Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie
und Pneumologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Wirkung von Adrenomedullin auf die epitheliale Permeabilität des Darms in vivo und in vitro

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Corinna von Carlowitz
aus Witten/Ruhr

Datum der Promotion: 2. März 2018

Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungsverzeichnis 7

2 Zusammenfassung/Summary 8

3 Einleitung 10

3.1 Intestinale Barriere 10

3.1.1 Regulation der epithelialen Permeabilität 11

3.2 Darm und Sepsis 13

3.2.1 *Staphylococcus aureus* Alphatoxin und Wasserstoffperoxid 18

3.3 Adrenomedullin (AM) 21

3.3.1 AM in der Sepsis 23

3.3.2 AM-Wirkung am Darm 25

4 Zielsetzung und Fragestellung 27

5 Material und Methoden 28

5.1 Materialien 28

5.1.1 Materialien und Messgeräte für den Tierversuch 28

5.1.2 Chemikalien und Pharmaka für den Tierversuch 29

5.1.3 Materialien und Messgeräte für die Zellkultur 29

5.1.4 Chemikalien und Pharmaka für die Zellkultur 30

5.2 Methoden 30

5.2.1 Tiermodell zur Bestimmung der intestinalen Permeabilität 30

5.2.1.1 Tiere 30

5.2.1.2 Narkose und Beatmung 31

5.2.1.3 Präparation der ligierten Ileumschlange (ligated loop) 32

5.2.1.4 Quantifizierung der epithelialen Permeabilität 32

5.2.2 Zellkultur Epithelzellen 34

5.2.2.1 CaCo-2 Zellen 34

5.2.2.2 Pflege und Kultivierung der CaCo-2 Zellen 34

5.2.2.3 Passagieren der Zellen 35
5.2.2.4 Kryokonservierung der Zellen 36
5.2.2.5 Auftauen der Zellen 36
5.2.3 CaCo-2 Zellkultur im Transwell®-Kammersystem 36
5.2.3.1 Permeation von parazellulären molekularen Markern 38
5.2.3.2 Messung des Transepithelialen Elektrischen Widerstands 38
5.3 Permeabilitätsversuche und experimentelles Protokoll 39
5.3.1.1 Vorbedingungen 39
5.3.2 Messung von intrazellulärem cAMP 41
5.3.2.1 Probengewinnung 42
5.3.2.2 Bestimmung der Phosphodiesterase-Isoenzyme 42
5.3.3 Ussing-Kammer 43
5.3.4 Statistik 44
6 Ergebnisse 46
6.1 AM verbessert die intestinale Barrierefunktion am Ganztier 46
6.2 AM senkt die Farbstoffpermeation am CaCo-2 Zellmonolayer nach Applikation von α-Toxin 47
6.3 AM verbessert die durch H_2O_2 ausgelöste Dysfunktion der epithelialen Barriere 49
6.4 Am intakten Rattenkolon in der Ussing-Kammer senkt AM die durch H_2O_2 induzierte Hyperpermeabilität 51
6.5 AM hat keinen Einfluss auf den Anstieg des sekundären Botenstoffs cAMP in den CaCo-2 Zellen 51
6.5.1 Aktivitätsprofil für Phosphodiesterasen der CaCo-2 Zellen 52
6.5.2 Durch Hemmung der Phosphodiesterasen verbessert sich die epitheliale Barrierefunktion nicht 53
6.6 Am Kolon der Ratte in der Ussing-Kammer bewirkt die Gabe von AM keine Änderung der epithelialen Permeabilität 54

6.7 Eine Inhibition der Proteinkinasen hat keinen Einfluss auf die Regulation der epithelialen Barrierefunktion 55
7 Diskussion und Zusammenfassung 57
7.1 Diskussion 57
7.1.1 Untersuchungen zur epithelialen Permeabilität 57
7.1.2 Endotheliale Permeabilität 57
7.1.3 Sepsis 59
7.1.4 AM-Wirkungen am Darm 59
7.2 Signalvermittlung von AM 61
7.3 Zusammenfassung 64
7.4 Therapeutische Ansätze und Ausblick 65
8 Literaturverzeichnis 68
9 Danksagung 87
10 Eidesstattliche Erklärung 88
11 Lebenslauf: Corinna von Carlowitz 89
12 Publikation Originalarbeit 90

