmernder, reflektierender Streifen durchschien. Anschließend wurde der Block so zugespitzt, dass die gewünschte Präparatstelle freigelegt wurde, welche geschnitten werden sollte. Dann wurden mit frischen Glasmessern Semidünnschnitte (0,5-1  $\mu\text{m}$ ) hergestellt, die auf einen Objektträger überführt und mit Methylblau angefärbt wurden. Dies sollte zur Orientierung im Gewebe und der Vorabkontrolle von Fixierung und Einbettung dienen. Im Anschluss erfolgte die Herstellung der Ultradünnschnitte (Schichtdicke: 60-70 nm). Dazu verwendete man ein 45° 3.0 mm Diatome Ultra-Diamantmesser (Reichert-LABTEC, Wofratshausen). Die Schnitte wurden in einem mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) gefülltem Becken gesammelt, mit Chloroform entfaltet und schließlich auf Netzchen übertragen. Beide

Schnittverfahren (Glas-/Diamantmesser) waren an die Nutzung eines Ultramikrotoms (Ultracut E, Reichert-Jung, Nußloch, Deutschland) gebunden.

Um eine Erhöhung des Kontrastes im Gewebe zu erreichen, erfolgte an den auf Netzchen aufgezogenen Ultradünnschnitten eine Positivkontrastierung mit UA und Bleicitrat (Reynolds, 1963).

Zunächst wurden radioaktives 2% UA (Serva, Heidelberg, Deutschland) in 50% Ethanol und Bleicitrat (Agar-Scientific, Berkshire, England), das 1:1 in Aqua dest. verdünnt wurde, in Reaktionsgefäßen vorgelegt und 5 min bei 16000 g zentrifugiert.

Anschließend wurden UA-Tropfen auf ein Stück Parafilm aufgetragen und die Netzchen mit den Ultradünnschnitten für 20 min bei Abdeckung inkubiert. Danach wurde mit 50 % Ethanol und Aqua dest. gespült. Bevor nun die Bleicitratkontrastierung erfolgte, musste der Parafilm ausgetauscht werden und Natriumhydroxid-Plätzchen um den Parafilm verteilt werden. Diese sollten den Niederschlag von Bleicarbonat auf den Schnitten verhindern. Unter Abdunkelung wurden die Netzchen für 7 min in Bleicitrat inkubiert und anschließend erneut mehrfach in Aqua dest. gespült.

Nach Trocknung der Ultradünnschnitte wurden sie mit einem LEO 912 AB Elektronenmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) analysiert. Zur Quantifizierung wurden Schnitte von mindestens 3 PSECs oder 4 HDMECs unabhängigen Kulturen für jede experimentelle Bedingung verwendet. Die Ergebnisse wurden mit einer integrierten Kamera (CCD-Slow-Scan-Kamera; Moorenweis/ITEM Version 2004 soft imaging system, Münster/Westfalen) dokumentiert.

Für die Bearbeitung und Messungen der Abbildungen wurde das Programm ITEM verwendet. Die Ergebnisse wurden mittels Microsoft Excel ausgewertet.

### **2.3.3 Herstellung von Gewebepreparaten aus Rattenmesenterium**

Zur elektronenmikroskopischen Darstellung postkapillärer Venulen wurden Rattenmesenterien verwendet. Die Venulen wurden mit einer Kanüle angestochen und für 60 min mit einer Ringer-/BSA-Lösung perfundiert. Um die angestochene postkapilläre Venule später leichter aufzufinden, wurde 10 mg/mL Lanthannitrat zur Ringer-Lösung hinzugefügt und weitere 20 Sekunden perfundiert. Lanthannitrat stellt

ein elektronendichtes Kontrastierungsmittel dar, welches sich an die Zellmembranen intraluminal lagert und nur schwer ausgewaschen werden kann (Adamson and Michel, 1993). Das gefäßtragende Mesenterium wurde herausgeschnitten und für 5 h bei 4°C fixiert. Anschließend wurde das Gewebe analog den oben geschilderten Zellkulturen in Epon eingebettet und Ultradünnschnitte angefertigt, welche das Gefäß im Querschnitt darstellen sollten. Nach Kontrastierung der Schnitte mit UA/Bleicitrat konnten die Gefäße unter dem TEM ultrastrukturell untersucht werden.

## **2.4 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie**

### **2.4.1 Methode**

Fluoreszenz-Farbstoffe sind in der Lage, kurzwelliges Licht zu absorbieren und gleichzeitig längerwelliges sichtbares Licht zu emittieren.

Zunächst wurden die Zellen auf Deckgläschen (Durchmesser 12 mm) in Petrischalen ausgesät und bis zur Konfluenz im jeweiligen Nährmedium gehalten. Mit Erreichen der Konfluenz erfolgte die Behandlung mit den verschiedenen Mediatoren. Nach der Inkubation im Brutschrank (37°C; 5% CO<sub>2</sub>) und anschließendem 3x PBS-Waschen wurden die Zellen auf den Deckgläschen mit Formalin (hergestellt aus Paraformaldehyd, PFA) über 10 min bei RT fixiert und anschließend für 5 min mit 0,1% Triton-X-100 in PBS permeabilisiert. Nach erneutem Spülen mit PBS wurden jeweils zwei Deckgläschen auf einen Objektträger übertragen. Zur Absättigung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen wurden die Zellen mit Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin, BSA)/Normal goat serum (NGS) oder 10% Normal donkey serum (NDS) (abhängig von der Wahl des Zweitantikörpers: 10% NDS bei VE-Cadherin/dag, BSA/NGS bei Claudin5/garb) für 60 min bei RT behandelt. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper in entsprechender Konzentration in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht. Danach wurden die Objektträger mit PBS gespült und der mit Fluorochrom-markierte Zweitantikörper für 60 min bei RT zugegeben. Anschließend wurden die Zellen erneut 3x für jeweils 5 min mit PBS gespült und dann zum Schutz vor Ausbleichen mit 1% n-propyl-Gallat (NPG) mit 60% Glycerin in PBS eingedeckt. Dabei wurden die Deckgläschen in Aqua dest. gespült und mit der Zellseite nach unten auf einen Objektträger, auf dem 5-10 µl NPG

pipettiert wurde, verbraucht. Zur Verdünnung aller Antikörper wurde PBS/Natriumazid verwendet.

Die gefärbten Zellrasen wurden mit einem Laser-Konfokal-Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena, Deutschland) mittels eines 63x NA 1,4 Öl Objektivs photographiert. Die angefertigten Bilder wurden zunächst mit dem Programm Zeiss LSM 5 Image Browser bearbeitet und in Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, San Jose, USA) weiterverarbeitet und zusammengestellt.

#### **2.4.2 Quantifizierung der Immunfluoreszenzsignale von Zellkontaktproteinen**

Zur Quantifizierung der Intensität und Breite der VE-Cadherin- und Claudin5-Färbungen entlang der Zellgrenzen wurde das Programm ImageJ verwendet. Hierfür wurde ein Rechteck der Größe 20 x 5 µm über mehr als 20 zufällig ausgewählte Bereiche der HDMEC-/PSEC-Plasmamembran in mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten gelegt. Dadurch erhielt man die durchschnittliche Intensitätsverteilung (0-256 Arbitrary units/willkürliche Einheiten, A.U.) der VE-Cadherin und Claudin5-Färbung im jeweiligen definierten Bereich. Um spezifisch Signale der Membran ohne Hintergrund zu erfassen, wurde ein Schwellenwert von 20 A.U. festgelegt. Zur Bestimmung der durchschnittlichen Breite des Signals an der Membran wurde die Distanz der Schnittpunkte zwischen dem Intensitätsgraphen und der Horizontalen bei 20 A.U. gemessen.

#### **2.4.3 Immunfluoreszenzmikroskopie an Gewebepräparaten aus Rattenmesenterium**

Für Immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen wurden postkapilläre Venulen von Ratten-Mesenterien mit Ringer-Lösung, die BSA (50 mg BSA in 5 ml Ringerlösung) enthielten, mit oder ohne F/R perfundiert. Das Mesenterium wurde mit 2 % PFA in PBS fixiert, anschließend exzidiert und mit Erstantikörpern gegen VE-Cadherin immungefärbt.

Die gefärbten Gefäße wurden mit einem Laser-Konfokal-Mikroskop (Leica SP5) mittels eines 63x NA 1.2 Wasser Objektivs (Leica, Wetzlar und Mannheim) aufgenommen.

## **2.5 Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TER)**

Mithilfe der Elektrischen Zell-Substrat Impedanz Sensing-Technik (ECIS; Applied BioPhysics Inc., USA) konnte der TER an konfluenten Monolayern von HDMECs und PSECs bestimmt werden. Das Prinzip der Methode beruht auf Impedanzänderungen, die durch Permeabilitätssteigerung oder -minderung an der Elektrode hervorgerufen werden. Der gemessene elektrische Widerstand im System korreliert mit der Barrierefunktion von Zellverbänden.

Zur Durchführung der Widerstandsmessung wurden HDMECs und PSECs auf eine 8-Well-Zell-Kultur-Platte, die am Boden einer jeden Vertiefung mehrere Gold-elektroden enthält, ausgesät und mit Nährmedium versetzt. Nachdem die Endothelzellen nach 8 bis 10 Tagen konfluent zusammengewachsen waren, konnten nun die Messungen starten. Zunächst wurde frisches Medium in die Vertiefungen gegeben, die Lochplatte in die im Brutschrank befindliche Messkammer (bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>) eingespannt und die Basalwerte des TER für 15 min bestimmt. Anschließend wurden die jeweiligen Mediatoren zu den einzelnen Vertiefungen gegeben und die Messungen sofort fortgesetzt.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft Excel.

## **2.6 ELISA-basierte Messungen**

### **2.6.1 Messung der cAMP-Konzentration (cAMP-Assay)**

Zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration wurde ein kommerziell erhältlicher cAMP-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA, Sigma-Aldrich) verwendet. Bei der Durchführung wurden die Anweisungen des Herstellers exakt befolgt.

Zur Herstellung der Zell-Lysate wurden HDMEC- und PSEC-Zellen zunächst auf Petrischalen bis zur Konfluenz im entsprechenden Nährmedium gehalten. Nach Absaugen des Nährmediums erfolgte die Inkubation mit F/R bzw. PBS in Nährmedium. Dann wurde mit PBS gespült und 200 µl 0,1 M Salzsäure (HCl) für 10-15 min zugegeben. HCl führte zur Lyse der Zellen. Anschließend wurden die

Zelllysate sorgfältig abgeschabt, in Reaktionsgefäße überführt und bei 17000 g für 5 min bei RT zentrifugiert.

100 µl des Lysat-Überstandes wurden in die mit Immunglobulin G (goat anti-rabbit, IgG) beschichteten Vertiefungen der cAMP-Assay-Platte übertragen. Dann wurden 50 µl cAMP-Alkalische-Phosphatase-Konjugat und 50 µl cAMP-Antikörper in jede Vertiefung hinzugefügt. Nach zweistündiger Inkubation bei RT auf einem Orbital-schüttler wurde die Lösung aus den Vertiefungen abgekippt und gründlich mit Waschpuffer gespült. Nun erfolgte die Inkubation mit 200 µl p-Nitrophenyl Phosphate Substrate Solution (p-NPP-Substratlösung) für 1 h bei RT. Nach Zugabe von 50 µl Stopp-Lösung in jede Vertiefung konnte nun die Messung der optischen Dichte mittels eines Mikroplattenspektrophotometers (Sunrise, Tecan GmbH, Crailsheim, Deutschland) bei 405 nm erfolgen.

Mittels einer Standardkurve wurden die gemessenen Werte in cAMP-Konzentrationen (pmol/l) umgerechnet und in Relation zur Kontrolle angegeben. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Microsoft Excel.

### **2.6.2 Messung der Aktivität von Rac1 (Rac-GLISA)**

Der GTPase-linked Immunosorbent Assay (GLISA) ermöglicht die Bestimmung der Aktivität von Rho-GTPasen. Um die Rac1-Aktivität zu messen, wurde der Rac1-GLISA Activation Assay Biochem Kit™ (Cytoskeleton Inc., Denver CO, USA) exakt nach Instruktionen des Herstellers genutzt. Die Endothelzellen wurden auf Petrischalen ausgesät und bei Konfluenz mit den verschiedenen Mediatoren inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen, 100 µl Lysepuffer hinzugegeben und die Zellen von der Petrischale abgekratzt. Die in Reaktionsgefäße überführten Zelllysate wurden dann für 2 min bei 17000 g und 4°C zentrifugiert. 20 µl des auf diese Weise gewonnenen Überstandes wurden nach Überführung in ein neues Reaktionsgefäß zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration genutzt. Im Anschluss wurden die Lysate mit Lysepuffer auf die gleichen Proteinkonzentrationen (2 mg/ml) angeglichen. 50 µl dieser Proben wurden in die entsprechenden Vertiefungen der auf Eis vorgelegten GLISA-96-Lochplatte pipettiert und für weitere 30 min unter Schütteln bei 4°C inkubiert. Währenddessen kam es zur festen Bindung des aktiven Rac1 in den Vertiefungen, welche mit

spezifischen Bindedomänen beschichtet waren. Es wurde gründlich mit Waschpuffer gewaschen. Dann wurde zu jeder Vertiefung 200 µl Antigen-Präsentationspuffer gegeben (2 min bei RT) und erneut gewaschen. Es folgte die Inkubation des Rac1-Primär- und -Sekundärantikörpers (50 µl für 45 min bei RT); Orbitalschüttler in jeder Vertiefung. Dazwischen und im Anschluss wurde erneut mit Waschpuffer (jeweils 3x) sorgfältig gewaschen. Schließlich wurden 50 µl der Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase, HRP)-Detektionslösung in jede Vertiefung gegeben und dort für 5 min bei 37°C belassen. Mit der Zugabe von 50 µl HRP-Stopplösung wurde die Reaktion beendet und es folgte sofort die Messung der Vertiefungen bei 405 nm mittels eines Mikroplattenspektrometers (Sunrise, Tecan GmbH, Crailsheim, Deutschland). Die Daten wurden mittels Microsoft Excel ausgewertet.

## **2.7 Statistische Analyse**

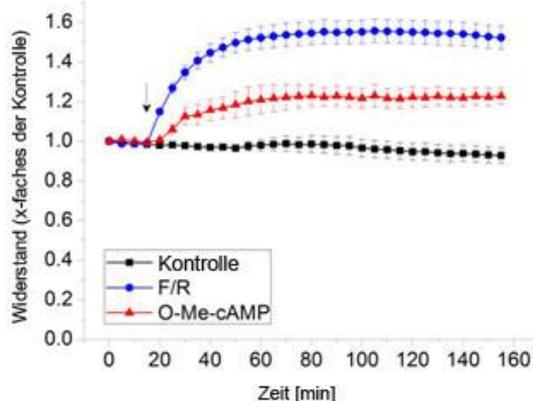
Die statistische Auswertung aller Versuche erfolgte mithilfe des Mann-Whitney-Rangsummentests (Microsoft Excel™). Die Werte sind als Mittelwerte +/- Standardfehler angegeben. Statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert < 0,05 angenommen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Effekte von cAMP und Rac1 auf die Barrierefunktion kultivierter Endothelzellen

##### 3.1.1 Rolle von cAMP/Rac1 in der Regulation der Barrierefunktion mikrovaskulärer Endothelzellen (HDMECs)

Um die Effekte von ansteigendem cAMP auf die endotheliale Barrierefunktion zu untersuchen, wurden Messungen des TER vorgenommen (Abb. 6). Der TER stellt einen geeigneten Parameter zur Beurteilung der Endothelbarriere dar (Hartmann et al., 2007; Tirupathi et al., 1992). Dazu wurden HDMECs auf Goldelektroden-Arrays ausgesät und der TER wurde bei Konfluenz des Zellrasens gemessen. Unter Kontrollbedingungen zeigten sich keine Veränderungen der Widerstände ( $100\% \pm 6\%$ ). Die Zugabe von F/R bewirkte einen Anstieg des TER auf  $155\% \pm 6\%$  des Kontrollniveaus. Durch selektive Aktivierung des Epac/Rap1-Signalweges mit dem cAMP-Analogen O-Me-cAMP resultierte ebenso eine gesteigerte Barrierefunktion ( $123\% \pm 6\%$  der Kontrolle). Sowohl die Behandlung mit F/R als auch mit O-Me-cAMP ergab kontinuierlich erhöhte Widerstandswerte in einem Zeitraum von 160 min ( $n = 6$ ).



**Abb. 6: Effekte von cAMP auf die Barrierefunktion kultivierter mikrovaskulärer HDMECs**

Zur Beurteilung der Endothelbarrierefunktion wurden TER-Messungen durchgeführt. Die Inkubation von HDMECs mit F/R und O-Me-cAMP führte zu einem deutlichen Anstieg des Widerstandes verglichen mit Kontrollen.

Pfeil: gibt den Zeitpunkt der Zugabe von F/R oder O-Me-cAMP an;  $n = 6$ .

---

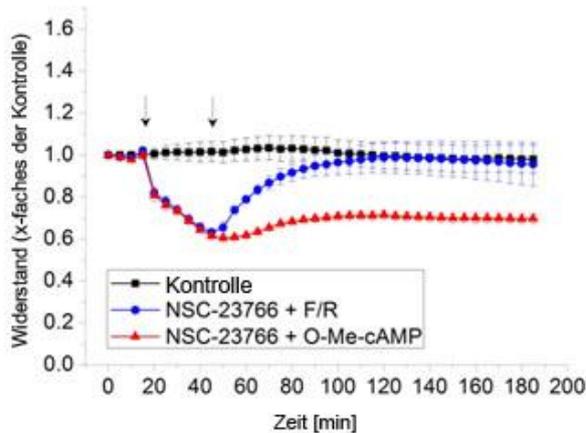
Es ist bekannt, dass cAMP die Endothelbarriere in HDMECs stabilisiert (Baumer et al., 2008b). Dies konnte durch die in Abb. 6 dargestellten Daten bestätigt werden.

Experimente in MyEnds, einer mikrovaskulären Zelllinie, ergaben, dass die Behandlung mit F/R nur einen schwachen Anstieg des TER zur Folge hatte.

Die cAMP-vermittelte Barrierestabilisierung wird in Teilen durch Rac1 vermittelt (Spindler et al., 2010). Um nun spezifische Effekte von Rac1 zu untersuchen, wurde NSC-23766 (200  $\mu$ M) verwendet, das die Aktivierung von Rac1 durch Wechselwirkung mit den Rac1-GEFs Tiam1 und Trio verhindert (Gao et al., 2004).

NSC-23766 führte zu einer deutlichen Schwächung der Endothelbarriere mit einem Absinken des TER auf  $62\% \pm 2\%$  der Ausgangswerte nach 30 min ( $n = 6$ ) (Abb. 7). Dies zeigt, dass eine konstante Aktivierung von Rac1 zur Aufrechterhaltung der Barrierefunktion unter Ruhebedingungen notwendig ist. Zur Steigerung der intrazellulären cAMP-Spiegel wurde F/R (60 min) zu NSC-23766-vorbehandelten HDMECs zugegeben. Darunter erholte sich der Barrierezusammenbruch und die gemessenen Widerstände näherten sich den Werten der Kontrolle an ( $97\% \pm 6\%$ ;  $n = 6$ ). Die Behandlung NSC-23766-vorinkubierter Zellen mit O-Me-cAMP (60 min) hatte dagegen keinen protektiven Effekt auf die Barriere, erkennbar an weiterhin stark erniedrigten TER-Werten ( $71\% \pm 2\%$  der Kontrolle;  $n = 6$ ).

Diese Daten zeigen, dass eine Inaktivierung von Rac1 zum Zusammenbruch der Endothelbarriere führt. Weiterhin scheint der Barriere-protektive Effekt von O-Me-cAMP Rac1-abhängig zu sein, während bei F/R noch andere Mechanismen eine Rolle zu spielen scheinen.