1 Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylylcyclase
AJ	Adherens Junction
α-Toxin	*Staphylococcus aureus* alpha-Toxin
AM	Adrenomedullin
AMBP-1	Adrenomedullin-serum-binding-protein-1
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
CaCo-2	humane Epithelzellen aus einem kolorektalen Adenokarzinom
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CGRP	Calcitonin gene related peptide
GALT	gut-associated-lymphatic-tissue
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
IBD	Inflammatory bowel disease
IFN-γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
Ligated loop	Ligierte Schlinge
MLC	Myosinleichtkette
MODS	Multiple-Organ-Dysfunction-Syndrome
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
PDE	Phosphodiesterase
PAMP	Proadrenomedullin N-terminal 20 Peptide
RAMP	Receptor Activity-Modifying Protein
ROCK-Kinase	Rho-associated protein kinase
S.aureus	*Staphylococcus aureus*
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SOFA-score	Sequential Organ Failure Assessment Score
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
TJ	Tight Junction
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
ZO	Zonula occludens

2 Zusammenfassung/Summary

Eine erhöhte Durchlässigkeit der mucosalen Darmbarriere beim kritisch kranken Patienten kann die Translokation von Bakterien und deren Virulenzfaktoren erlauben. Dadurch können eine Entzündungsreaktion und eine Sepsis aufrechterhalten werden. Die Literatur deutet darauf hin, dass das Peptidhormon AM die endotheliale Barrierefunktion und die Regulierung der zirkulatorischen Funktion in der Sepsis verbessern kann.

In dieser Arbeit wurde die Hypothese geprüft, dass exogen appliziertes AM die epitheliale Barriere des Darms stabilisiert. Die Gabe des Exotoxins α-Toxin von *Staphylococcus aureus* simulierte im Tiermodell bei Ratten einen septischen Schock. In diesem Modell reduzierte die therapeutische Infusion von AM die Translokation von markiertem Dextran vom Darm in die systemische Zirkulation. AM wirkte barrierestabilisierend in der Zellkultur mit CaCo-2 Zellen nach Exposition mit α-Toxin und H_2O_2, sowie am Rattenkolon in der Ussing-Kammer.

Am Endothel stabilisiert AM die Barrierefunktion über intrazelluläre Signale des sekundären Botenstoffes cAMP. In den CaCo-2 Zellen konnte kein Anstieg von intrazellulärem cAMP festgestellt werden.

CaCo-2 Zellen zeigen eine hohe Aktivität der Phosphodiesterasen 3 und 4, die cAMP abbauen. Auch durch eine Inhibition der PDE 3/4 kam es mit AM zu keinem cAMP-Anstieg, wohingegen der Adenylylcyclase-Aktivator Forskolin eine signifikanten Anstieg von cAMP in den Zellen bewirkte. Zudem konnte die Inhibition der Phosphodiesterasen weder den durch AM induzierten stabilisierenden Effekt auf die epitheliale Barriere verstärken, noch beeinträchtigte AM den cAMP-abhängigen Kurzschlussstrom am Kolon der Ratte. Auch die Inhibtion der entsprechenden Kinasen, die in der Vermittlung des Signalweges von AM eine Rolle spielen, beeinflussten den elektrischen Widerstand des CaCo-2 Zellmonolayer nicht. Somit indizieren diese Ergebnisse, dass AM die darmepitheliale Barriere cAMP-unabhängig stabilisiert.

Summary

An increased permeability of the mucosal gut barrier of the critically ill patient supports the translocation of bacteria and their virulence factors, which triggers or maintains a severe inflammation and sepsis.
Literature suggests that the peptide hormon Adrenomedullin reinforces the endothelial barrier function and the regulation of the circulatory function during a septic state.