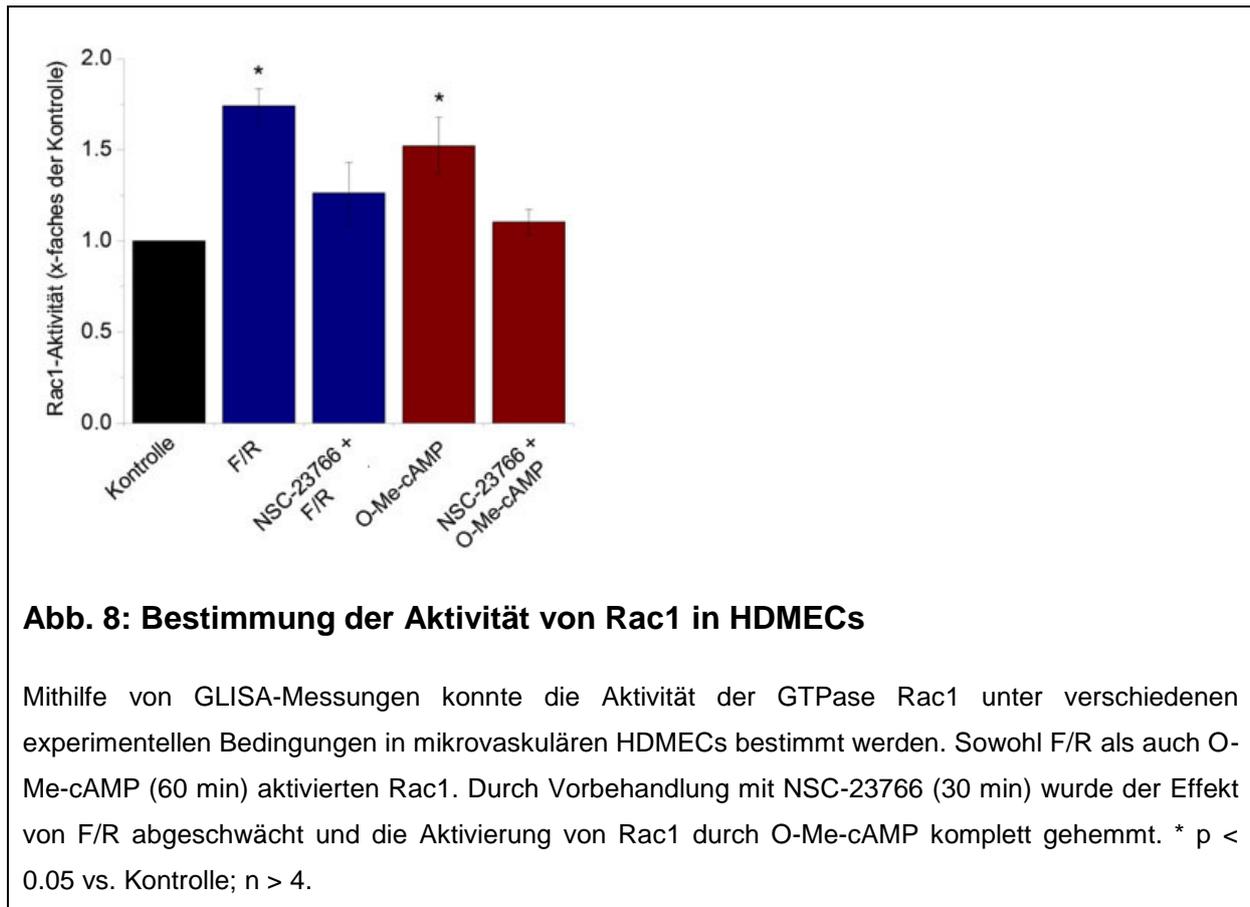
**Abb. 7: Bedeutung von Rac1 für cAMP-vermittelten TER-Anstieg in HDMECs**

Durch die Behandlung der Endothelzellen mit NSC-23766 (30 min) wurde Rac1 inaktiviert, was zu einem Zusammenbruch der Endothelbarriere führte und sich in einer deutlichen Reduktion des TER zeigte. Durch Zugabe von F/R zu NSC-23766-vorbehandelten Zellen kam es nach 60 min zum Anstieg des Widerstandes auf Werte im Bereich des Kontrollniveaus, während O-Me-cAMP nicht in der Lage war, TER zu steigern.

Erster Pfeil: stellt den Zeitpunkt für die Zugabe von NSC-23766 dar; zweiter Pfeil: zeigt die Zugabe von F/R oder O-Me-cAMP an; n = 6.

Um die Bedeutung von Rac1 bei der cAMP-vermittelten Stabilisierung der Endothelbarriere näher zu untersuchen, wurden Messungen des Aktivitätszustands von Rac1 durchgeführt (Abb. 8).

In HDMECs führte die Gabe von F/R (60 min) zur Aktivierung der GTPase Rac1 auf Werte von  $174\% \pm 10\%$  des Kontrollniveaus. Das cAMP-Analogon O-Me-cAMP (60 min) ließ ebenso die Rac1-Aktivität auf  $152\% \pm 16\%$  der Kontrolle ansteigen. Durch Vorbehandlung der Endothelzellen mit dem Rac1-Inhibitor NSC-23766 für 30 min kam es zur kompletten Aufhebung der durch O-Me-cAMP und F/R induzierten Rac1-Aktivierung ( $110\% \pm 7\%$  bzw.  $126\% \pm 17\%$  des Kontrollniveaus) ( $n > 4$ ).

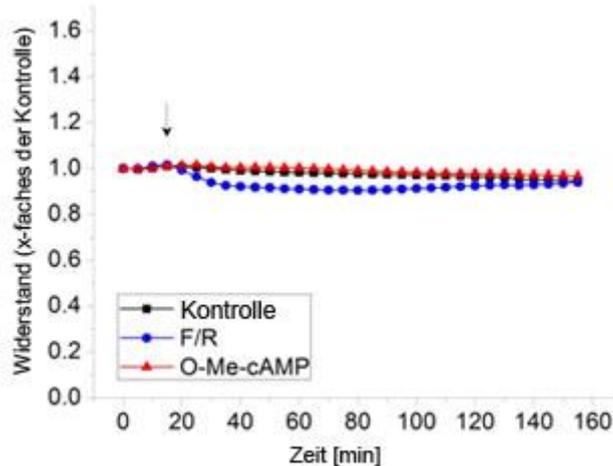


Insgesamt lässt sich also sagen, dass Rac1 nötig ist für die Funktion der Endothelbarriere. cAMP scheint die Barriere zumindest teilweise über die Aktivierung von Rac1 zu stabilisieren.

### 3.1.2 Einfluss von cAMP auf die Barriere makrovaskulärer Endothelzellen (PSECs)

In mikrovaskulären HDMECs wurde unter cAMP-Anstieg eine gesteigerte Barrierefunktion in Form erhöhter TER-Werte beobachtet. Die Bestimmung des TER in kultivierten makrovaskulären PSECs zeigte im Gegensatz zu HDMECs keinen Anstieg durch die Gabe von F/R oder O-Me-cAMP (Abb. 9). Im Vergleich zur Kontrolle ( $97\% \pm 1\%$  der Ausgangswerte nach 60 min), führte der cAMP-Anstieg durch Forskolin und Rolipram zu TER-Werten von  $90\% \pm 2\%$ . Die Behandlung der Zellen mit O-Me-cAMP zur spezifischen Aktivierung des Epac/Rap1-Signalweges resultierte in Widerstandswerten von  $100\% \pm 1\%$  nach 60 min ( $n = 6$ ). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass cAMP in makrovaskulären

Endothelzellen aus der Arteria pulmonalis des Schweines, im Unterschied zu mikrovaskulären HDMECs, keine Barriere-stabilisierenden Effekte ausübt.



**Abb. 9: Einfluss von cAMP auf die Barriere in PSECs**

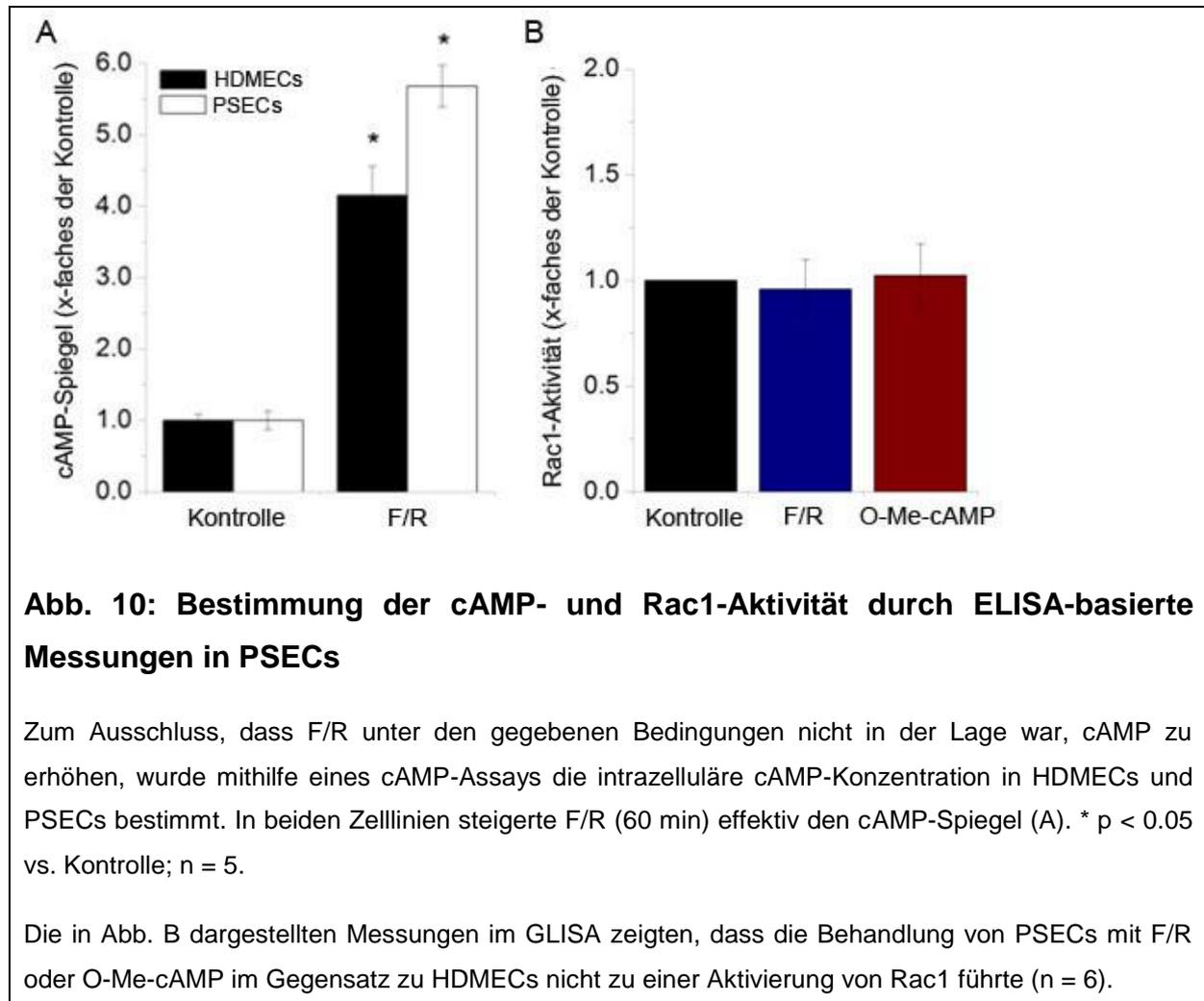
In kultivierten makrovaskulären Endothelzellen vom Schwein wurde keine Steigerung des TER nach Behandlung mit F/R oder O-Me-cAMP beobachtet.

Pfeil: deutet auf Zugabe von F/R oder O-Me-cAMP hin; n = 6.

Um auszuschließen, dass der Grund für den fehlenden TER-Anstieg und somit für die ausbleibende Barriestabilisierung in PSECs auf der Unwirksamkeit von F/R beruhte, wurden die intrazellulären cAMP-Konzentrationen sowohl in HDMECs als auch in PSECs gemessen (Abb. 10). Dabei zeigte sich, dass F/R (60 min) in beiden Zelltypen zum deutlichen Anstieg der intrazellulären cAMP-Spiegel führte. In HDMECs kam es durch F/R-Gabe zu einem Anstieg auf  $420\% \pm 40\%$ , während in PSECs sogar Werte von  $570\% \pm 30\%$  bezogen auf die Kontrolle resultierten (n = 5). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass der verwendete Mediator F/R unter den gegebenen Bedingungen ineffektiv bezüglich cAMP-Erhöhung war.

Als nächstes wurden die Effekte von cAMP auf die Rac1-Aktivierung in PSECs untersucht (Abb. 10). Interessanterweise kam es in makrovaskulären Endothelzellen, im Gegensatz zu HDMECs, durch die Gabe von F/R oder O-Me-cAMP (60 min) zu keiner Rac1-Aktivierung ( $95\% \pm 14\%$  und  $103\% \pm 15\%$  des Kontrollniveaus) (n = 6).

Diese Daten deuten darauf hin, dass die ungleichen Effekte von cAMP auf die Endothelbarriere von HDMECs und PSECs durch Unterschiede in der Rac1-Aktivierung bedingt sein könnten.



### 3.2 Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Einflusses von cAMP und Rac1 auf Adhärens- und Occludensjunctionen

Um herauszufinden, ob erhöhte cAMP-Spiegel/Veränderungen der Endothelbarriere mit einer morphologischen Reorganisation einhergehen und ob sich Unterschiede in der Anordnung der Junctionsproteine in verschiedenen Zellreihen zeigen, wurden IF-mikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Anfärbt wurden das AJ-Molekül VE-Cadherin und das TJ-Protein Claudin5 sowie Filamentäres Aktin (F-Aktin) mit Phalloidin. AJs und TJs spielen eine Schlüsselrolle in der Regulation der

parazellulären Permeabilität und stellen somit wichtige Bestandteile der Endothelbarriere dar. Um die jeweiligen Veränderungen der AJ- und TJ-Proteinverteilung nach cAMP-Anstieg zu quantifizieren, wurden ähnlich einer früheren Studie (Baumer et al., 2009) die Intensität und die Breite der IF-Färbung entlang der Zellgrenzen bestimmt.

### **3.2.1 Rolle von cAMP und Rac1 in der Reorganisation der Adhärens- und Occludensjunctionen in HDMECs**

#### **3.2.1.1 Effekte von cAMP auf Adhärens- und Occludensjunctionen**

Sowohl F/R als auch O-Me-cAMP (60 min) stabilisierten die Endothelbarriere in HDMECs. Um herauszufinden, ob diese Barrierestabilisierung von morphologischen Veränderungen begleitet war, wurden AJs und TJs mit IF-Mikroskopie untersucht (Abb. 11).

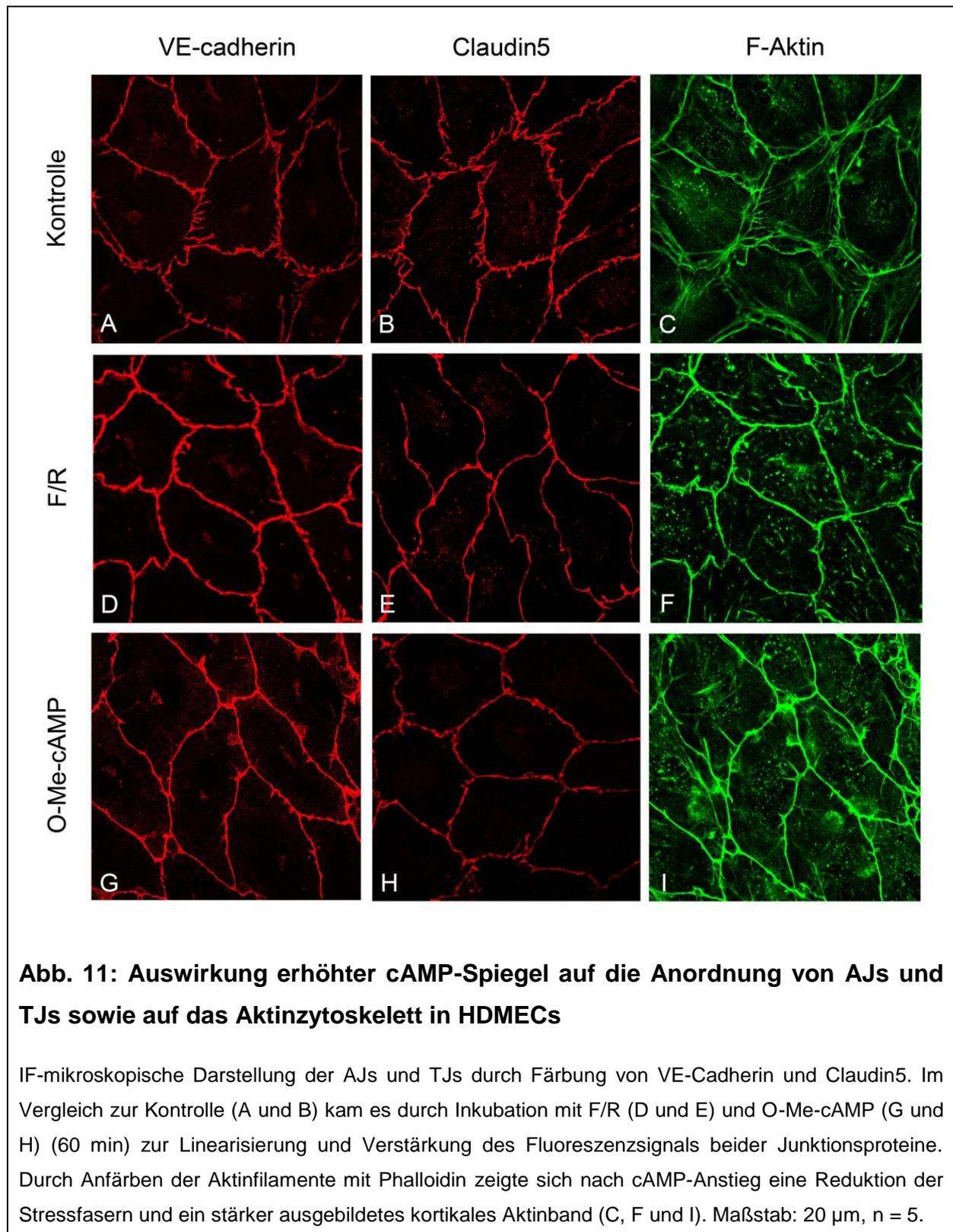
Unter Kontrollbedingungen zeigten sich die beiden Junctionsproteine VE-Cadherin und Claudin5 gleichmäßig entlang der Zellgrenzen verteilt (Abb. 11 A und B). In kurzen Bereichen waren sie orthogonal zur Zellgrenze ausgerichtet, was möglicherweise vielen lateralen Zellvorwölbungen entsprach, die ineinandergewundene Zellkontaktbereiche bildeten. Dadurch entstand das Bild einer gezackten Linie entlang der Zellgrenzen. In der Aktinfärbung waren vorwiegend kortikale Aktinfilamente und nur wenige Stressfasern im Zytoplasma sichtbar (Abb. 11 C). Die Gabe von F/R oder O-Me-cAMP (60 min) bewirkte eine Linearisierung der Fluoreszenzfärbung beider Junctionsproteine. Die in der Kontrolle sich zur Seite ausdehnenden Bereiche waren deutlich reduziert (Abb. 11 D-E und G-H). Desweiteren erschien das Fluoreszenzsignal für VE-Cadherin und Claudin5 in diesen behandelten Zellen intensiver im Vergleich zur Kontrolle. Diese Veränderungen der Anordnung endothelialer Junctionen nach cAMP-Anstieg waren von einer Reduktion der Stressfasern und der Bildung eines verstärkten kortikalen Aktinringes begleitet (Abb. 11 F und I) (n = 5).

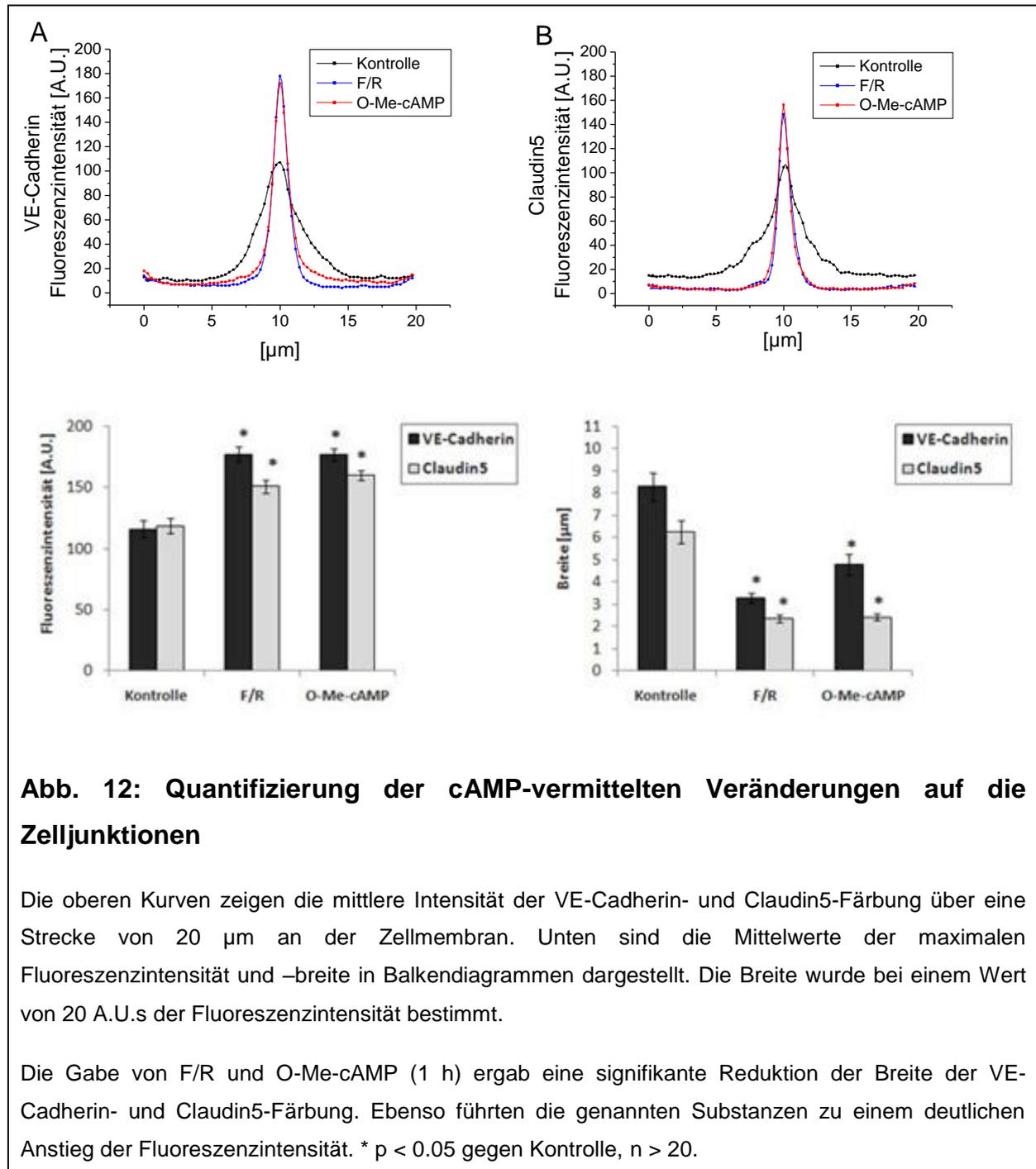
Um die morphologischen Effekte quantitativ zu erfassen, wurden die Breite und die Intensität der VE-Cadherin- und Claudin5-Färbungen an der Zellmembran bestimmt (Abb. 12).

---

Die Quantifizierung belegte die oben beschriebenen Veränderungen. Die Gabe von F/R und O-Me-cAMP (60 min) ergab eine signifikante Reduktion der Breite der VE-Cadherin-Färbung (F/R:  $3.3 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ; O-Me-cAMP:  $4.8 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ; Kontrolle:  $8.3 \pm 0.6 \mu\text{m}$ ). Ebenso führten die genannten Substanzen zu einem deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität von VE-Cadherin:  $177 \pm 6 \text{ A.U.}$  (F/R) und  $176 \pm 5 \text{ A.U.}$  (O-Me-cAMP), verglichen zur Kontrolle mit  $115 \pm 7 \text{ A.U.}$ . Ähnliche Effekte zeigten sich in der Färbung von Claudin5. Die Breite des Claudin5-Fluoreszenzsignals war gegenüber der Kontrolle ( $6.3 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ) für F/R ( $2.4 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ) und O-Me-cAMP ( $2.4 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ) stark reduziert. Die Messungen der Intensität von Claudin5 zeigten signifikant erhöhte Werte durch cAMP-Anstieg: F/R:  $151 \pm 5 \text{ A.U.}$ ; O-Me-cAMP:  $160 \pm 4 \text{ A.U.}$ ; Kontrolle:  $118 \pm 6 \text{ A.U.}$  (\*  $p < 0.05$  gegen Kontrolle,  $n > 20$ ).

Die cAMP-vermittelte Barrierestabilisierung in mikrovaskulären HDMECs war also begleitet von einer Linearisierung und Verstärkung der Fluoreszenzfärbung von VE-Cadherin und Claudin5 bzw. einer Reorganisation der AJs und TJs. Dies deutet an, dass Barriere-stabilisierende Effekte wesentlich durch die Anordnung der AJs und TJs vermittelt werden.





### 3.2.1.2 Rolle von Rac1 in der cAMP-vermittelten Reorganisation der Zellkontakte

Nun wurde die Verteilung der VE-Cadherin- und Claudin5-Moleküle in Abhängigkeit von Rac1 untersucht (Abb. 13). Die Inhibition der Rac1-Aktivierung durch NSC-23766 (30 min) induzierte eine deutliche interzelluläre Lückenbildung (Abb. 13, Pfeile in A und B) und eine ausgeprägte Stressfaserbildung (Abb. 13 C).

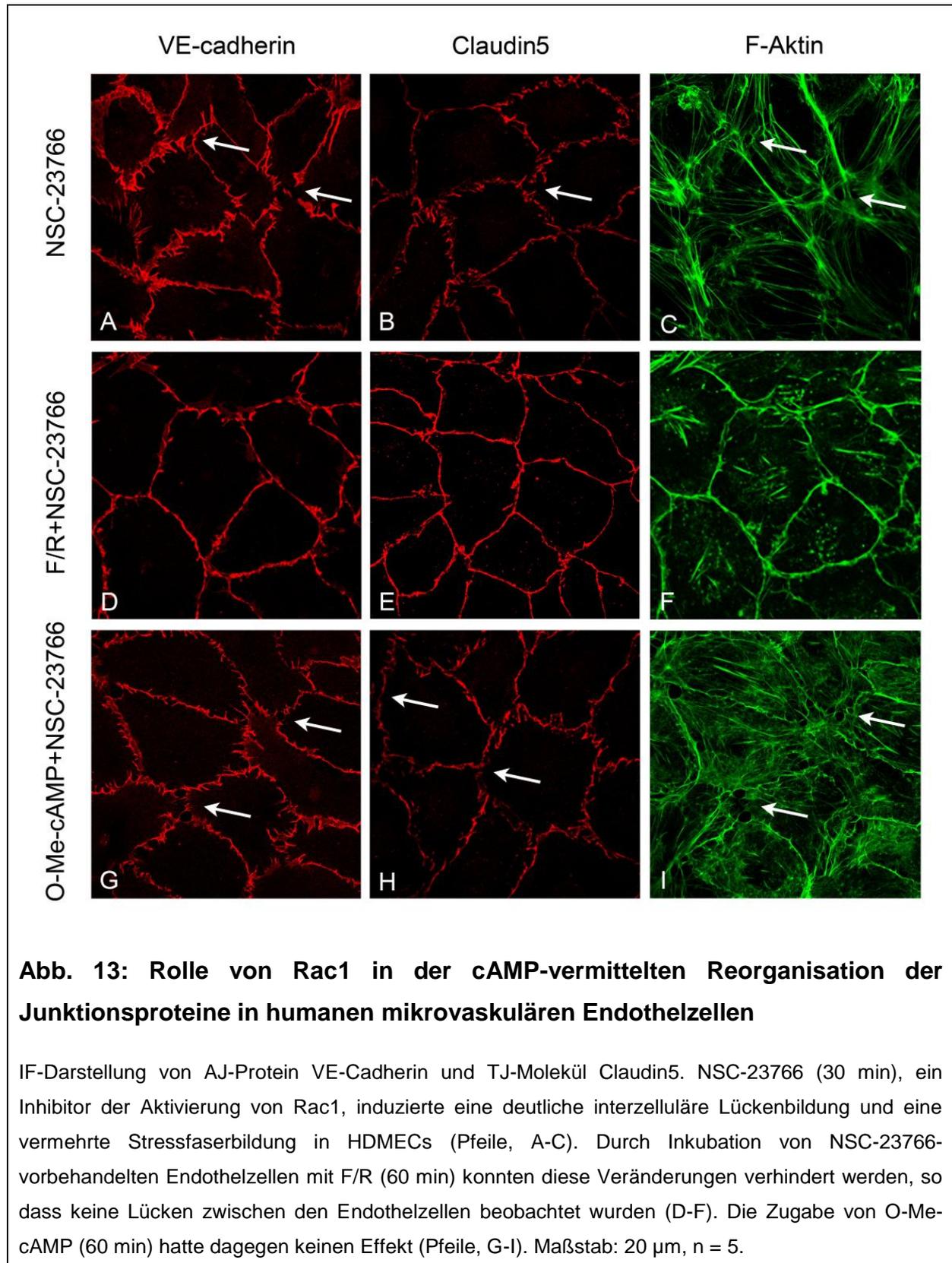
Durch die Behandlung von NSC-23766-vorinkubierten HDMECs mit F/R (60 min) kam es zum Verschwinden der Lücken zwischen den Endothelzellen. Desweiteren zeigte sich entlang der Zellgrenzen eine Linearisierung der VE-Cadherin- und Claudin5-Färbung (Abb. 13 D und E) und eine Reduktion der Stressfasern im Zytoplasma (Abb. 13 F). Dagegen konnte die Zugabe von O-Me-cAMP zu NSC-23766-vorbehandelten Zellen die Lückenbildung nicht verhindern (Abb. 13, Pfeile in G-I). Ebenso wurde keine Linearisierung der Junctionsproteine beobachtet (n = 5).

Mithilfe der anschließend durchgeführten Quantifizierung der Intensität und der Breite der VE-Cadherin- und der Claudin5-Färbung unter den verschiedenen Bedingungen konnten die oben beschriebenen Effekte bestätigt werden (Abb. 14).

Bei der alleinigen Behandlung mit NSC-23766 zeigte sich für VE-Cadherin eine IF-Intensität von  $120 \pm 9$  A.U. und eine Breite von  $6.8 \pm 0.4$   $\mu\text{m}$ . Die Intensität und Breite von Claudin5 lagen für diese Bedingung bei  $100 \pm 5$  A.U. und  $5.5 \pm 0.4$   $\mu\text{m}$ . Die Gabe von F/R (60 min) zu mikrovaskulären Endothelzellen, die zuvor für 30 min mit NSC-23766 behandelt wurden, führte zur gesteigerten Intensität und im Sinne einer Linearisierung zur reduzierten Breite der VE-Cadherin und Claudin5-Färbung:  $172 \pm 7$  A.U. und  $3.6 \pm 0.3$   $\mu\text{m}$  (VE-Cadherin);  $147 \pm 7$  A.U. bzw.  $2.4 \pm 0.2$   $\mu\text{m}$  (Claudin5).

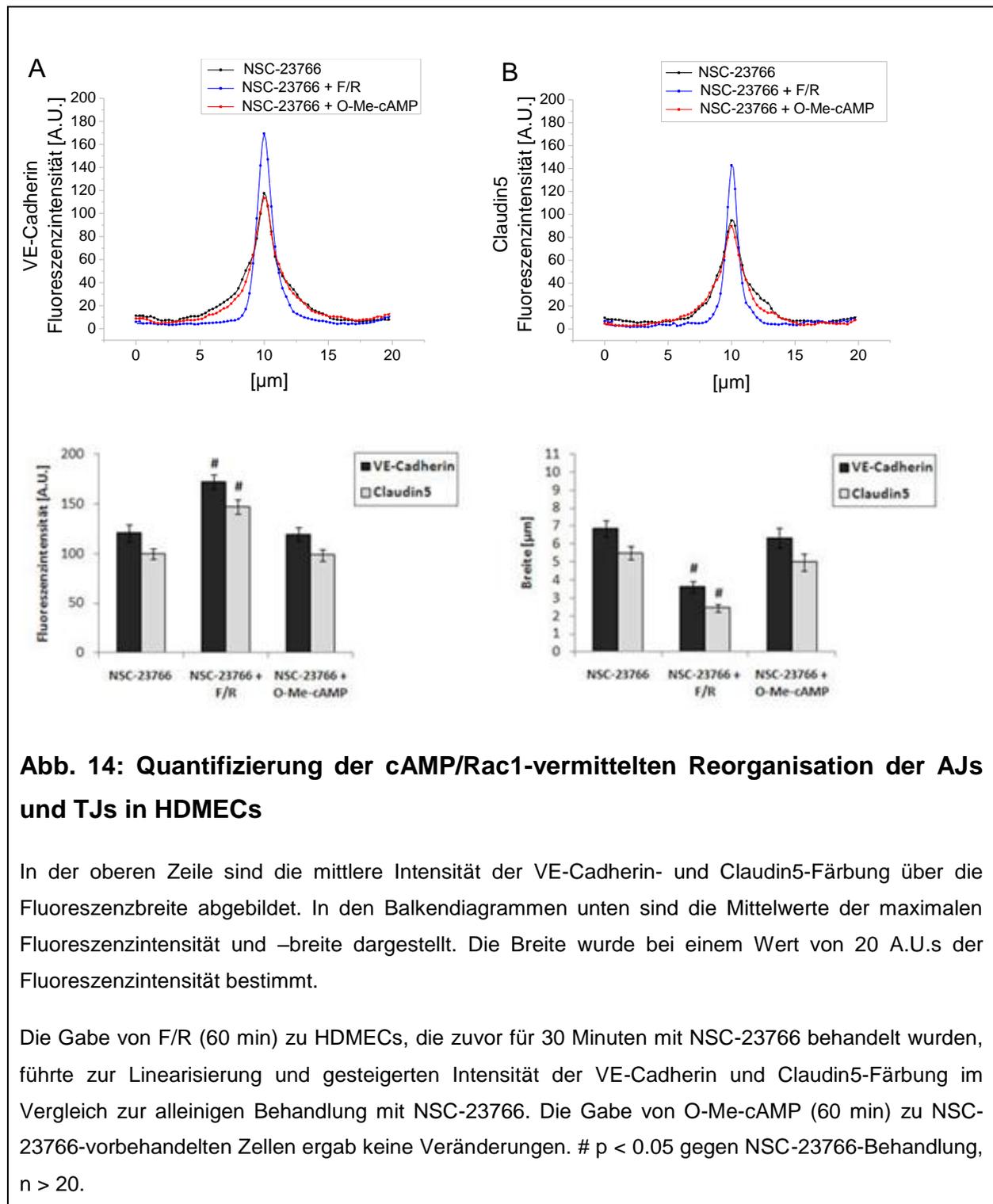
Die VE-Cadherin- und Claudin5-Reorganisation durch O-Me-cAMP-Behandlung (60 min) wurde durch vorherige Inkubation mit dem Rac1-Inhibitor (30 min) blockiert. Für VE-Cadherin wurde eine Intensität von  $119 \pm 7$  A.U. und eine Breite von  $6.3 \pm 0.5$   $\mu\text{m}$  gemessen. Die Intensität und Breite von Claudin5 betrug  $98 \pm 5$  A.U. bzw.  $5.0 \pm 0.5$   $\mu\text{m}$  (# p < 0.05 gegen NSC-23766-Behandlung, n > 20).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch die Inhibition von Rac1 die O-Me-cAMP-vermittelte AJ-/TJ-Reorganisation verhindert wurde. Im Gegensatz dazu war F/R trotz Rac1-Inaktivierung weiterhin in der Lage, eine Umorganisation von VE-Cadherin und Claudin5 entlang der Zellgrenzen zu induzieren.



**Abb. 13: Rolle von Rac1 in der cAMP-vermittelten Reorganisation der Junctionsproteine in humanen mikrovaskulären Endothelzellen**

IF-Darstellung von AJ-Protein VE-Cadherin und TJ-Molekül Claudin5. NSC-23766 (30 min), ein Inhibitor der Aktivierung von Rac1, induzierte eine deutliche interzelluläre Lückenbildung und eine vermehrte Stressfaserbildung in HDMECs (Pfeile, A-C). Durch Inkubation von NSC-23766-vorbehandelten Endothelzellen mit F/R (60 min) konnten diese Veränderungen verhindert werden, so dass keine Lücken zwischen den Endothelzellen beobachtet wurden (D-F). Die Zugabe von O-Me-cAMP (60 min) hatte dagegen keinen Effekt (Pfeile, G-I). Maßstab: 20  $\mu$ m, n = 5.

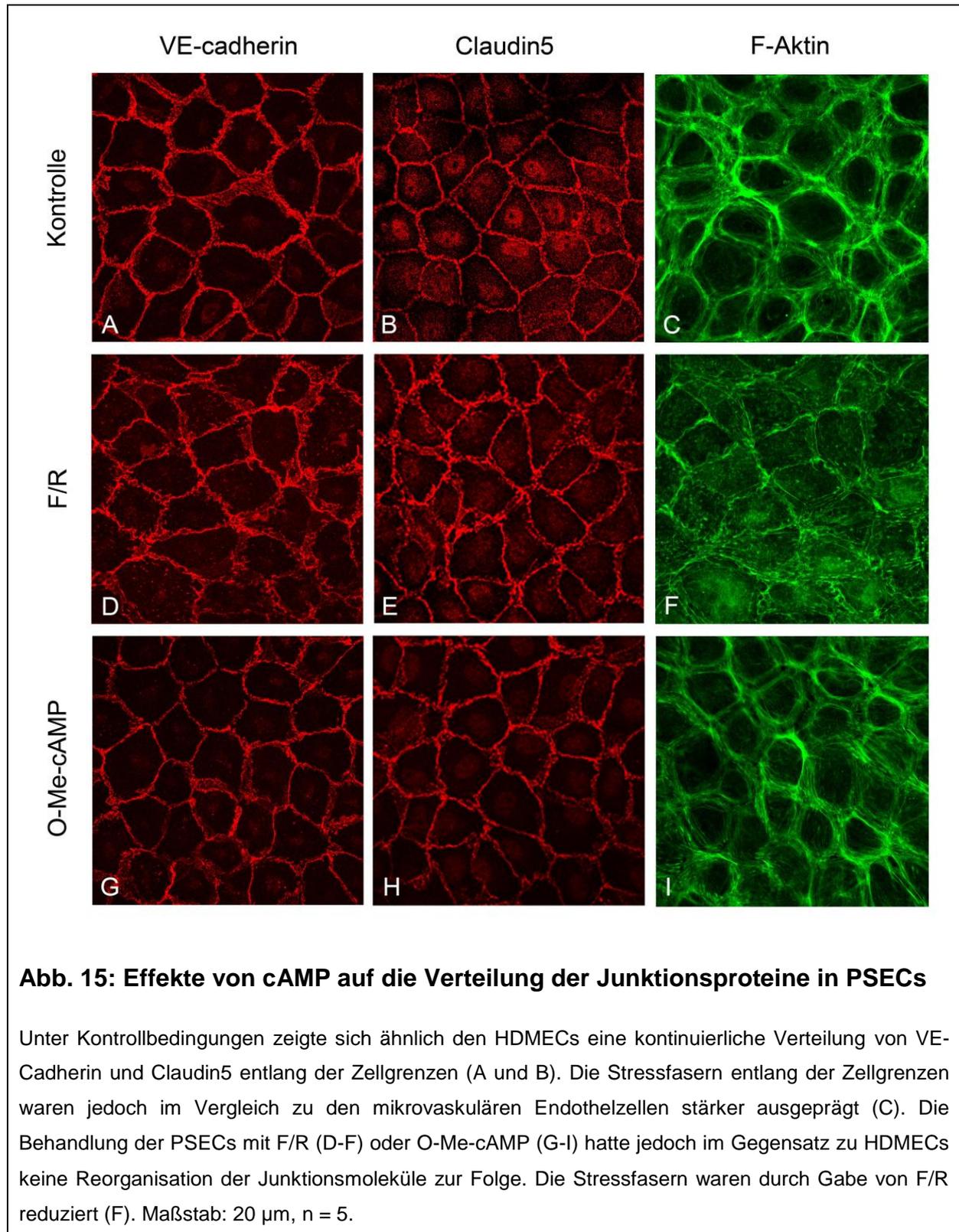


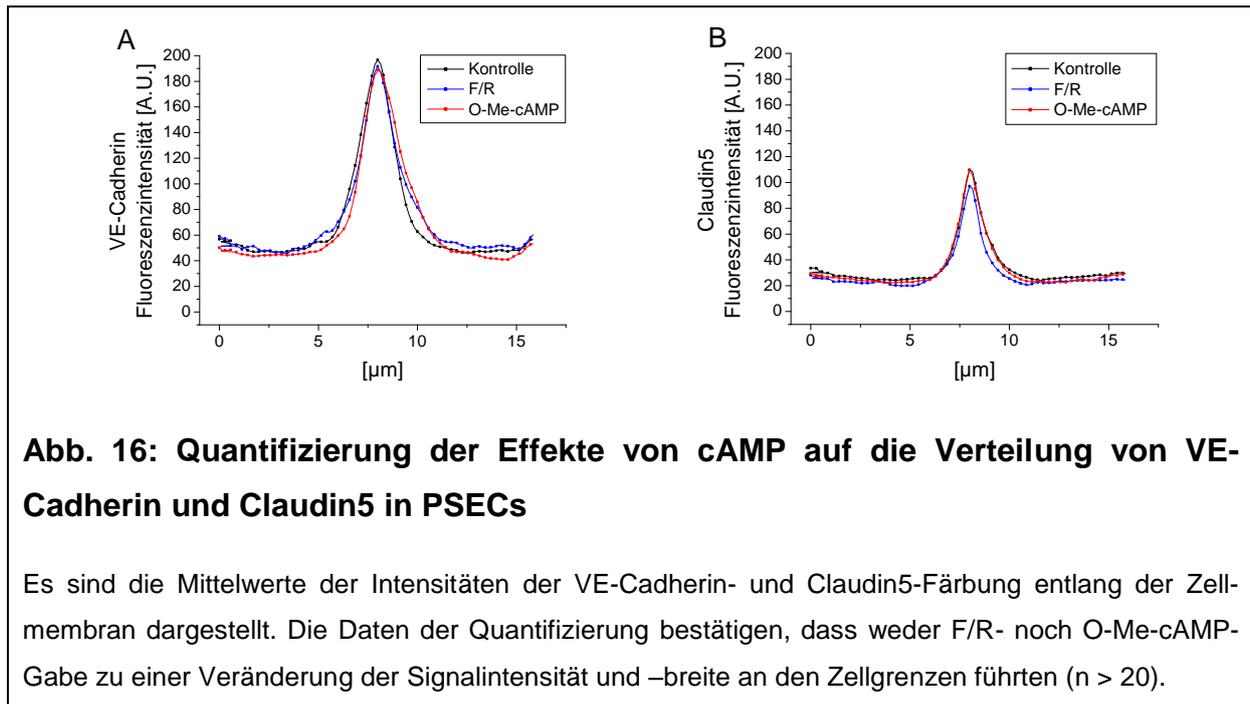
### 3.2.2 Einfluss von cAMP auf Adhärens- und Occludensjunctionen in PSECs

Die IF von makrovaskulären PSECs zeigte unter Kontrollbedingungen ein ähnliches Verteilungsmuster der VE-Cadherin- und Claudin5-Proteine wie in mikrovaskulären HDMECs. Die beiden Junctionsproteine waren kontinuierlich entlang der Zellgrenzen lokalisiert (Abb. 15 A und B). Durch Anfärben des Aktinzytoskeletts waren Stressfasern nachweisbar (Abb. 15 C). Allerdings kam es, im Gegensatz zu HDMECs nach cAMP-Erhöhung, durch Inkubation mit F/R oder O-Me-cAMP (60 min) zu keinen deutlichen Veränderungen der VE-Cadherin- oder der Claudin5-Verteilung (Abb. 15 D-E und G-H). Die Ausbildung von Stressfasern war vor allem nach F/R-Zugabe reduziert (Abb. 15 F) (n = 5).