This thesis tests the hypothesis that exogenously applied AM has a stabilizing effect on the epithelial barrier of the gut. The dosage of the exotoxin α-toxin from *staphylococcus aureus* simulated a septic shock on rats. In a therapeutic setting the infusion of AM reduced the translocation of labeled dextran from the gut into the systemic circulation. AM also showed barrier-stabilizing properties in the CaCo-2 cell culture after α-Toxin and H_2O_2 exposition and in the rat colon Ussing chamber studies.

AM stabilizes the endothelial barrier function via intracellular cAMP-signals. An increase of intracellular cAMP content could not be confirmed in the CaCo cells.
The CaCo-2 cell line showed high activity of phosphodiesterases 3 and 4, which degrade cAMP. Even by inhibiting the phosphodiesterases, AM did not cause a cAMP-increase, whereas the adenylylcyclase activator forscolin induced strong cAMP elevation. Furthermore the inhibition of the phosphodiesterases could not enhance the AM-related stabilizing effect of the epithelial barrier, nor AM impaired the cAMP-related short circuit current of the rat colon. The inhibition of the respective kinases, which are implicated in mediating the signalling pathway of AM also did not affect the electrical resistance of the CaCo-2 monolayer.
In conclusion: AM seems to stabilize the gut barrier function during severe inflammation.

3 Einleitung

3.1 Intestinale Barriere

Der Darm ist aufgrund seiner enorm großen Kontakt- und Austauschfläche zur Außenwelt von wichtiger Bedeutung für die Erhaltung der Gesundheit des Menschen. Er bildet die größte mukosale Verbindung zwischen der sich stets ändernden Umwelt und dem inneren Milieu.

Die Fähigkeit des Darmepithels eine selektive Barriere zwischen der äußeren Umwelt und dem inneren Milieu aufrecht zu erhalten, ist essentiell, um den Übertritt von kommensalen Bakterien und Pathogenen zu verhindern, und damit unabdingbar für den Erhalt der Gesundheit des Menschen.

Die intestinale Barriere umfasst eine Fläche von ca. 400 cm^2 und verbraucht ca. 40% der Körperenergie. Sie verhindert den Verlust von Wasser und Elektrolyten und den Übertritt von Pathogenen aus dem Darmlumen (Brandtzaeg, 2011).

Die Gesamtheit der an der Bildung der intestinalen Barriere beteiligten Strukturen bezeichnete Cummings als „mukosale Barriere“ (Cummings, 2004).

Die physikalische intestinale Barriere besteht aus dem vaskulären Endothel, der Epithelzellschicht und dem Mukusschleim, der dem Epithel direkt aufliegt und es vor Verdauungsenzymen im Darmlumen schützt, sowie die Adhäsion von Bakterien an das Epithel verhindert (Turner, 2009; Sanchez de Medina, 2014; Keita, 2010; Dupont, 2014).

Neben der physikalischen Barriere sind chemische Substanzen, wie Darmsäfte, Immunmoleküle und Zellprodukte (Zytokine, Entzündungsmediatoren, antimikrobielle Peptide), sowie das intestinale Mikrobiom an der Barrierebildung beteiligt (Bischoff, 2014).

Die Hauptgrenzschicht zwischen dem Lumen und dem Schleimhautgewebe bildet das Epithel. Die Epithelzellschicht ist sehr dünn, was wichtig für die Resorption von Nahrungsbestandteilen ist, aber im Falle einer Störung auch erhebliche Risiken für den Organismus birgt (Ceppa, 2003; Fink, 2003).

Im Darmlumen befinden sich bakterielle Mikroorganismen in einer Größenordnung von 10^{12} pro Millimeter auf einer enorm großen intestinalen Austauschfläche (Gatt, 2015). In dieser immensen Bakterienvielzahl sind potentiell pathogene von „nützlichen“ Bakterien zu unterscheiden, die nicht nur das Immunsystem stimulieren, sondern wiederum selbst vor eindringenden Bakterien und Viren schützen können (Alarcon,