Die nachfolgende Quantifizierung bestätigte, dass sich weder die Breite noch die Intensität der IF-Färbungen von VE-Cadherin und Claudin5 entlang der Zellgrenzen durch cAMP-Anstieg veränderte (n > 20) (Abb. 16).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass in makrovaskulären Endothelzellen keine Reorganisation der AJ- und TJ-Proteine durch cAMP-Anstieg stattfindet. Dazu passen auch die fehlenden stabilisierenden Effekte von cAMP an der Endothelbarriere bei der TER-Messung und die ausbleibende Aktivierung von Rac1 trotz Erhöhung der cAMP-Spiegel.



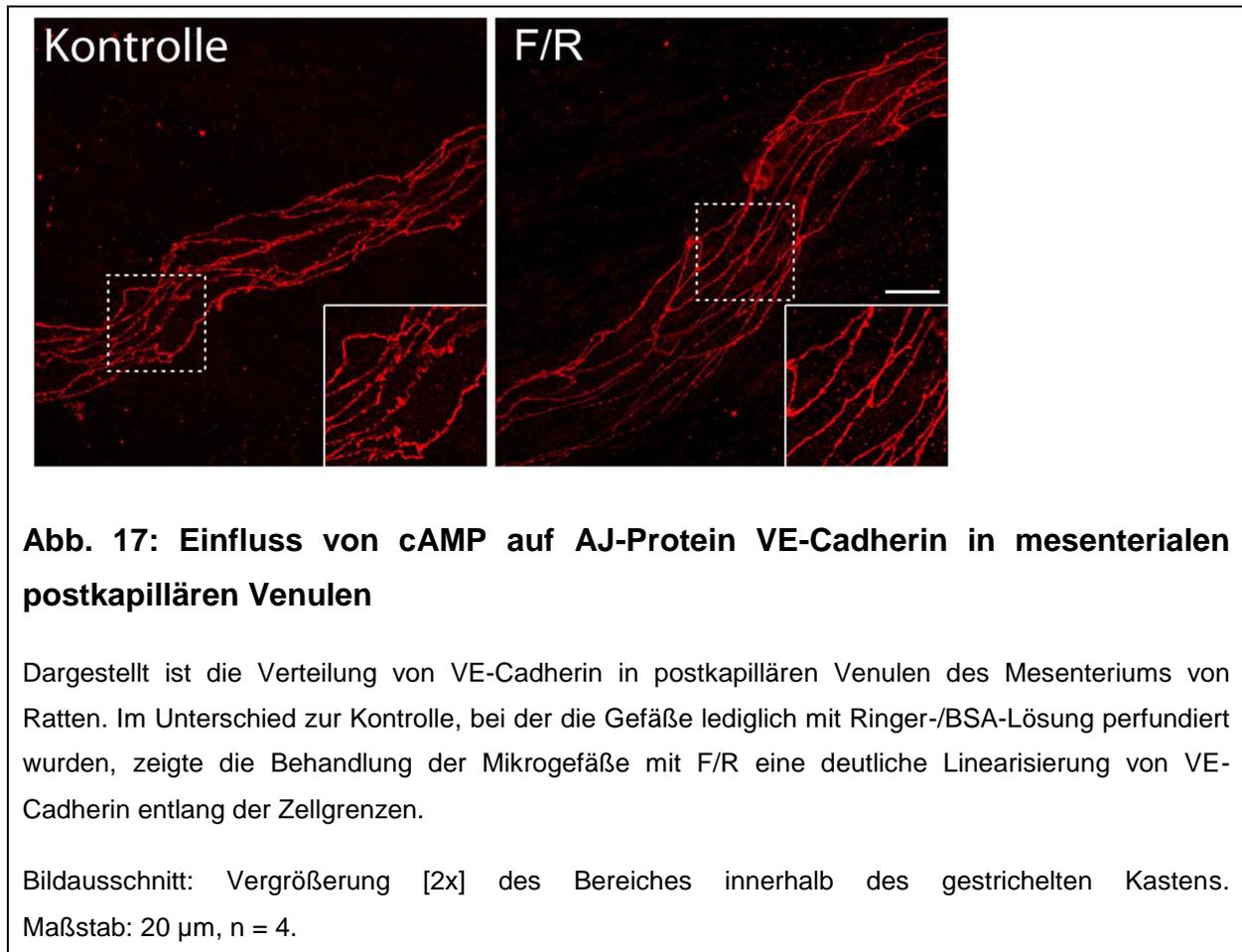


### 3.2.3 Reorganisation der Junctionsproteine durch cAMP-Erhöhung in postkapillären Venulen *in vivo*

Nachdem nun in verschiedenen Zellkulturen die Effekte von erhöhten cAMP-Spiegeln auf die Verteilung der Junctionsproteine untersucht wurden, stellte sich die Frage, welchen Einfluss cAMP auf die Zellkontakte der Endothelbarriere *in vivo* ausübte. Zur morphologischen Analyse wurden postkapilläre Venulen des Mesenteriums von Ratten nach Perfusion mit BSA/Ringer-Lösung bzw. mit F/R *in situ* fixiert und anschließend gegen das AJ-Molekül VE-Cadherin gefärbt (Abb. 17).

In der Kontrolle zeigten die Mikrogefäße eine kontinuierliche Verteilung von VE-Cadherin entlang der Zellgrenzen. In manchen Bereichen waren die Fluoreszenzsignale etwas dünner. In F/R-perfundierten Gefäßen erschien die VE-Cadherin-Färbung im Vergleich zur Kontrolle verstärkt und linearisiert entlang der Zellgrenzen. Zur besseren Darstellung wurden bestimmte Bereiche ausgewählt und vergrößert (gestrichelter Kasten; n = 4).

Dies verdeutlichte, dass cAMP in Mikrogefäßen *in vivo* ähnliche Effekte auf die Verteilung von Junctionsproteinen bewirkt wie in mikrovaskulären Endothelzellen *in vitro*.



### 3.3 Ultrastrukturelle Veränderungen interzellulärer Kontakte durch cAMP-Erhöhung und Rac1-Aktivierung

Nachdem die Effekte erhöhter cAMP-Konzentrationen auf die Organisation der AJs und TJs IF-mikroskopisch betrachtet wurden, war nun als nächster Schritt von besonderem Interesse, durch welche ultrastrukturellen Merkmale die Bereiche der Zellkontaktzonen gekennzeichnet waren. Deshalb wurden initial aus den Zellkulturen Ultradünnschnitte angefertigt und diese mithilfe der TEM untersucht.

#### 3.3.1 Reorganisation des Zell-Zell-Kontaktbereiches in HDMECs

##### 3.3.1.1 Morphologische Charakteristika von HDMECs

In der ultrastrukturellen Analyse zeigte sich, dass HDMECs unter allen experimentellen Bedingungen eine konfluente Zellschicht aus flachen Zellen bildeten. Im Querschnitt erschien so ein durchgehender Zellverband von Endothelzellen. Die

in Richtung Peripherie immer dünner werdenden Zellausläufer traten schließlich mit ihren Nachbarzellen in Kontakt. Dabei legte sich meist der Ausläufer der einen Zelle über den der anderen Zelle (Abb. 18). Sehr selten nur fanden sich mehr als zwei Zellen, die sich überlappten.



### Abb. 18: Morphologische Charakterisierung

Zur ultrastrukturellen Charakterisierung der Zellkontaktbereiche durch TEM wurden konfluente HDMECs fixiert, in Epon eingebettet und vertikal orientierte Ultradünnschnitte angefertigt. HDMECs wuchsen als einzelne Schicht aus flachen Zellen. In der Kontaktzone benachbarter Zellen überlappte meist eine Zelle die benachbarte. Maßstab: 2000 nm (linkes und rechtes Bild); 1000 nm (mittleres Bild).

Die Kontaktzonen der Zellen waren dadurch charakterisiert, dass sich die benachbarten Zellmembranen dicht aneinanderlegten, wobei der interzelluläre Spalt eine einheitliche Breite hatte. Gelegentlich wurden Nexus variabler Größe beobachtet (Abb. 19 A, Pfeil). Häufiger waren AJs (Abb. 19 B, Pfeile) und TJs (Abb. 19 C, Pfeil) zwischen zwei Zellausläufern zu sehen. AJs wurden definiert als Ansammlungen von elektronendichtem Material im Interzellulärspalt, welche mit im Zytoplasma gelegenen Plaques beider angrenzenden Zellmembranen verbunden waren (Abb. 19 B, Pfeile). Gelegentlich waren Mikrofilamente sichtbar, welche in die AJ-Plaques einstrahlten. Häufig zeigte sich auch im Bereich oder in der Nähe von AJs, dass anliegende Zellmembranen stärker zusammenliefen und in einigen Fällen miteinander fusionierten (Abb. 19 C, Pfeil: TJ). Damit konnte gezeigt werden, dass TJs (Abb. 19 D, rechter Pfeil) an manchen Stellen mit AJs (Abb. 19 D, linker Pfeil) kombiniert waren und somit sogenannte gemischte Junctionen (MJ) entstanden (Drenckhahn D, 1997; Ruffer et al., 2004). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen von PSECs waren diese endothelialen Junctionen ebenso erkennbar (Abb. 19 E, linker Pfeil: AJ; rechter Pfeil: GJ).

---

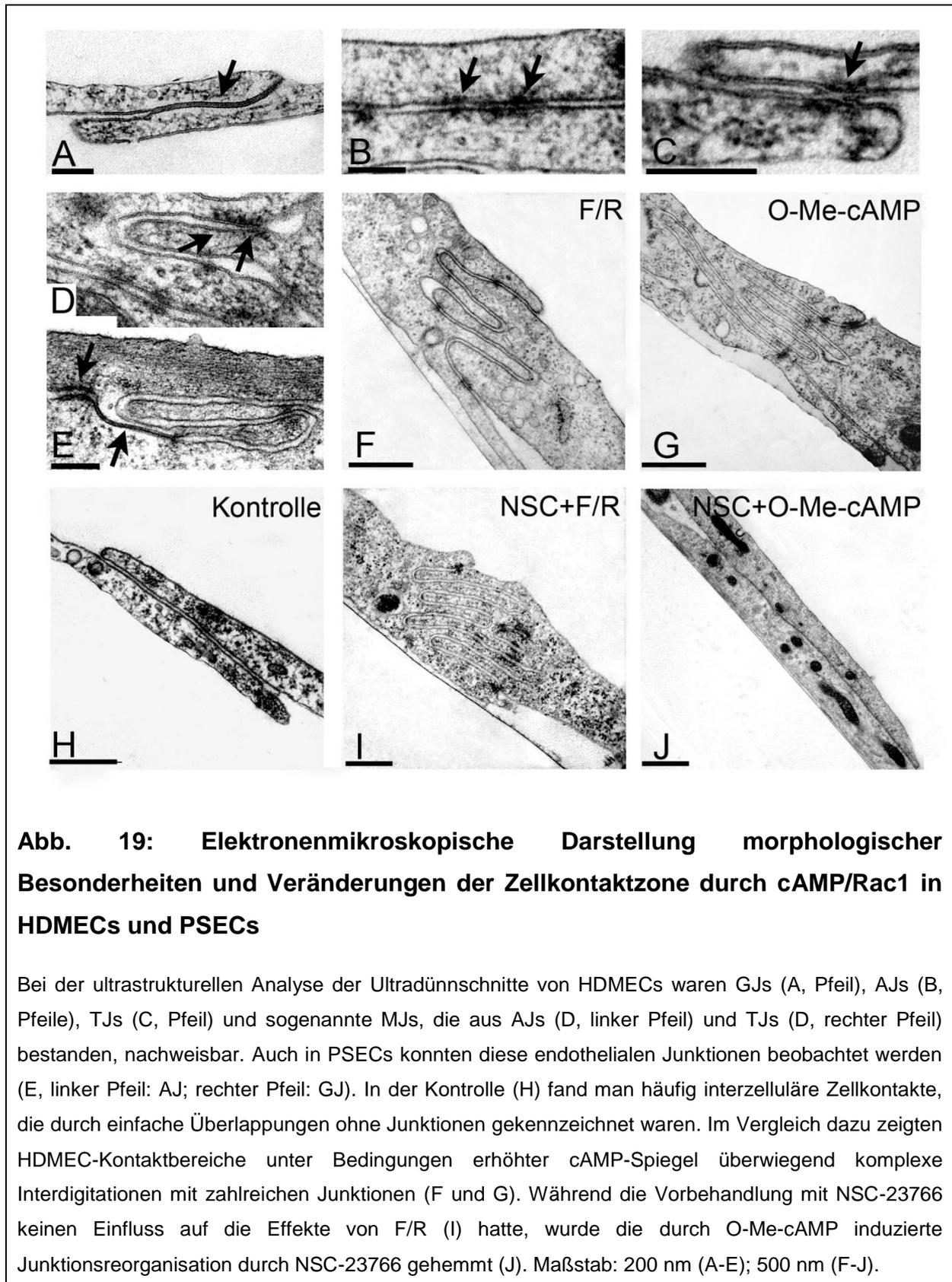
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ultrastrukturellen Merkmale der Kontaktbereiche von HDMECs im Allgemeinen mit Daten früherer Studien von mikrovaskulären Endothelien *in situ* und in Kultur übereinstimmten (Adamson et al., 2004; Adamson and Michel, 1993; Dye et al., 2001; Gustafsson et al., 2003; Hermanns et al., 2004; Simionescu et al., 1975).

Da noch weitgehend unbekannt ist, mit welchen ultrastrukturellen Veränderungen die cAMP-vermittelte Stabilisierung der Endothelbarriere einhergeht, wurden als nächstes vergleichende morphologische Analysen der interzellulären Kontaktzonenarchitektur von HDMECs unter den verschiedenen Bedingungen vorgenommen.

In der Kontrolle waren vor allem Kontaktzonen nachweisbar, in denen ein flacher Zellausläufer der einen Zelle einen weiteren schmalen Ausläufer der benachbarten Zelle überlappte. Eindeutige Junctionen fehlten häufig in diesen Kontaktbereichen (Abb. 19 H).

Durch die Behandlung von HDMECs mit F/R oder O-Me-cAMP (jeweils 60 min), die eine Steigerung von cAMP induzierten, zeigten die interzellulären Kontaktbereiche häufig eine andere Morphologie als in der Kontrolle: diese Zellkontaktbereiche bestanden aus zwei vergleichsweise dickeren Ausläufern benachbarter Zellen, welche mit mehreren Vorwölbungen fingerförmig ineinander verschlängelt waren. Dadurch entstand ein komplexes und interdigitierendes Erscheinungsbild des Interzellularspalt in apikobasaler Richtung. Zusätzlich fanden sich in diesen Interdigitationen zahlreiche knopfartige Junctionen, welche die Kontaktzonen stabilisierten (Abb. 19 F und G).

Während durch die Gabe von O-Me-cAMP zu HDMECs, welche zuvor für 30 min mit NSC-23766 behandelt wurden, vor allem Zellkontaktzonen mit einer ähnlichen Konfiguration wie unter Kontrollbedingungen auftraten (Abb. 19 J), dominierten komplexe Interdigitationen das morphologische Bild durch die Kombination von der Behandlung mit NSC-23766 (30 min) und anschließend mit F/R (60 min) (Abb. 19 I).



**Abb. 19: Elektronenmikroskopische Darstellung morphologischer Besonderheiten und Veränderungen der Zellkontaktzone durch cAMP/Rac1 in HDMECs und PSECs**

Bei der ultrastrukturellen Analyse der Ultradünnschnitte von HDMECs waren GJs (A, Pfeil), AJs (B, Pfeile), TJs (C, Pfeil) und sogenannte MJs, die aus AJs (D, linker Pfeil) und TJs (D, rechter Pfeil) bestanden, nachweisbar. Auch in PSECs konnten diese endothelialen Junctionen beobachtet werden (E, linker Pfeil: AJ; rechter Pfeil: GJ). In der Kontrolle (H) fand man häufig interzelluläre Zellkontakte, die durch einfache Überlappungen ohne Junctionen gekennzeichnet waren. Im Vergleich dazu zeigten HDMEC-Kontaktbereiche unter Bedingungen erhöhter cAMP-Spiegel überwiegend komplexe Interdigitationen mit zahlreichen Junctionen (F und G). Während die Vorbehandlung mit NSC-23766 keinen Einfluss auf die Effekte von F/R (I) hatte, wurde die durch O-Me-cAMP induzierte Junctionsreorganisation durch NSC-23766 gehemmt (J). Maßstab: 200 nm (A-E); 500 nm (F-J).

---

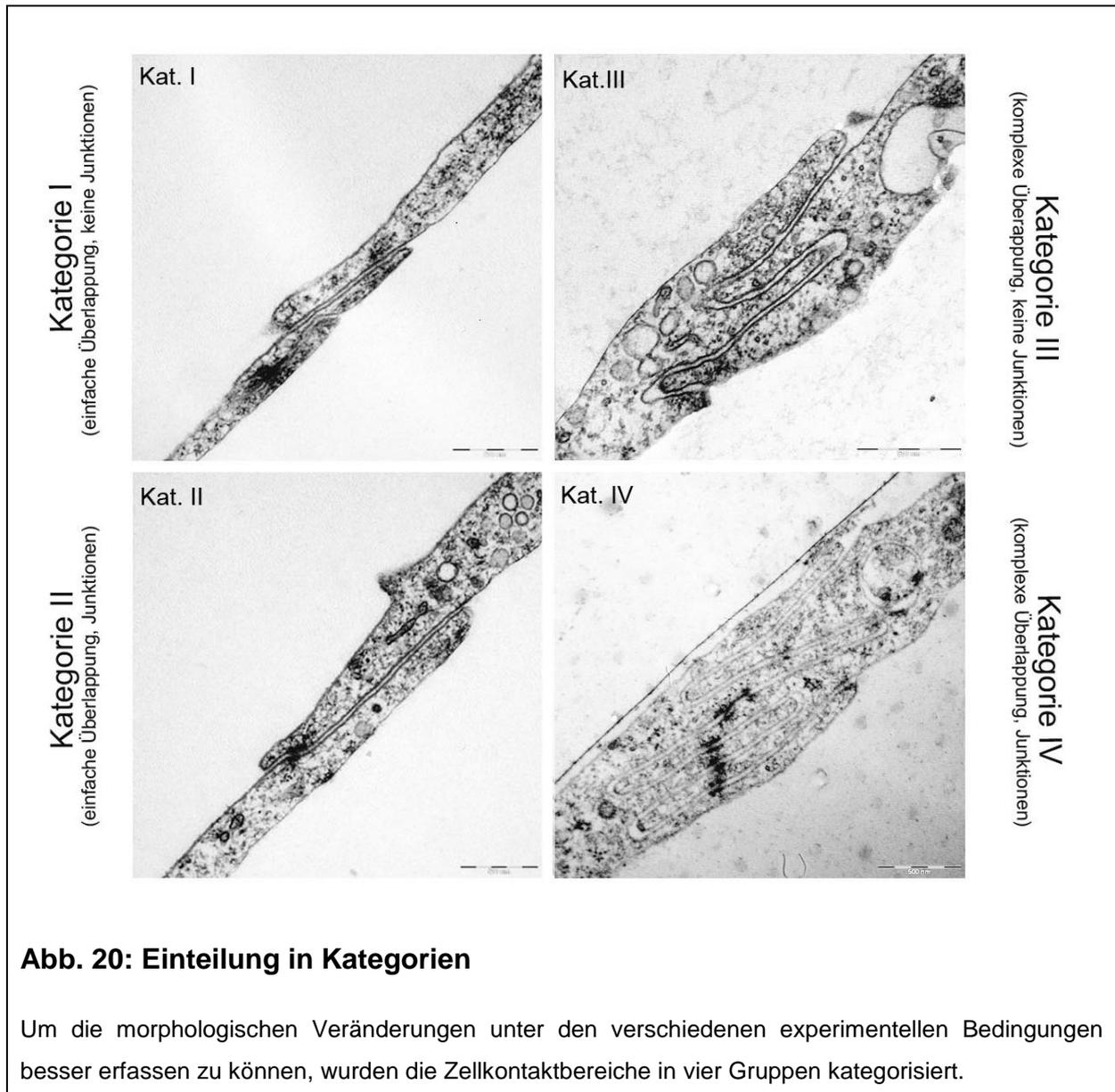
### **3.3.1.2 Einteilung der Zellkontaktzonen von HDMECs in morphologisch definierte Kategorien**

Um diese Veränderungen unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen zu quantifizieren, nahmen wir zunächst eine Kategorisierung der Morphologie der interzellulären Kontaktzonen in 4 Gruppen vor (Abb. 20):

Die Kategorie I beschreibt eine Morphologie, bei der sich die beiden angrenzenden Zellausläufer einfach überlappen, ohne dass dieser Überlappungsbereich durch eindeutig sichtbare AJs oder TJs stabilisiert wird.

Die Kategorie II unterscheidet sich von der Kategorie I durch sichtbare Junctionen im Bereich der anliegenden Zellmembranen.

Kategorie III und IV weisen im Gegensatz zu den ersten beiden Gruppen eine komplexe Überlappung auf, d.h. es zeigen sich fingerförmige apikobasale Interdigitationen zwischen den benachbarten Zellen. Diese Verschlängelungen werden in Kategorie IV durch zusätzliche interzelluläre Junctionen stabilisiert, während in Kategorie III diese Junctionen fehlen.



Insgesamt wurden, für jede Bedingung, zwischen 176 und 418 interzelluläre Kontaktzonen von mindestens vier unabhängigen Experimenten untersucht.

Abb. 21 A beschreibt, wie häufig die einzelnen Kategorien unter den verschiedenen Bedingungen prozentual auftraten: Unter Kontrollbedingungen wurden vorwiegend die Kategorien I und II beobachtet (77% aller Kontaktzonen). Dagegen fanden sich in F/R- bzw. O-Me-cAMP-behandelten HDMEC-Kulturen nur 53% bzw. 54% einfache Überlappungen der Zellen. Insbesondere kam es unter cAMP-Erhöhung zu einem Anstieg an Kategorie IV, während Kategorie I seltener auftrat. Die beiden Kategorien II und III veränderten sich unter den verschiedenen Bedingungen kaum.

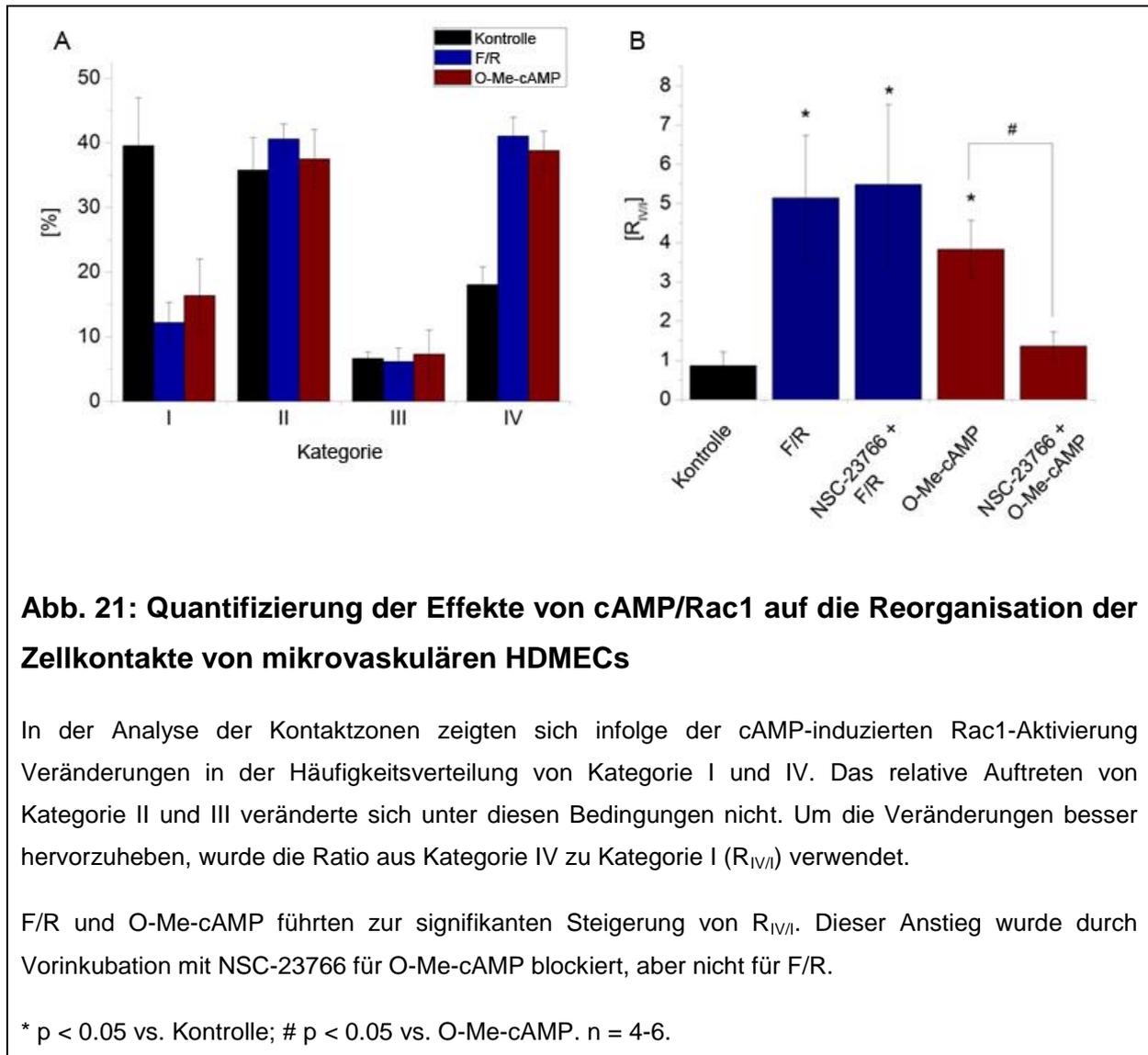
---

Deshalb bildeten wir, um eine bessere Übersicht über die Effekte zu erreichen, eine Ratio ( $R_{IV/I}$ ) aus dem prozentualen Anteil der Kategorie IV (komplexe Kontaktzonen) geteilt durch den Prozentsatz der Kategorie I (einfache Kontaktbereiche) (Abb. 21 B).

In der Kontrolle zeigte sich eine  $R_{IV/I}$  von  $0.6 \pm 0.2$ ; Kategorie I kam also häufiger vor als Kategorie IV. Die Behandlung der Kulturzellen mit F/R für 60 min führte zu einem signifikanten Anstieg des Quotienten auf  $5.1 \pm 1.6$ . Die Vorinkubation mit NSC-23766 konnte die strukturellen Veränderungen, die durch F/R induziert wurden, nicht verhindern ( $R_{IV/I}$   $5.5 \pm 2.0$ ). Ähnlich wie F/R war auch das cAMP-Analogon O-Me-cAMP in der Lage, die Organisation der Zellkontakte zu verändern, erkennbar an einer signifikant gesteigerten  $R_{IV/I}$  ( $3.8 \pm 0.7$ ). Jedoch blockierte die Vorbehandlung mit NSC-23766 die O-Me-cAMP-induzierte Reorganisation der Kontaktzone; es kam zu keinem signifikanten Anstieg der  $R_{IV/I}$  ( $1.3 \pm 0.4$ ) verglichen zur Kontrolle.

Eine Erhöhung des intrazellulären cAMP führte zur vermehrten Anzahl komplexer Kontakte in HDMECs. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass ein Anstieg der endothelialen Barrierefunktion mit ultrastrukturellen Veränderungen der interzellulären Kontaktzonen-Architektur einhergeht.

Die ultrastrukturelle Analyse von mikrovaskulären MyEnds zeigte eine ähnliche interzelluläre Kontaktzonen-Morphologie wie bei den HDMECs. Im Vergleich dazu konnte allerdings kein ausgeprägter Anstieg an komplexen Kontaktzonen infolge F/R-vermittelter Erhöhung von cAMP beobachtet werden.



### 3.3.1.3 Weitere morphologische Charakterisierung der interzellulären Zellkontaktzone

Im Anschluss wurden weitere ultrastrukturelle Parameter für die einzelnen Kategorien in HDMECs analysiert, um die Architektur der Kontaktzonen unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen weiter zu vergleichen und mögliche Korrelationen mit den lichtmikroskopischen und funktionellen Ergebnissen zu ermitteln.

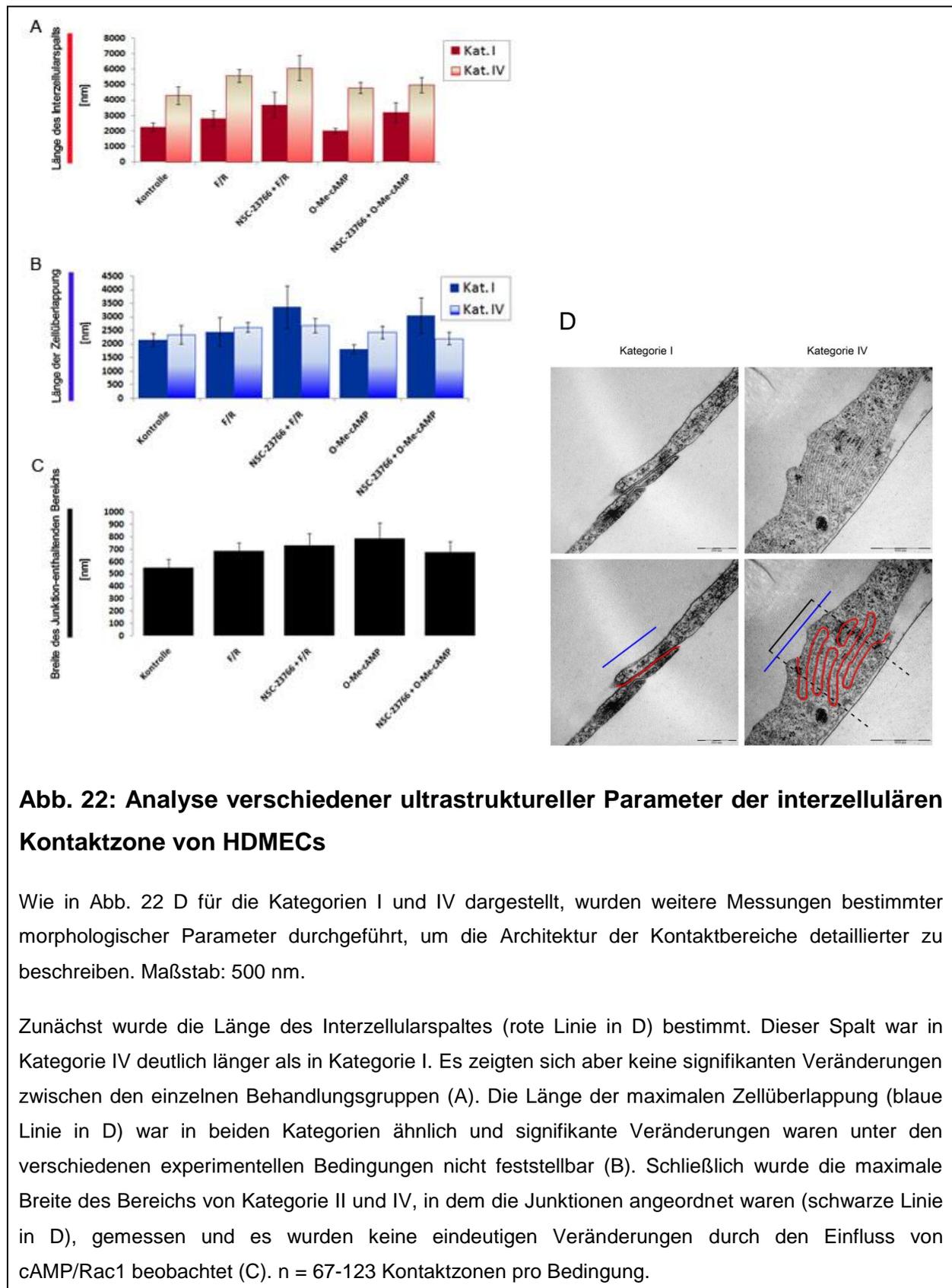
Wie in Abb. 22 dargestellt, wurden durch Messung bestimmter Parameter die strukturellen Eigenschaften der einzelnen Kategorien verglichen ( $n = 67-123$  Kontaktzonen pro Bedingung).

Zuerst wurde die Länge des Interzellularspalt, d.h. der Bereich, in dem die Zellmembranen benachbarter Zellen aneinanderlagen (Abb. 22: rote Linie in D), bestimmt. Dabei zeigte die Spaltlänge eine hohe Variabilität. Es wurden Werte von einigen 100 bis über 10000 nm gemessen. Unabhängig von der Behandlung der Zellen zeigte der Vergleich von Kategorie I zu Kategorie IV regelmäßig einen signifikant längeren interzellulären Kontakt-Spalt bei komplexen im Vergleich zu einfachen Kontakten (Interzellularspalt in Kat. IV  $\sim$  1,7x länger als in Kat. I). Allerdings war keine signifikante Veränderung des Interzellularspalt zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen feststellbar (Abb. 22 A). Somit lässt sich zusammenfassen, dass durchschnittlich der Interzellularspalt aller komplexen Kontaktzonen (Kategorie III + IV;  $4493 \pm 245$  nm) wesentlich länger war als der Spalt der einfachen Kontaktbereiche (Kategorie I + II;  $3219 \pm 132$  nm). Da in F/R-, NSC-23766 + F/R- und O-Me-cAMP-behandelten Kulturzellen der Anteil an komplexen Kontaktzonen deutlich höher war als in der Kontrolle und in NSC-23766 + O-Me-cAMP-inkubierten Endothelzellen (höhere  $R_{IV/I}$ , Abb. 21), weisen diese Daten darauf hin, dass in Kulturen mit gesteigerter Barrierefunktion die gesamte Spaltlänge deutlich größer ist.

Ein weiterer Parameter, der untersucht wurde, war die maximale Breite der Zellüberlappung (Abb. 22: blaue Linie in D). Diese variierte in Kategorie I und IV, betrachtete man alle Bedingungen, von  $1810 \pm 160$  nm bis  $3360 \pm 800$  nm. Einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Kategorien oder zwischen den verschiedenen Versuchsbedingungen fand sich dabei nicht (Abb. 22 B).

Die maximale Breite des Bereiches von Kategorie II und IV, in dem die Junctionen angeordnet waren (Abb. 22: schwarze Linie in D), stellte den dritten Parameter unserer Analyse dar. Es fanden sich erneut keine eindeutigen Veränderungen unter den verschiedenen Bedingungen ( $\pm 700$  nm; Abb. 22 C).

Zusammenfassend zeigten diese Parameter zwar eine breite Variabilität unter den verschiedenen Bedingungen, ein spezifisches Muster unter den jeweiligen Versuchsbedingungen ließ sich jedoch nicht erkennen.

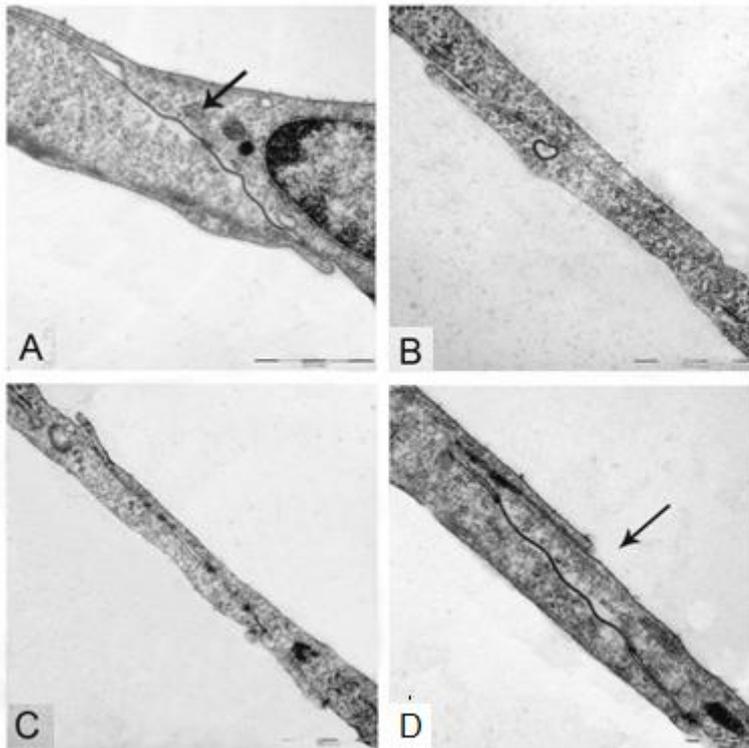


---

### **3.3.2 Morphologische Charakterisierung interzellulärer Zellkontaktzonen von PSECs**

#### **3.3.2.1 Morphologische Charakteristika von PSECs**

Die ultrastrukturelle Untersuchung dieser makrovaskulären Endothelzellen wurde analog der HDMEC-Versuchsreihe durchgeführt. Es wurden die typischen morphologischen Charakteristika dieses Endothelzelltypes beobachtet (King et al., 2004). Die Endothelzellen formten einen einschichtigen Zellverband aus im Vergleich zu HDMECs weniger flachen Zellen. Die Kontaktbereiche waren häufig dadurch gekennzeichnet, dass sich die Zellmembranen eines dünnen Zellausläufers der einen Zelle und eines dickeren Fortsatzes der Nachbarzelle gegenüberlagerten (Abb. 23 A). Alle Typen von interzellulären Junctionen, welche bei den HDMECs beschrieben wurden, waren vorhanden. GJs erschienen allerdings häufiger und waren länger als in HDMECs (Abb. 23 Pfeile in A und D). Durch genaue Betrachtung der Kontaktzonen waren prinzipiell ähnliche morphologische Befunde wie in HDMECs nachweisbar. So reichte das Spektrum von einfachen Überlappungen mit (Abb. 23 C) und ohne Junctionen (Abb. 23 B) bis hin zu komplexen ineinandergewundenen Kontaktzonen (Abb. 23 D).



**Abb. 23: Elektronenmikroskopische Darstellung der Charakteristika des Zellkontaktbereiches von PSECs**

Kultivierte konfluente PSECs bildeten eine einzelne Zellschicht aus. In den Kontaktzonen fand man häufig das Bild, dass sich eine Zelle mit einem dünnen Zellausläufer auf einen dickeren Fortsatz der Nachbarzelle auflegte (A). Im Vergleich zu HDMECs fanden sich häufiger und zudem längere GJs (Pfeile in A und D). Die morphologischen Eigenschaften der Kontaktzone entsprachen prinzipiell denen, die für HDMECs beschrieben wurden: von einfachen Überlappungen mit (C) und ohne Junctionen (B) bis hin zu komplexen Interdigitationen (D).

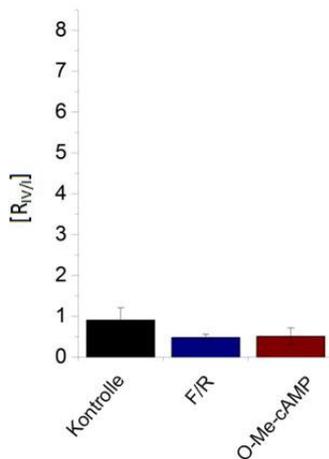
Maßstab: 500 nm (D); 1000 nm (A, B, C).

### 3.3.2.2 Einteilung der Zellkontaktzonen von PSECs in morphologisch definierte Kategorien

Analog den HDMECs wurden auch für PSECs Ultraschnitte zwischen 125 und 160 Kontaktbereiche von 3 unabhängigen Experimenten für jede Bedingung ausgewertet. Die Quantifizierung zeigte in der Kontrolle dieser makrovaskulären Zellreihe einen ähnlichen [IV/I]-Quotienten wie unter Kontrollbedingungen mikrovaskulärer HDMECs ( $0.9 \pm 0.3$ ; Abb. 24). Im Gegensatz zu HDMECs wurde in PSECs aber kein

signifikanter Anstieg der  $R_{IV/I}$  durch F/R- oder O-Me-cAMP-vermittelte cAMP-Erhöpfung ( $0.5 \pm 0.1$  und  $0.5 \pm 0.2$ ) beobachtet.

Da es unter cAMP-Erhöpfung zu keiner Barrierestabilisierung in PSECs kam, deuten diese Ergebnisse wieder darauf hin, dass die Reorganisation im Bereich der Kontaktzonen eine zentrale Rolle in der Regulation der Endothelbarriere einnimmt.



**Abb. 24: Quantifizierung der Effekte von cAMP auf die Morphologie der Zellkontaktbereiche von PSECs**

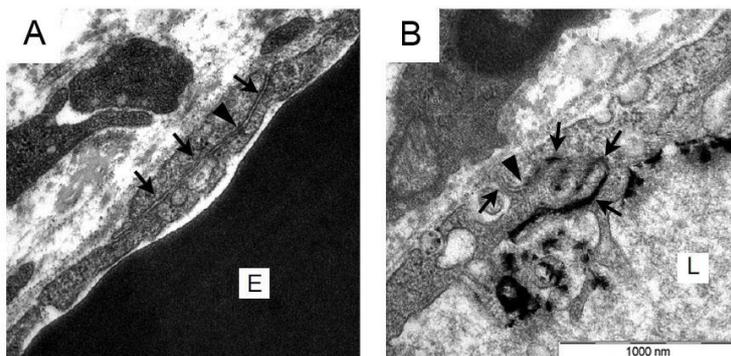
Im Gegensatz zu HDMECs resultierte nach cAMP-Erhöpfung keine ultrastrukturelle Reorganisation im Zellkontaktbereich: Weder nach F/R- noch nach O-Me-cAMP-Gabe wurde ein Anstieg der  $R_{IV/I}$  beobachtet ( $n = 3$ ).

### 3.3.3 Ultrastrukturelle Darstellung postkapillärer Venulen

Schließlich wurden ultrastrukturelle Analysen von postkapillären Venulen aus Rattenmesenterien unter Kontrollbedingungen durchgeführt, um die morphologischen Charakteristika der interzellulären Kontaktzone *in vivo* mit den Befunden *in vitro* zu vergleichen. Die Mikrogefäße wurden mit einer Ringer-/BSA-Lösung und dem elektronendichten Kontrastmittel Lanthannitrat, welches die Identifikation der Gefäße ermöglichte, perfundiert. Elektronenmikroskopisch fanden sich im Bereich der Kontaktzonen, ähnlich den morphologischen Befunden in Zellkulturen, sowohl einfache Überlappungen (Abb. 25 A) als auch komplexe Interdigitationen (Abb. 25 B) zwischen den Endothelzellen. An Junctionen konnten AJs (Abb. 25 A, Pfeilkopf) und auch TJs (Abb. 25 B, Pfeilkopf) in den

Zellkontaktzonen gefunden werden. Zwar konnte die für TJs typische Fusion der benachbarten Zellmembranen nicht nachgewiesen werden; die Tatsache, dass Lanthannitrat nur für eine begrenzte Distanz in den interzellulären Spalt diffundierte, lässt aber zumindest darauf schließen, dass der Diffusionsweg durch TJs blockiert wurde (Abb. 25 B, Pfeilkopf). Es wurde an keiner Stelle des subendothelialen Raumes Lanthannitrat (Abb. 25 B: schwarzes Präzipitat) nachgewiesen, was zeigte, dass im Zeitraum der Perfusion keine Diffusion durch den gesamten Interzellularspalt stattfand.

Insgesamt wurden zwischen den Endothelzellen in postkapillären Venulen also ähnliche morphologische Merkmale wie *in vitro* beobachtet. Um eine mögliche Reorganisation der Endothelbarriere nach cAMP-Anstieg zu charakterisieren, werden in Zukunft zusätzliche Untersuchungen notwendig sein.



**Abb. 25: Morphologische Charakteristika des Zell-Zell-Kontaktbereiches *in vivo***

Postkapilläre Venulen des Mesenteriums von Ratten wurden unter Kontrollbedingungen mit Lanthannitrat (schwarzes Präzipitat in Abb. B), welches der Markierung der Mikrogefäße diente, perfundiert. Morphologisch zeigten sich in den interzellulären Kontaktzonen, ähnlich den Untersuchungen in Zellkulturen, sowohl einfache Überlappungen (Abb. A) als auch komplexe Interdigitationen (Abb. B) zwischen den Endothelzellen.

Pfeile: deuten auf interzelluläre Spalten, welche in Abb. B elektronendichtes Lanthannitrat enthalten; Pfeilköpfe: Darstellung einer AJ in Abb. A und einer TJ in Abb. B, welche die interzelluläre Diffusion von Lanthan unterbindet; E: zeigt einen Erythrozyten innerhalb des Gefäßlumens; L: entspricht dem Gefäßlumen. Maßstab: 1000 nm.

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl der durch F/R vermittelte Anstieg der intrazellulären cAMP-Spiegel als auch die Aktivierung des Epac/Rap1-Signalweges durch O-Me-cAMP effektiv zur gesteigerten Barrierefunktion in mikrovaskulären Endothelien *in vitro* führte. Dagegen kam es infolge der Behandlung mit F/R oder O-Me-cAMP in makrovaskulären pulmonalen arteriellen Endothelzellen zu keinen Veränderungen. Unter Bedingungen erhöhter Barrierefunktion waren in der IF-Darstellung VE-Cadherin und Claudin5 in postkapillären Venulen und in kultivierten mikrovaskulären Endothelzellen entlang der Zellgrenzen linearisiert angeordnet. Inhibition der Rac1-Aktivierung verminderte die Barrierefunktion und blockierte effektiv die Epac/Rap1-vermittelte Barriestabilisierung und Reorganisation der Junctionsproteine. In der ultrastrukturellen Analyse mikrovaskulärer HDMECs wurde unter Bedingungen cAMP/Rac1-induzierter Barriestärkung ein Anstieg von komplexen interzellulären Kontaktzonen, die durch sichtbare Junctionen stabilisiert wurden, beobachtet.

### 4.1 Die cAMP-vermittelte Barriestärkung in HDMECs wird von einer Umverteilung der Adhärens- und Occludensjunctionen begleitet

In vielen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass der intrazelluläre Botenstoff cAMP protektive Effekte auf die Endothelbarriere ausübte. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ist cAMP in der Lage, die mikrovaskuläre Permeabilität unter Ruhebedingungen zu senken sowie den Permeabilitätsanstieg infolge verschiedener Entzündungsmediatoren zu reduzieren (Michel and Curry, 1999; Waschke et al., 2004b). Durch Anheben der intrazellulären cAMP-Spiegel wurden alle Barriere-destabilisierenden Effekte von LPS, TNF- $\alpha$  oder Thrombin blockiert (Baumer et al., 2008b; Birukova et al., 2010; Essler et al., 2000; Koga et al., 1995; Schlegel et al., 2009). Dabei vermittelt cAMP die stabilisierenden Effekte nicht nur über PKA-abhängige Mechanismen, sondern auch über den Epac/Rap1-Signalweg (Adamson et al., 2008; Birukova et al., 2008). Auch in dieser Arbeit konnten übereinstimmende Ergebnisse gefunden werden. Die Behandlung von mikrovaskulären humanen dermalen Endothelzellen mit F/R zur Steigerung der cAMP-Spiegel führten ebenso wie die

selektive Aktivierung des Epac/Rap1-Signalweges durch das cAMP-Analogon O-Me-cAMP zu deutlich erhöhten TER-Werten, d.h. zur gesteigerten Barrierefunktion. Diese funktionellen Veränderungen an der Barriere waren begleitet von einer Umorganisation der AJs und TJs entlang der Zellgrenzen. VE-Cadherin und Claudin5 färbten sich in der IF nach F/R- oder O-Me-cAMP-Gabe deutlich stärker an und der die Junctionen enthaltende Bereich erschien unter diesen Bedingungen linearisiert. Parallel kam es zur Reduktion der Stressfasern und zur Ausbildung eines verstärkten kortikalen Aktinringes. Auch *in vivo* konnte cAMP ähnliche Effekte auf die Anordnung der Junctionen ausüben. In F/R-perfundierten postkapillären Venulen erschien die VE-Cadherin-Färbung im Vergleich zur Kontrolle verstärkt und als verschmälertes Band entlang den Zellgrenzen. Damit konnten Befunde früherer Studien bestätigt werden, in denen ebenso beschrieben wurde, dass die Barrierestärkung mit Veränderungen am Aktinzytoskelett und mit einer Reorganisation der endothelialen Junctionen einherging (Baumer et al., 2008b; Cullere et al., 2005; Fukuhara et al., 2005; Kooistra et al., 2005). Insgesamt lässt sich also folgern, dass cAMP in mikrovaskulären HDMECs zur Barrierestabilisierung führt und gleichzeitig Veränderungen in der Verteilung der AJs und TJs bewirkt. Durch die Veränderungen in der Anordnung der Junctionsproteine könnten somit Barriere-stabilisierende Effekte von cAMP vermittelt werden.

#### **4.2 Die Barrierestabilisierung durch cAMP in mikrovaskulären Endothelien scheint über eine Reorganisation der interzellulären Kontaktzone vermittelt zu sein**

Das zentrale Ziel dieser Studie war es, heraus zu finden, von welchen ultrastrukturellen Veränderungen der Kontaktzone zwischen den Endothelzellen die durch cAMP-vermittelte Barrierestabilisierung begleitet wird. In der elektronenmikroskopischen Analyse von HDMECs veränderten sich unter Bedingungen erhöhter cAMP-Spiegel und gesteigerter Barriereigenschaften die Zellkontaktbereiche von einfachen Überlappungen benachbarter Zellausläufer ohne zusätzliche endotheliale Junctionen hin zu komplexen Interdigitationen in apikobasaler Orientierung, die durch zahlreiche Junctionen stabilisiert wurden. Sowohl F/R als auch O-Me-cAMP führten zum vermehrten Auftreten komplexer Junctionen in HDMECs, wie durch den erhöhten Kategorie IV/I-Quotienten gezeigt werden konnte.

In PSECs konnten diese morphologischen Merkmale, d.h. einfache Überlappungen bzw. komplexe Interdigitationen, ebenso beobachtet werden wie in intakten postkapillären Venulen von Rattenmesenterien. Im Falle von PSECs kam es allerdings durch cAMP-Erhöhung zu keinen Veränderungen im Quotienten, was mit den ausbleibenden Effekten auf die Barriere in diesem Zelltyp übereinstimmt. Diese Daten deuten darauf hin, dass der komplexe Kontaktzonen-Phänotyp das morphologische Korrelat einer erhöhten Barrierefunktion darstellen könnte. Diese Hypothese wird dadurch weiter unterstrichen, dass die Länge des Interzellularspaltes in Kategorie III und IV deutlich länger als in Kategorie I und II war, was den Fluss von Wasser und gelösten Stoffen begrenzen könnte (Adamson and Michel, 1993; Clough and Michel, 1988). Auch in mikrovaskulären Plazentaendothelzellen schien der Interzellularspalt nach langfristiger (48 h) cAMP-Erhöhung länger zu sein, was gleichzeitig auch mit einer reduzierten Permeabilität einherging. Allerdings wiesen die Kontaktzonen unterschiedliche morphologische Charakteristika auf (Dye et al., 2001). Da unter cAMP-Anstieg eine Verlagerung des Auftretens von Kategorie I-Kontakten ohne Junctionen hin zu Kategorie IV mit Junctionen beobachtet wurde, kam es zusätzlich zu den Veränderungen bezüglich der Interdigitationen und damit des Interzellularspaltes zu einem absoluten Anstieg der Anzahl an AJs und TJs. Diese Ergebnisse werden unterstützt durch eine *in vivo*-Studie, bei der die F/R-vermittelte mikrovaskuläre Permeabilitätsminderung von einem erhöhten Vorkommen an TJs in Schnitten von Mikrogefäßen begleitet war (Adamson et al., 1998); d.h. unter vergleichbaren Bedingungen, die auch in dieser Studie für *in vivo*- und *in vitro*-Versuche verwendet wurden. Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass cAMP die Endothelbarriere stabilisiert, indem es die Entstehung komplexer Interdigitationen zwischen benachbarten Endothelzellen mit deutlich verlängertem Interzellularspalt und vermehrten Junctionen fördert.

Interessanterweise wurde in perfundierten intakten postkapillären Venulen des Mesenteriums beobachtet, dass ultrastrukturell vor allem einfach überlappende Kontaktstrukturen mit oder ohne Junctionen vorlagen (Adamson et al., 1998). Unter unseren Bedingungen zeigten sich in Gefäßen, die mit BSA/Ringer-Lösung perfundiert wurden, auch komplex aufgebaute Kontaktzonen. Zur Klärung der Frage, inwiefern die nach cAMP-Erhöhung gezeigten morphologischen Effekte, d.h. der komplexe Junctionsphänotyp, auch *in vivo* vorkommt, sind weitere Untersuchungen nötig. Da der physiologische hydrostatische Blutdruck, der Blutfluss sowie spezielle

Zellen wie die Perizyten *in vitro* fehlen, entsprechen in Kultur gehaltene Endothelzellen sicherlich nur teilweise der Situation *in vivo* (Curry and Adamson, 2010). Dafür spricht auch eine frühere Studie, die zeigte, dass die Grundpermeabilität in kultivierten Zellen höher als in intakten Mikrogefäßen war (Michel and Curry, 1999). All dies unterstreicht die Notwendigkeit vergleichender *in vivo*- und *in vitro*-Studien bezüglich der Relevanz spezifischer Mechanismen.

Unklar ist, was das ultrastrukturelle Korrelat für die Veränderungen in der IF-Darstellung ist, die unter Bedingungen erhöhter cAMP-Spiegel beobachtet wurden. Während die interzellulären Kontaktzonen infolge Aktivierung des cAMP/Rac1-Signalweges komplexer organisiert waren, zeigte sich IF-mikroskopisch unter diesen Bedingungen entlang den Zellgrenzen eine verstärkte Fluoreszenzintensität und eine Verschmälerung des AJ- und TJ-enthaltenden Kontaktbereiches. Diese Linearisierung und Intensitätssteigerung des Fluoreszenzsignals nach cAMP-Anstieg wurde bereits in mehreren anderen Studien beschrieben (Baumer et al., 2008b; Baumer et al., 2009; Cullere et al., 2005; Kooistra et al., 2005). Die IF-Intensitätserhöhung von VE-Cadherin und Claudin5 nach cAMP-vermittelter Rac1-Aktivierung könnte durch die in der TEM-Analyse beobachtete Zunahme an Junctionen erklärt werden. Jedoch haben sich bezüglich des Interzellulärspaltes oder der Zellkontaktüberlappung innerhalb einer Kategorie keine Unterschiede gezeigt. Die Linearisierungen der AJ- und TJ-Proteine können somit nicht durch Veränderungen des Interzellulärspaltes, der Zellkontaktüberlappung oder der Breite des Junctions-enthaltenden Bereiches erklärt werden. Während in der IF die Breite der VE-Cadherin- oder Claudin5-positiven Zone zwischen 2.4 µm und 8.3 µm, abhängig von der jeweiligen experimentellen Bedingung, variierte, war die AJ- und TJ-enthaltende Zone, die elektronenmikroskopisch bestimmt wurde, mit einer Breite von ungefähr 0.7 µm stabil. Folglich lässt sich die Verminderung der IF-Breite nicht auf die einfache Annäherung der Junctionen zurückführen. Vielmehr scheint die Zellgestalt verändert zu sein, da die orthogonal zu den Zellgrenzen stehenden VE-Cadherin- und Claudin5-positiven Strukturen nach Aktivierung des cAMP/Rac1-Signalweges stark reduziert waren. Auch hierdurch erscheinen die Zellgrenzen linearisiert. Bei den orthogonalen Linien könnte es sich um sehr dynamische AJ- und TJ-positive Zellfortsätze handeln (Millan et al., 2010), die durch erhöhtes cAMP und Rac1 vermindert sein könnten und auf diese Weise zur verschmälerten IF-positiven Zone beitragen könnten. Demzufolge könnten endotheliale Zellverbände unter

Bedingungen erhöhter cAMP-Spiegel eine Veränderung, ausgehend von Interdigitationen in der Horizontalen (x-y-Ebene), hin zu vertikalen Interdigitationen in der vertikalen Ebene (x-z-Ebene) durchmachen. Da darüber hinaus keine weiteren eindeutigen morphologischen Veränderungen der Endothelzellen beobachtet wurden, erscheint es möglich, dass sich diese ausgedehnten Membranumstrukturierungen nur auf die interzellulären Kontaktzonen begrenzen.

Da der Anstieg der parazellulären Permeabilität einen sehr wichtigen Schritt unter akuten Entzündungsbedingungen darstellt, konzentrierte sich diese Studie vorwiegend auf Veränderungen dieses parazellulären Diffusionsweges. Zusätzlich besteht auch noch ein transzellulärer Transportweg, der vor allem dem Stoffaustausch von Makromolekülen wie Albumin dient und in dem Caveolae und vesikulovakuoläre Organellen eine zentrale Rolle spielen (Feng et al., 1996; Mehta and Malik, 2006). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass cAMP eventuell auch Einfluss auf die transzelluläre Permeabilität nimmt.

### **4.3 Rolle von Rac1 in der cAMP-vermittelten Endothelbarrieresteigerung**

Für Rac1 wurden ebenso wie für cAMP bereits in vielen Studien Barriere-protective Effekte im mikrovaskulären Endothel *in vivo* und *in vitro* beschrieben (Birukova et al., 2007a; Jacobson et al., 2006; Waschke et al., 2006). Ziel dieser Arbeit war es auch, herauszufinden, welchen Einfluss Rac1 auf die durch cAMP vermittelte Barriestabilisierung in mikrovaskulären HDMECs hat.

In einer früheren Studie war die cAMP-vermittelte Barriestabilisierung in HDMECs von der parallelen Aktivierung von Rac1 begleitet (Baumer et al., 2008b). Auch in pulmonalen Endothelzellen führte der Anstieg von intrazellulärem cAMP zur verstärkten Barrierefunktion, indem sowohl durch die PKA als auch durch den Epac/Rap1-Signalweg die kleine GTPase Rac1 aktiviert wurde (Birukova et al., 2010; Birukova et al., 2007b). Umgekehrt wurde durch Ausschalten von Rac1 die protektiven Effekte von PKA und Epac/Rap1 unterdrückt, was zeigt, dass cAMP seine positiven Effekte über einen PKA-abhängigen und einen PKA-unabhängigen, den Epac/Rap1-Signalweg, vermittelt, die beide mit der Aktivierung von Rac1 zusammenlaufen (Birukova et al., 2010; Birukova et al., 2007b; Spindler et al., 2010).

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass sowohl der Anstieg der cAMP-Konzentration via F/R als auch die selektive Aktivierung des Epac/Rap1-Signalweges via O-Me-cAMP zur Aktivierung von Rac1 führten. Daneben kam es unter diesen Bedingungen jeweils zu einer gestärkten Barrierefunktion, gemessen als erhöhte TER-Werte, einer Linearisierung und Intensivierung der VE-Cadherin- und Claudin5-Fluoreszenzfärbung und ultrastrukturell zu einer geänderten Morphologie, die durch ein vermehrtes Auftreten komplexer Interdigitationen charakterisiert war. Diese Daten weisen darauf hin, dass cAMP zur Stabilisierung der Barriere im mikrovaskulären Endothel mit einer Aktivierung von Rac1 einhergeht. Wie wichtig Rac1 für die Aufrechterhaltung der Endothelbarriere ist, konnte bereits vor einiger Zeit gezeigt werden. Während durch die LT-vermittelte Rac1-Glykosylierung diese inaktiviert wurde und es dadurch zum Permeabilitätsanstieg in intakten Mikrogefäßen sowie zur interzellulären Lückenbildung in mikrovaskulären Endothelzellen kam (Waschke et al., 2004a), konnte die Steigerung der cAMP-Spiegel diese negativen Effekte verhindern (Waschke et al., 2004b). Um die Rolle von Rac1 in der cAMP-vermittelten Endothelbarrieresteigerung näher zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein spezifischer Rac1-Inhibitor verwendet. NSC-23766 vermittelt seine inhibierende Wirkung dadurch, dass er durch Bindung an die GTPase die Interaktion mit den spezifischen GEFs Trio und Tiam1 hemmt und somit die Aktivierung von Rac1 verhindert (Gao et al., 2004). Durch Gabe von NSC-23766 resultierte eine deutliche Schwächung der Endothelbarriere; die Widerstandswerte zeigten einen deutlichen Abfall. In der IF war der durch die Verhinderung der Rac1-Aktivierung induzierte Barrierezusammenbruch durch sichtbare interzelluläre Lücken- und vermehrte Stressfaserbildung charakterisiert. Diese Beobachtung unterstreicht, dass eine konstante Aktivierung von Rac1 zur Aufrechterhaltung der Barrierefunktion notwendig ist. Die Behandlung NSC-23766-vorinkubierter HDMECs mit O-Me-cAMP zeigte im Unterschied zur alleinigen Behandlung mit O-Me-cAMP keine stabilisierenden Effekte; die TER-Werte waren weiterhin stark erniedrigt. Außerdem wurde die durch O-Me-cAMP-induzierte Rac1-Aktivierung unterdrückt. In der IF bestanden weiterhin deutliche Lücken zwischen den Endothelzellen und die durch O-Me-cAMP hervorgerufene Linearisierung und Verstärkung der AJ- und TJ-Färbung entlang den Zellgrenzen blieb aus. Entsprechend wurde durch NSC-23766 die O-Me-cAMP-vermittelte Reorganisation der Kontaktzone blockiert. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Barriere-

---

stabilisierenden Eigenschaften von Epac und Rap1 (O-Me-cAMP) streng von der Rac1-Aktivierung durch die GEFs Tiam1 und/oder Trio abhängig sind. Im Gegensatz dazu führte die Gabe von F/R, wodurch nicht nur Epac/Rap1, sondern auch PKA-abhängige Signalwege aktiviert wurden, nach vorheriger NSC-23766-Inkubation zur Wiederherstellung der Barrierefunktion. Obwohl unter diesen Bedingungen eine abgeschwächte Rac1-Aktivität vorlag, stiegen die TER-Werte bis auf Kontrollniveau an. Die Widerstandswerte alleiniger F/R-Behandlung ohne Rac1-Inaktivierung konnten aber nicht erreicht werden, was zeigt, dass die Barrierestärkung durch cAMP zumindest zum Teil durch Rac1 vermittelt wird. Dennoch reichte es aus, die mit dem Barrierezusammenbruch durch NSC-23766 einhergehenden Veränderungen zu verhindern. Es fanden sich keine Lücken zwischen den Endothelzellen, VE-Cadherin und Claudin5 erschienen verstärkt und linearisiert sowie die Stressfasern vermindert. Und auch in der ultrastrukturellen Analyse zeigte sich ein erhöhter  $R_{IV/I}$ . Anhand dieser Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass eine Steigerung von cAMP, wie in diesem Fall durch Gabe von F/R ausgelöst, nicht nur über eine Aktivierung von Rac1 zur Barrierestabilisierung führt, sondern dass weitere Signalwege bestehen müssen, vermutlich der PKA nachgeschaltet, die zumindest teilweise zur Barriereprotektion beitragen. Möglicherweise handelt es sich um andere GTPasen als Rac1, wie beispielsweise Cdc42 (Kouklis et al., 2004). Natürlich ist es auch möglich, dass GTPase-unabhängige Mechanismen an der cAMP-vermittelten Barrierestärkung beteiligt sind. Insgesamt unterstreichen die Daten die These, dass Veränderungen in der endothelialen Kontaktzonen-Morphologie die gemeinsame Endstrecke aller barrierestärkenden Signalwege darstellen.

#### **4.4 cAMP führt durch Rac1-Aktivierung zur Barrierestabilisierung in mikrovaskulären HDMECs, aber nicht in makrovaskulären PSECs**

Ziel dieser Arbeit war es auch, die Effekte von cAMP auf die Endothelbarriere sowohl von mikrovaskulären als auch von makrovaskulären Endothelzellen zu untersuchen und diese miteinander zu vergleichen. In mikrovaskulären HDMECs ergab die Behandlung mit F/R oder O-Me-cAMP deutlich erhöhte TER-Werte, was einer gesteigerten Barrierefunktion entsprach. Begleitet war diese cAMP-vermittelte Barrierestabilisierung durch eine Reorganisation der AJs und TJs. In der

---

ultrastrukturellen Analyse zeigten sich ebenso morphologische Veränderungen in der Kontaktzone. Dagegen konnte cAMP in makrovaskulären PSECs keine Barriereprotektiven Effekte ausüben – d.h. kein Anstieg des TER wurde beobachtet. Auch kam es nach F/R- oder O-Me-cAMP-Inkubation weder zu morphologischen Veränderungen in der IF-Mikroskopie noch in der TEM. Diese Ergebnisse deuten einmal mehr darauf hin, dass die Reorganisation der Junctionsproteine sowie die Reorganisation im Bereich der Kontaktzonen eine zentrale Rolle in der Regulation der Endothelbarriere einnehmen. Durch Bestimmung der cAMP-Spiegel konnte gezeigt werden, dass F/R in PSECs ähnlich wie in HDMECs zur Steigerung der intrazellulären cAMP-Spiegel führte. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass F/R unter den gegebenen Bedingungen ineffektiv bezüglich cAMP-Erhöhung war. Weitere biochemische Analysen von PSEC-Monolayern ergaben, dass weder F/R noch O-Me-cAMP im Gegensatz zu HDMECs in der Lage waren, Rac1 zu aktivieren. Die fehlende Rac1-Aktivierbarkeit könnte die ineffektive cAMP-vermittelte Barriestabilisierung in makrovaskulären PSECs erklären, was wiederum auf eine zentrale Rolle von Rac1 in der Regulation der Endothelbarriere hindeutet. Zusätzlich könnte dieser Aspekt auf einen grundlegenden Unterschied zwischen mikrovaskulären und makrovaskulären Endothelzellen im Allgemeinen oder zumindest zu makrovaskulären Zellen spezifischer Gefäßbereiche, wie zum Beispiel den pulmonalen Arterien, hinweisen. Die beobachteten Unterschiede zwischen HDMEC- und PSEC-Endothelzellen nach cAMP-Anstieg könnten natürlich auch andere Gründe haben, wie beispielsweise Unterschiede in der Spezies oder in den Kulturbedingungen. Allerdings ist bekannt, dass entzündliche Prozesse hauptsächlich die postkapillären Venulen betreffen (Aird, 2007). Entsprechend der vorgelegten Daten könnten Unterschiede in der cAMP-vermittelten Rac1-Regulation zu diesem Phänomen beitragen. Dennoch werden weitere Studien zur Charakterisierung der Effekte von cAMP und Rac1 *in vivo* nötig sein, um die oben dargestellten Beobachtungen vollständig verstehen zu können.

## 5 Zusammenfassung

Zwischen Blutkompartiment und umliegenden Interstitium besteht eine Barriere, die durch eine einzelne Schicht aus Endothelzellen gebildet wird. Essentiell für diese Barriere, deren Funktion in der Begrenzung des Austausches von Flüssigkeit und gelösten Stoffen liegt, sind interzelluläre Junctionen, welche die Endothelzellen miteinander verbinden. Durch eine gestörte Funktion und Regulation der Endothelbarriere entstehen beim Menschen verschiedene Pathologien wie zum Beispiel Ödeme, hämorrhagischer Schlaganfall und vaskuläre Malformationen.

Es ist bekannt, dass cAMP die Endothelbarriere zum Teil durch Aktivierung der kleinen GTPase Rac1 stabilisiert. Trotz der großen medizinischen Relevanz dieses Signalweges, sind die damit einhergehenden Effekte auf die interzellulären Kontakte auf ultrastruktureller Ebene weitgehend unbekannt.

In mikrovaskulären Endothelzellkulturen kam es ähnlich wie in intakten Mikrogefäßen zur Stärkung der Barrierefunktion. So resultierte sowohl nach Behandlung mit Forskolin und Rolipram (F/R), welche zur Steigerung der intrazellulären cAMP-Spiegel führen, als auch nach Zugabe von 8-(4-chlorophenylthio)-2'-O-methyladenosin-3',5'-cyclic monophosphorothioate (O-Me-cAMP), einem selektiven Aktivator des cAMP nachgeschalteten Epac/Rap1-Signalweges, ein Anstieg des TER; außerdem konnte durch beide Substanzen (F/R und O-Me-cAMP) die Aktivierung von Rac1 induziert werden. Desweiteren wurde eine verstärkte Intensität und Linearisierung des Immunfluoreszenzsignals der Zelljunctionsproteine VE-Cadherin und Claudin5 entlang der Zellgrenzen beobachtet.

In der ultrastrukturellen Analyse der interzellulären Kontaktzonen-Architektur zeigte sich unter F/R- oder O-Me-cAMP-Exposition ein signifikanter Anstieg an komplexen Interdigitationen. Diese komplexen Strukturen waren dadurch charakterisiert, dass sich die Membranen benachbarter Zellen, die durch zahlreiche endotheliale Junctionen stabilisiert wurden, über vergleichsweise lange Distanzen eng aneinanderlegten, so dass ein deutlich verlängerter Interzellularspalt resultierte. Die Inhibition der Rac1-Aktivierung durch NSC-23766 verminderte die Barrierefunktion und blockierte effektiv die O-Me-cAMP-vermittelte Barrierestabilisierung und Reorganisation der Kontaktzone einschließlich der Junctionsproteine.

Demgegenüber konnte die F/R-vermittelte Barrierestabilisierung durch NSC-23766 nicht beeinträchtigt werden.

Parallel dazu durchgeführte Experimente mit makrovaskulären Endothelien zeigten, dass es in diesem Zelltyp unter Bedingungen erhöhter cAMP-Konzentrationen weder zur Rac1-Aktivierung noch zur Barrierestärkung oder Kontaktzonen-Reorganisation kam.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in mikrovaskulären Endothelien Rac1-vermittelte Änderungen der Kontaktzonen-Morphologie zur cAMP-induzierten Barrierestabilisierung beitragen.

## Summary

Evidence exists that cAMP stabilizes the endothelial barrier in part via activation of the small GTPase Rac1. However, despite the high medical relevance of this signaling pathway, the mechanistic effects on intercellular contacts on the ultrastructural level are largely unknown. In microvascular endothelial cell monolayers, in which increased cAMP strengthened barrier properties similar to intact microvessels *in vivo*, both forskolin and rolipram (F/R) to increase cAMP and 8-(4-chlorophenylthio)-2'-O-methyladenosine-3',5'-cyclic monophosphorothioate (O-Me-cAMP) to stimulate exchange protein directly activated by cAMP/Ras proximate-1 (Epac/Rap1) signaling enhanced transendothelial electrical resistance (TER) and induced activation of Rac1. Concurrently, augmented immunofluorescence intensity and linearization of signals at cell borders were observed for intercellular junction proteins VE-cadherin and claudin5. Ultrastructural analysis of the intercellular contact zone morphology documented that exposure to F/R or O-Me-cAMP led to a significant increase in the proportion of contacts displaying complex interdigitations of cell borders in which membranes of neighboring cells were closely apposed over comparatively long distances and which were stabilized by numerous intercellular junctions. Interference with Rac1 activation by NSC-23766 completely abolished both barrier stabilization and contact zone reorganization in response to O-Me-cAMP whereas F/R-mediated barrier enhancement was not affected by NSC-23766. In parallel experiments using macrovascular endothelium, increased cAMP failed to induce Rac1 activation, barrier enhancement and contact zone reorganization. These results indicate that in microvascular endothelium Rac1-mediated alterations in contact zone architecture contributes to cAMP-induced barrier stabilization.

## 6 Literatur

- Adamson, R.H., F.E. Curry, G. Adamson, B. Liu, Y. Jiang, K. Aktories, H. Barth, A. Daigeler, N. Golenhofen, W. Ness, and D. Drenckhahn. 2002. Rho and rho kinase modulation of barrier properties: cultured endothelial cells and intact microvessels of rats and mice. *J Physiol.* 539:295-308.
- Adamson, R.H., J.F. Lenz, X. Zhang, G.N. Adamson, S. Weinbaum, and F.E. Curry. 2004. Oncotic pressures opposing filtration across non-fenestrated rat microvessels. *J Physiol.* 557:889-907.
- 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:H1885-1894.
- Adamson, R.H., J.C. Ly, R.K. Sarai, J.F. Lenz, A. Altangerel, D. Drenckhahn, and F.E. Curry. 2008. Epac/Rap1 pathway regulates microvascular hyperpermeability induced by PAF in rat mesentery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294:H1188-1196.
- Adamson, R.H., and C.C. Michel. 1993. Pathways through the intercellular clefts of frog mesenteric capillaries. *J Physiol.* 466:303-327.
- Adamson, R.H., M. Zeng, G.N. Adamson, J.F. Lenz, and F.E. Curry. 2003. PAF- and bradykinin-induced hyperpermeability of rat venules is independent of actin-myosin contraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285:H406-417.
- Aijaz, S., F. D'Atri, S. Citi, M.S. Balda, and K. Matter. 2005. Binding of GEF-H1 to the tight junction-associated adaptor cingulin results in inhibition of Rho signaling and G1/S phase transition. *Dev Cell.* 8:777-786.
- Aird, W.C. 2007. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* 100:158-173.
- Amano, M., M. Ito, K. Kimura, Y. Fukata, K. Chihara, T. Nakano, Y. Matsuura, and K. Kaibuchi. 1996. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem.* 271:20246-20249.
- Anastasiadis, P.Z., and A.B. Reynolds. 2001. Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Curr Opin Cell Biol.* 13:604-610.
- Andriopoulou, P., P. Navarro, A. Zanetti, M.G. Lampugnani, and E. Dejana. 1999. Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:2286-2297.
- Bamburg, J.R., and O.P. Wiggan. 2002. ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends Cell Biol.* 12:598-605.
- Baumer, Y. 2008. Die Rolle und Mechanismen der GTPasen Rac 1 und Rho A in der Regulation der Endothelbarriere. *Dissertationsarbeit.*
- Baumer, Y., S. Burger, F.E. Curry, N. Golenhofen, D. Drenckhahn, and J. Waschke. 2008a. Differential role of Rho GTPases in endothelial barrier regulation dependent on endothelial cell origin. *Histochem Cell Biol.* 129:179-191.
- Baumer, Y., D. Drenckhahn, and J. Waschke. 2008b. cAMP induced Rac 1-mediated cytoskeletal reorganization in microvascular endothelium. *Histochem Cell Biol.* 129:765-778.
- Baumer, Y., V. Spindler, R.C. Werthmann, M. Bunemann, and J. Waschke. 2009. Role of Rac 1 and cAMP in endothelial barrier stabilization and thrombin-induced barrier breakdown. *J Cell Physiol.* 220:716-726.
- Bazzoni, G., and E. Dejana. 2004. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev.* 84:869-901.
- Beckers, C.M., V.W. van Hinsbergh, and G.P. van Nieuw Amerongen. 2010. Driving Rho GTPase activity in endothelial cells regulates barrier integrity. *Thromb Haemost.* 103:40-55.
- Benninghoff, D. 2003. Anatomie Band 1. Auflage, editor. Urban und Fischer Verlag, München, Jena.
- Bernard, O. 2007. Lim kinases, regulators of actin dynamics. *Int J Biochem Cell Biol.* 39:1071-1076.
- Bevans, C.G., M. Kordel, S.K. Rhee, and A.L. Harris. 1998. Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. *J Biol Chem.* 273:2808-2816.

- Birukov, K.G., V.N. Bochkov, A.A. Birukova, K. Kawkitinarong, A. Rios, A. Leitner, A.D. Verin, G.M. Bokoch, N. Leitinger, and J.G. Garcia. 2004. Epoxycyclopentenone-containing oxidized phospholipids restore endothelial barrier function via Cdc42 and Rac. *Circ Res.* 95:892-901.
- Birukova, A.A., E. Alekseeva, A. Mikaelyan, and K.G. Birukov. 2007a. HGF attenuates thrombin-induced endothelial permeability by Tiam1-mediated activation of the Rac pathway and by Tiam1/Rac-dependent inhibition of the Rho pathway. *FASEB J.* 21:2776-2786.
- Birukova, A.A., D. Burdette, N. Moldobaeva, J. Xing, P. Fu, and K.G. Birukov. 2010. Rac GTPase is a hub for protein kinase A and Epac signaling in endothelial barrier protection by cAMP. *Microvasc Res.* 79:128-138.
- Birukova, A.A., P. Fu, J. Xing, and K.G. Birukov. 2009. Rap1 mediates protective effects of iloprost against ventilator-induced lung injury. *J Appl Physiol.* 107:1900-1910.
- Birukova, A.A., K. Smurova, K.G. Birukov, K. Kaibuchi, J.G. Garcia, and A.D. Verin. 2004. Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction. *Microvasc Res.* 67:64-77.
- Birukova, A.A., T. Zagranichnaya, E. Alekseeva, G.M. Bokoch, and K.G. Birukov. 2008. Epac/Rap and PKA are novel mechanisms of ANP-induced Rac-mediated pulmonary endothelial barrier protection. *J Cell Physiol.* 215:715-724.
- Birukova, A.A., T. Zagranichnaya, P. Fu, E. Alekseeva, W. Chen, J.R. Jacobson, and K.G. Birukov. 2007b. Prostaglandins PGE(2) and PGI(2) promote endothelial barrier enhancement via PKA- and Epac1/Rap1-dependent Rac activation. *Exp Cell Res.* 313:2504-2520.
- Bishop, A.L., and A. Hall. 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J.* 348 Pt 2:241-255.
- Bos, J.L. 2005. Linking Rap to cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* 17:123-128.
- Bourne, H.R., D.A. Sanders, and F. McCormick. 1990. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature.* 348:125-132.
- Bustelo, X.R., V. Sauzeau, and I.M. Berenjeno. 2007. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays.* 29:356-370.
- Carbajal, J.M., and R.C. Schaeffer, Jr. 1999. RhoA inactivation enhances endothelial barrier function. *Am J Physiol.* 277:C955-964.
- Carmeliet, P., M.G. Lampugnani, L. Moons, F. Breviaro, V. Compernelle, F. Bono, G. Balconi, R. Spagnuolo, B. Oosthuysse, M. Dewerchin, A. Zanetti, A. Angellilo, V. Mattot, D. Nuyens, E. Lutgens, F. Clotman, M.C. de Ruiter, A. Gittenberger-de Groot, R. Poelmann, F. Lupu, J.M. Herbert, D. Collen, and E. Dejana. 1999. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell.* 98:147-157.
- Caspar, D.L., D.A. Goodenough, L. Makowski, and W.C. Phillips. 1977. Gap junction structures. I. Correlated electron microscopy and x-ray diffraction. *J Cell Biol.* 74:605-628.
- Clough, G., and C.C. Michel. 1988. Quantitative comparisons of hydraulic permeability and endothelial intercellular cleft dimensions in single frog capillaries. *J Physiol.* 405:563-576.
- Coimbra, R., H. Melbostad, W. Loomis, R.D. Porcides, P. Wolf, M. Tobar, and D.B. Hoyt. 2006. LPS-induced acute lung injury is attenuated by phosphodiesterase inhibition: effects on proinflammatory mediators, metalloproteinases, NF-kappaB, and ICAM-1 expression. *J Trauma.* 60:115-125.
- 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.* 96:9815-9820.
- Cullere, X., S.K. Shaw, L. Andersson, J. Hirahashi, F.W. Luscinskas, and T.N. Mayadas. 2005. Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase. *Blood.* 105:1950-1955.
- Curry. 2002. Microvascular injury: mechanisms and modulation. *Int J Angiol.* 11:1-6.
- Curry, F.R., and R.H. Adamson. 2010. Vascular permeability modulation at the cell, microvessel, or whole organ level: towards closing gaps in our knowledge. *Cardiovasc Res.* 87:218-229.

- Davis, M.A., R.C. Ireton, and A.B. Reynolds. 2003. A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol.* 163:525-534.
- de Rooij, J., F.J. Zwartkruis, M.H. Verheijen, R.H. Cool, S.M. Nijman, A. Wittinghofer, and J.L. Bos. 1998. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature.* 396:474-477.
- 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.* 121:2115-2122.
- Dejana, E., E. Tournier-Lasserre, and B.M. Weinstein. 2009. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev Cell.* 16:209-221.
- Deng, X.L., F. He, J. Peng, L.F. Yang, C.L. Zhang, Q.L. Xiang, L.W. Wu, G.L. Wang, and F. Yin. 2011. [Influence of lipopolysaccharide on the permeability of rat brain microvascular endothelial cells and the molecular mechanism]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 13:908-911.
- DerMardirossian, C., and G.M. Bokoch. 2005. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol.* 15:356-363.
- Desplantez, T., E. Dupont, N.J. Severs, and R. Weingart. 2007. Gap junction channels and cardiac impulse propagation. *J Membr Biol.* 218:13-28.
- Dong, J.M., T. Leung, E. Manser, and L. Lim. 1998. cAMP-induced morphological changes are counteracted by the activated RhoA small GTPase and the Rho kinase ROKalpha. *J Biol Chem.* 273:22554-22562.
- 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.* 123:903-915.
- Drenckhahn D, N.W. 1997. The Endothelial Contractile Cytoskeleton Vascular Endothelium: Physiology, Pathology, and Therapeutic Opportunities. Stuttgart: Schattauer. p1-25.
- Dudek, S.M., J.R. Jacobson, E.T. Chiang, K.G. Birukov, P. Wang, X. Zhan, and J.G. Garcia. 2004. Pulmonary endothelial cell barrier enhancement by sphingosine 1-phosphate: roles for cortactin and myosin light chain kinase. *J Biol Chem.* 279:24692-24700.
- Dvorak, H.F., J.A. Nagy, D. Feng, L.F. Brown, and A.M. Dvorak. 1999. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 237:97-132.
- Dye, J.F., L. Leach, P. Clark, and J.A. Firth. 2001. Cyclic AMP and acidic fibroblast growth factor have opposing effects on tight and adherens junctions in microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc Res.* 62:94-113.
- Erez, N., A. Bershadsky, and B. Geiger. 2005. Signaling from adherens-type junctions. *Eur J Cell Biol.* 84:235-244.
- Essler, M., M. Amano, H.J. Kruse, K. Kaibuchi, P.C. Weber, and M. Aepfelbacher. 1998. Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 273:21867-21874.
- Essler, M., J.M. Staddon, P.C. Weber, and M. Aepfelbacher. 2000. Cyclic AMP blocks bacterial lipopolysaccharide-induced myosin light chain phosphorylation in endothelial cells through inhibition of Rho/Rho kinase signaling. *J Immunol.* 164:6543-6549.
- Feng, D., J.A. Nagy, J. Hipp, H.F. Dvorak, and A.M. Dvorak. 1996. Vesiculo-vacuolar organelles and the regulation of venule permeability to macromolecules by vascular permeability factor, histamine, and serotonin. *J Exp Med.* 183:1981-1986.
- Franke, W.W. 2009. Discovering the molecular components of intercellular junctions--a historical view. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1:a003061.
- Fritz, G., I. Just, and B. Kaina. 1999. Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer.* 81:682-687.
- Fukata, M., S. Kuroda, M. Nakagawa, A. Kawajiri, N. Itoh, I. Shoji, Y. Matsuura, S. Yonehara, H. Fujisawa, A. Kikuchi, and K. Kaibuchi. 1999. Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with beta-catenin. *J Biol Chem.* 274:26044-26050.

- 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.* 25:136-146.
- Furuse, M., M. Itoh, T. Hirase, A. Nagafuchi, S. Yonemura, and S. Tsukita. 1994. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol.* 127:1617-1626.
- Gallagher, P.J., B.P. Herring, and J.T. Stull. 1997. Myosin light chain kinases. *J Muscle Res Cell Motil.* 18:1-16.
- Gao, Y., J.B. Dickerson, F. Guo, J. Zheng, and Y. Zheng. 2004. Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:7618-7623.
- Gao, Y., J. Xing, M. Streuli, T.L. Leto, and Y. Zheng. 2001. Trp(56) of rac1 specifies interaction with a subset of guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem.* 276:47530-47541.
- Garcia, J.G., V. Lazar, L.I. Gilbert-McClain, P.J. Gallagher, and A.D. Verin. 1997. Myosin light chain kinase in endothelium: molecular cloning and regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 16:489-494.
- Garcia, J.G., F. Liu, A.D. Verin, A. Birukova, M.A. Dechert, W.T. Gerthoffer, J.R. Bamberg, and D. English. 2001. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest.* 108:689-701.
- Golenhofen, N., P. Htun, W. Ness, R. Koob, W. Schaper, and D. Drenckhahn. 1999. Binding of the stress protein alpha B-crystallin to cardiac myofibrils correlates with the degree of myocardial damage during ischemia/reperfusion in vivo. *J Mol Cell Cardiol.* 31:569-580.
- 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):583-588.
- Grosheva, I., M. Shtutman, M. Elbaum, and A.D. Bershadsky. 2001. p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *J Cell Sci.* 114:695-707.
- Gulino, D., E. Delachanal, E. Concord, Y. Genoux, B. Morand, M.O. Valiron, E. Sulpice, R. Scaife, M. Alemany, and T. Vernet. 1998. Alteration of endothelial cell monolayer integrity triggers resynthesis of vascular endothelium cadherin. *J Biol Chem.* 273:29786-29793.
- Gustafsson, F., H.B. Mikkelsen, B. Arensbak, L. Thuneberg, S. Neve, L.J. Jensen, and N.H. Holstein-Rathlou. 2003. Expression of connexin 37, 40 and 43 in rat mesenteric arterioles and resistance arteries. *Histochem Cell Biol.* 119:139-148.
- Habets, G.G., E.H. Scholtes, D. Zuydgeest, R.A. van der Kammen, J.C. Stam, A. Berns, and J.G. Collard. 1994. Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. *Cell.* 77:537-549.
- Hartmann, C., A. Zozulya, J. Wegener, and H.J. Galla. 2007. The impact of glia-derived extracellular matrices on the barrier function of cerebral endothelial cells: an in vitro study. *Exp Cell Res.* 313:1318-1325.
- Hermanns, M.I., R.E. Unger, K. Kehe, K. Peters, and C.J. Kirkpatrick. 2004. Lung epithelial cell lines in coculture with human pulmonary microvascular endothelial cells: development of an alveolo-capillary barrier in vitro. *Lab Invest.* 84:736-752.
- Heupel, W.M., A. Efthymiadis, N. Schlegel, T. Muller, Y. Baumer, W. Baumgartner, D. Drenckhahn, and J. Waschke. 2009. Endothelial barrier stabilization by a cyclic tandem peptide targeting VE-cadherin transinteraction in vitro and in vivo. *J Cell Sci.* 122:1616-1625.
- Ireton, R.C., M.A. Davis, J. van Hengel, D.J. Mariner, K. Barnes, M.A. Thoreson, P.Z. Anastasiadis, L. Matrisian, L.M. Bundy, L. Sealy, B. Gilbert, F. van Roy, and A.B. Reynolds. 2002. A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol.* 159:465-476.
- Jacobson, J.R., S.M. Dudek, P.A. Singleton, I.A. Kolosova, A.D. Verin, and J.G. Garcia. 2006. Endothelial cell barrier enhancement by ATP is mediated by the small GTPase Rac and cortactin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 291:L289-295.

- Jaffe, A.B., and A. Hall. 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:247-269.
- Jeong, H.W., Z. Li, M.D. Brown, and D.B. Sacks. 2007. IQGAP1 binds Rap1 and modulates its activity. *J Biol Chem.* 282:20752-20762.
- Jou, T.S., and W.J. Nelson. 1998. Effects of regulated expression of mutant RhoA and Rac1 small GTPases on the development of epithelial (MDCK) cell polarity. *J Cell Biol.* 142:85-100.
- Jou, T.S., E.E. Schneeberger, and W.J. Nelson. 1998. Structural and functional regulation of tight junctions by RhoA and Rac1 small GTPases. *J Cell Biol.* 142:101-115.
- Kim, M.P., S.I. Park, S. Kopetz, and G.E. Gallick. 2009. Src family kinases as mediators of endothelial permeability: effects on inflammation and metastasis. *Cell Tissue Res.* 335:249-259.
- Kimura, K., M. Ito, M. Amano, K. Chihara, Y. Fukata, M. Nakafuku, B. Yamamori, J. Feng, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1996. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science.* 273:245-248.
- King, J., T. Hamil, J. Creighton, S. Wu, P. Bhat, F. McDonald, and T. Stevens. 2004. Structural and functional characteristics of lung macro- and microvascular endothelial cell phenotypes. *Microvasc Res.* 67:139-151.
- Knox, A.L., and N.H. Brown. 2002. Rap1 GTPase regulation of adherens junction positioning and cell adhesion. *Science.* 295:1285-1288.
- Koga, S., S. Morris, S. Ogawa, H. Liao, J.P. Bilezikian, G. Chen, W.J. Thompson, T. Ashikaga, J. Brett, D.M. Stern, and et al. 1995. TNF modulates endothelial properties by decreasing cAMP. *Am J Physiol.* 268:C1104-1113.
- Kooistra, M.R., M. Corada, E. Dejana, and J.L. Bos. 2005. Epac1 regulates integrity of endothelial cell junctions through VE-cadherin. *FEBS Lett.* 579:4966-4972.
- Kooistra, M.R., N. Dube, and J.L. Bos. 2007. Rap1: a key regulator in cell-cell junction formation. *J Cell Sci.* 120:17-22.
- Kouklis, P., M. Konstantoulaki, S. Vogel, M. Broman, and A.B. Malik. 2004. Cdc42 regulates the restoration of endothelial barrier function. *Circ Res.* 94:159-166.
- Krugmann, S., R. Williams, L. Stephens, and P.T. Hawkins. 2004. ARAP3 is a PI3K- and rap-regulated GAP for RhoA. *Curr Biol.* 14:1380-1384.
- Kumar, N.M., and N.B. Gilula. 1996. The gap junction communication channel. *Cell.* 84:381-388.
- Kuroda, S., M. Fukata, M. Nakagawa, K. Fujii, T. Nakamura, T. Ookubo, I. Izawa, T. Nagase, N. Nomura, H. Tani, I. Shoji, Y. Matsuura, S. Yonehara, and K. Kaibuchi. 1998. Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Science.* 281:832-835.
- Longenecker, K., P. Read, U. Derewenda, Z. Dauter, X. Liu, S. Garrard, L. Walker, A.V. Somlyo, R.K. Nakamoto, A.P. Somlyo, and Z.S. Derewenda. 1999. How RhoGDI binds Rho. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 55:1503-1515.
- Matsui, T., M. Amano, T. Yamamoto, K. Chihara, M. Nakafuku, M. Ito, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1996. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J.* 15:2208-2216.
- 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.* 79:703-761.
- Michiels, C. 2003. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol.* 196:430-443.
- Millan, J., R.J. Cain, N. Reglero-Real, C. Bigarella, B. Marcos-Ramiro, L. Fernandez-Martin, I. Correas, and A.J. Ridley. 2010. Adherens junctions connect stress fibres between adjacent endothelial cells. *BMC Biol.* 8:11.
- Miyoshi, J., and Y. Takai. 2005. Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. *Adv Drug Deliv Rev.* 57:815-855.
- Noren, N.K., B.P. Liu, K. Burridge, and B. Kreft. 2000. p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol.* 150:567-580.

- Noritake, J., T. Watanabe, K. Sato, S. Wang, and K. Kaibuchi. 2005. IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. *J Cell Sci.* 118:2085-2092.
- Nottebaum, A.F., G. Cagna, M. Winderlich, A.C. Gamp, R. Linnepe, C. Polaschegg, K. Filippova, R. Lyck, B. Engelhardt, O. Kamenyeva, M.G. Bixel, S. Butz, and D. Vestweber. 2008. VE-PTP maintains the endothelial barrier via plakoglobin and becomes dissociated from VE-cadherin by leukocytes and by VEGF. *J Exp Med.* 205:2929-2945.
- Obaishi, H., H. Nakanishi, K. Mandai, K. Satoh, A. Satoh, K. Takahashi, M. Miyahara, H. Nishioka, K. Takaishi, and Y. Takai. 1998. Frabin, a novel FGD1-related actin filament-binding protein capable of changing cell shape and activating c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem.* 273:18697-18700.
- Peng, X., P.M. Hassoun, S. Sammani, B.J. McVerry, M.J. Burne, H. Rabb, D. Pearse, R.M. Tuder, and J.G. Garcia. 2004. Protective effects of sphingosine 1-phosphate in murine endotoxin-induced inflammatory lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 169:1245-1251.
- Popoff, M.R., and B. Geny. 2009. Multifaceted role of Rho, Rac, Cdc42 and Ras in intercellular junctions, lessons from toxins. *Biochim Biophys Acta.* 1788:797-812.
- 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:L972-980.
- Ramchandran, R., D. Mehta, S.M. Vogel, M.K. Mirza, P. Kouklis, and A.B. Malik. 2008. Critical role of Cdc42 in mediating endothelial barrier protection in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 295:L363-369.
- Reynolds, A.B. 2007. p120-catenin: Past and present. *Biochim Biophys Acta.* 1773:2-7.
- Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 17:208-212.
- Ridley, A.J. 2001. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci.* 114:2713-2722.
- Ridley, A.J. 2004. Rho proteins and cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 84:13-19.
- Ridley, A.J., H.F. Paterson, C.L. Johnston, D. Diekmann, and A. Hall. 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell.* 70:401-410.
- Ridley, A.J., A.J. Self, F. Kasmi, H.F. Paterson, A. Hall, C.J. Marshall, and C. Ellis. 1993. rho family GTPase activating proteins p190, bcr and rhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo. *EMBO J.* 12:5151-5160.
- Rossmann, K.L., C.J. Der, and J. Sondek. 2005. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:167-180.
- Rubin, L.L., and J.M. Staddon. 1999. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci.* 22:11-28.
- Ruffer, C., A. Strey, A. Janning, K.S. Kim, and V. Gerke. 2004. Cell-cell junctions of dermal microvascular endothelial cells contain tight and adherens junction proteins in spatial proximity. *Biochemistry.* 43:5360-5369.
- Schlegel, N., Y. Baumer, D. Drenckhahn, and J. Waschke. 2009. Lipopolysaccharide-induced endothelial barrier breakdown is cyclic adenosine monophosphate dependent in vivo and in vitro. *Crit Care Med.* 37:1735-1743.
- Schlegel, N., and J. Waschke. 2009. Impaired cAMP and Rac 1 signaling contribute to TNF-alpha-induced endothelial barrier breakdown in microvascular endothelium. *Microcirculation.* 16:521-533.
- Schneeberger, E.E., and R.D. Lynch. 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286:C1213-1228.
- 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.
- Seibert, A.F., W.J. Thompson, A. Taylor, W.H. Wilborn, J. Barnard, and J. Haynes. 1992. Reversal of increased microvascular permeability associated with ischemia-reperfusion: role of cAMP. *J Appl Physiol.* 72:389-395.

- Seybold, J., D. Thomas, M. Witzenrath, S. Boral, A.C. Hocke, A. Burger, A. Hatzelmann, H. Tenor, C. Schudt, M. Krull, H. Schutte, S. Hippenstiel, and N. Suttorp. 2005. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -dependent expression of phosphodiesterase 2: role in endothelial hyperpermeability. *Blood*. 105:3569-3576.
- Simionescu, M., N. Simionescu, and G.E. Palade. 1975. Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. The microvasculature. *J Cell Biol*. 67:863-885.
- Spindler, V., N. Schlegel, and J. Waschke. 2010. Role of GTPases in control of microvascular permeability. *Cardiovasc Res*. 87:243-253.
- Springer, T.A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 76:301-314.
- 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*. 139:157-166.
- Sun, H., J.W. Breslin, J. Zhu, S.Y. Yuan, and M.H. Wu. 2006. Rho and ROCK signaling in VEGF-induced microvascular endothelial hyperpermeability. *Microcirculation*. 13:237-247.
- Tcherkezian, J., and N. Lamarche-Vane. 2007. Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol Cell*. 99:67-86.
- Tiruppathi, C., A.B. Malik, P.J. Del Vecchio, C.R. Keese, and I. Giaever. 1992. Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: assessment of endothelial barrier function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:7919-7923.
- Tsukita, S., M. Furuse, and M. Itoh. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:285-293.
- van Nieuw Amerongen, G.P., S. van Delft, M.A. Vermeer, J.G. Collard, and V.W. van Hinsbergh. 2000. Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of Rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circ Res*. 87:335-340.
- Vandenbroucke, E., D. Mehta, R. Minshall, and A.B. Malik. 2008. Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann N Y Acad Sci*. 1123:134-145.
- Vestweber, D. 2008. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 28:223-232.
- Vouret-Craviari, V., C. Bourcier, E. Boulter, and E. van Obberghen-Schilling. 2002. Distinct signals via Rho GTPases and Src drive shape changes by thrombin and sphingosine-1-phosphate in endothelial cells. *J Cell Sci*. 115:2475-2484.
- Waschke, J., W. Baumgartner, R.H. Adamson, M. Zeng, K. Aktories, H. Barth, C. Wilde, F.E. Curry, and D. Drenckhahn. 2004a. Requirement of Rac activity for maintenance of capillary endothelial barrier properties. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 286:H394-401.
- Waschke, J., S. Burger, F.R. Curry, D. Drenckhahn, and R.H. Adamson. 2006. Activation of Rac-1 and Cdc42 stabilizes the microvascular endothelial barrier. *Histochem Cell Biol*. 125:397-406.
- 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:H1296-1305.
- Waschke, J., D. Drenckhahn, R.H. Adamson, H. Barth, and F.E. Curry. 2004b. cAMP protects endothelial barrier functions by preventing Rac-1 inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 287:H2427-2433.
- Waschke, J., D. Drenckhahn, R.H. Adamson, and F.E. Curry. 2004c. Role of adhesion and contraction in Rac 1-regulated endothelial barrier function in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 287:H704-711.
- Watanabe, T., K. Sato, and K. Kaibuchi. 2009. Cadherin-mediated intercellular adhesion and signaling cascades involving small GTPases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1:a003020.
- Weed, S.A., and J.T. Parsons. 2001. Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene*. 20:6418-6434.
- Wennerberg, K., K.L. Rossman, and C.J. Der. 2005. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci*. 118:843-846.
- Werthmann, R.C., K. von Hayn, V.O. Nikolaev, M.J. Lohse, and M. Bunemann. 2009. Real-time monitoring of cAMP levels in living endothelial cells: thrombin transiently inhibits adenylyl cyclase 6. *J Physiol*. 587:4091-4104.

- 
- Wijsman, J.A., and R.R. Shivers. 1998. Immortalized mouse brain endothelial cells are ultrastructurally similar to endothelial cells and respond to astrocyte-conditioned medium. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 34:777-784.
- Wildenberg, G.A., M.R. Dohn, R.H. Carnahan, M.A. Davis, N.A. Lobdell, J. Settleman, and A.B. Reynolds. 2006. p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. *Cell.* 127:1027-1039.
- Wojciak-Stothard, B., A. Entwistle, R. Garg, and A.J. Ridley. 1998. Regulation of TNF-alpha-induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in human endothelial cells. *J Cell Physiol.* 176:150-165.
- Wojciak-Stothard, B., S. Potempa, T. Eichholtz, and A.J. Ridley. 2001. Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability. *J Cell Sci.* 114:1343-1355.
- Wojciak-Stothard, B., and A.J. Ridley. 2002. Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol.* 39:187-199.
- Wojciak-Stothard, B., L.Y. Tsang, and S.G. Haworth. 2005. Rac and Rho play opposing roles in the regulation of hypoxia/reoxygenation-induced permeability changes in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 288:L749-760.
- Xiao, K., D.F. Allison, K.M. Buckley, M.D. Kottke, P.A. Vincent, V. Faundez, and A.P. Kowalczyk. 2003. Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *J Cell Biol.* 163:535-545.
- Yamada, S., S. Pokutta, F. Drees, W.I. Weis, and W.J. Nelson. 2005. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell.* 123:889-901.
- Zhao, J., P.A. Singleton, M.E. Brown, S.M. Dudek, and J.G. Garcia. 2009. Phosphotyrosine protein dynamics in cell membrane rafts of sphingosine-1-phosphate-stimulated human endothelium: role in barrier enhancement. *Cell Signal.* 21:1945-1960.

## 7 Anhang

### 7.1 Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben zahlreiche Personen mit Rat und Tat beigetragen. Auf diesem Wege möchte ich mich bei allen bedanken.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Jens Waschke für die Überlassung dieses interessanten Themas und die gute Unterstützung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Volker Spindler, für seine Hilfe, Anregungen und seinen unermüdlichen Einsatz, die Arbeit voranzutreiben.

Ein großer Dank gilt auch den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Waschke am Institut für Anatomie und Zellbiologie in Würzburg: Nadja Niedermeier und Lisa Bergauer, für die freundliche Aufnahme, die gute Zusammenarbeit, die Geduld bei der Erläuterung der technischen Umsetzung der Versuche und die vielen angenehmen Stunden, die diese Arbeit wie im Flug passieren ließen. Die Zusammenarbeit und die gemeinsame Zeit haben mir viel Spaß gemacht.

Besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Esther Asan und ihren Mitarbeiterinnen Karin Reinfurt-Gehm und Sieglinde Schenk für die Anleitung in der Transmissionselektronenmikroskopie und die tatkräftige Unterstützung. Die Zeit mit Euch möchte ich nicht missen.

Danke sagen will ich auch Herrn Prof. Dr. Detlev Drenckhahn, der stets ein offenes Ohr für mich hatte.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie, die mir dieses Studium und damit auch meine Promotion ermöglicht hat.

Abschließend gilt mein größter Dank meiner Ehefrau und damaligen Freundin Bambam. Danke, dass Du immer für mich da bist.

## 7.2 Lebenslauf

|                                  |                   |   |
|----------------------------------|-------------------|---|
| <i>Name:</i>                     | Dominik Peter     |   |
| <i>Geburtsdatum:</i>             | 18.07.1985        |   |
| <i>Geburtsort:</i>               | Würzburg          |   |
| <i>Familienstand:</i>            | verheiratet       |   |
| <br><i>Schulbildung:</i>         | 09/1992 – 08/1996 | Grundschule Großrinderfeld  |
|                                  | 09/1996 – 06/2005 | M.-G.-Gymnasium Tauberbischofsheim<br><i>Abschluss: Abitur</i>  |
| <br><i>Studium:</i>              | 10/2005 – 11/2011 | Studium der Humanmedizin,<br>Julius-Maximilians-Universität Würzburg<br><br><i>Abschluss: Staatsexamen</i>  |
|                                  | 02/2008 – 03/2008 | Famulatur in der Chirurgie,<br>Kreiskrankenhaus Tauberbischofsheim  |
|                                  | 07/2008 – 08/2008 | Famulatur in der Gynäkologie,<br>Oshakati State Hospital, Namibia   |
|                                  | 08/2009 – 09/2009 | Famulatur in der ambulanten<br>Patientenversorgung,<br>Oshakati State Hospital, Namibia   |
|                                  | 09/2009 – 09/2009 | Famulatur in der Chirurgie,<br>Oshakati State Hospital, Namibia   |
|                                  | 08/2010 – 07/2011 | Praktisches Jahr:<br>1. Terial: Chirurgie,<br>Universitätsklinikum Würzburg<br>2. Terial: Kinderheilkunde,<br>Universitätsklinikum Würzburg<br>3. Terial: Innere Medizin,<br>Caritas-Krankenhaus, Bad Mergentheim |
|                                  | 21/11/2011        | Approbation als Arzt  |
| <br><i>Berufliche Tätigkeit:</i> | seit 03/2012      | Assistenzarzt,<br>Fachklinik für Allgemein-, Viszeral- und<br>Gefäßchirurgie,<br>Caritas-Krankenhaus, Bad Mergentheim   |

*Wissenschaftliche Tätigkeit:*

*Originalarbeiten:*

- Spindler V.\*, Peter D.\*, Asan E., Waschke J. (2011)  
Ultrastructural analysis reveals cAMP-dependent enhancement of microvascular endothelial barrier functions via Rac 1-mediated reorganization of intercellular junctions.  
*Am J Pathol.* 2011 May; 178(5):2424-36. Epub 2011 Mar 31.  
\*geteilte Erstautorenschaft

*Kongressbeiträge:*

- Peter D., Spindler V., Asan E., Waschke J. (2010)  
Role of Rac1 in cAMP-mediated reorganization of intercellular junctions – first insights from electron microscopy.  
*105. Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft, 26.03.-29.03.2010, Hamburg*
- Peter D., Spindler V., Asan E., Waschke J. (2010)  
cAMP via Epac/Rap1 enhanced microvascular endothelial barrier functions via Rac1-mediated reorganization of adherens and tight junctions.  
*Experimental Biology (FASEB), 24.04.-28.04.2010, Anaheim, USA*
- Peter D., Hagen R., Abele-Horn M., van der Linden M., Prelog M., Straßburg, H.-M., Liese J. (2011)  
Recurrent pneumococcal meningitis despite vaccination with three different pneumococcal vaccines and penicillin prophylaxis  
*29<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID), 07.06.-11.06.2011, The Hague, The Netherlands*
- Spindler V, Peter D, Waschke J (2011).  
Ultrastructural changes of intercellular junctions under conditions of cAMP/Rac1-mediated enhancement of microvascular endothelial barrier functions  
*Joint Meeting of the European Society for Microcirculation and the Gesellschaft für Mikrozirkulation und vaskuläre Biologie, 13.10-16.10.2011*