2016). Die Fähigkeit, die Aufnahme von Substanzen entlang der Mukosa zu kontrollieren, sowie das interne Milieu vor Pathogenen zu schützen, wird von Gatt et al. als „Intestinale Barrierefunktion“ beschrieben (Gatt, 2015). Die intestinale Barriere ist eine funktionelle Einheit, bestehend aus den mechanischen Elementen wie dem Mukus und der Epithelzellschicht, den humoralen und immunologischen Zellelementen (Defensine, IgA, Lymphozyten, eigene Immunzellen), sowie den muskulären und den neurologischen Elementen. Die „intestinale Permeabilität“ dagegen beschreibt eine funktionale Eigenschaft der intestinalen Barriere, die durch die Analyse von Durchflussraten vorwiegend inerter Moleküle entlang der intestinalen Barriere gemessen werden kann (Bischoff, 2014).

Viele Faktoren können die intestinale Permeabilität verändern: Dazu zählt neben einer direkten Schädigung des Epithels eine Veränderung der Darmflora, sowie die Beeinträchtigung der schützenden Funktion des Mukusschleims (Moreira, 2012).
Eine Störung der intestinalen Barrierefunktion kann entweder im Rahmen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (inflammatory bowel disease, IBD) wie der Morbus Crohn, die Colitis ulzerosa, die Zöliakie und das Reizdarmsyndrom, oder systemischer Krankheiten (Diabetes mellitus Typ I, Multiple Sklerose, Rheumatoide Arthritis und Autismus) (Odenwald, 2013) entstehen, sowie abrupt, wie beispielsweise nach einem schweren Trauma, in der Sepsis und im septischen Schock.

3.1.1 Regulation der epithelialen Permeabilität

Die intestinale Mukosabarriere besteht aus einer Schicht säulenförmig angeordneter Epitehlzellen, die in engem Kontakt mit der darunterliegenden Lamina propria, welche Immunzellen, Kapillaren und Lymphgefäße enthält, stehen. Im Dünndarm bildet das Epithel gefaltete luminale Strukturen (Krypten und Villi), im Dickdarm dagegen findet man nur noch Krypten. Die Epithelzellen werden kontinuierlich von in der Kryptenbasis liegenden Stammzellen erneuert, die dann entlang der Krypten Richtung Lumen proliferieren, differenzieren und migrieren (Luissint, 2016).
Die epitheliale Barrierefunktion wird von einer Reihe von interzellulären Verbindungen gesteuert, wobei sie als selektiver Filter wirkt, um den Durchtritt von essentiellen Nahrungsbestandteilen, Elektrolyten und Wasser vom Darmlumen in die Zirkulation zu gewährleisten (Groschwitz, 2009).

Diese selektive Permeabilität findet über zwei Wege statt: *transepithelial/transzellulär* und *parazellulär.* Der transzelluläre Transport benötigt für die effektive Absorption und Sekretion spezifische Transportproteine und Kanäle, die vorwiegend apikal und basolateral lokalisiert sind (Kiela, 2009). Darüber hinaus bedarf es eines Konzentrationsgradienten, der wiederum von einer regelrechten Funktion der parazellulären Zell-Zell-Kontakte abhängig ist. Die Absorption und der Transport von Nahrungsbestandteilen, wie Zucker, Aminosäuren, Fette, Mineralien und Vitamine kann so transzellulär stattfinden (Kunzelmann, 2002).

Die parazelluläre Permeabilität wird über den Transport im Zellzwischenraum gesteuert und über interzelluläre Komplexe an der apikal-lateralen, sowie an der lateralen Zellmembranverbindung reguliert (Bilkslager, 2007; Turner, 2009; Groschwitz, 2009). Zu diesen Membranverbindungen (junktionalen Komplexen) gehören Desmosomen, Adherens Junctions (AJ), sowie die Tight Junctions (TJ). Adherens Junctions werden über Cadherin-Catenin-Komplexe mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Zusammen mit den Desmosomen sorgen sie für das Aneinanderhaften der Zellen und sind Ort der intrazellulären Kommunikation (Groschwitz, 2009; Bondow, 2012).

Die Tight Junctions verbinden die Epithelzellen an der apikalen Seite (Bischoff, 2014). Sie ermöglichen als dynamische Multiproteinkomplexe die Passage von Ionen und gelösten Stoffen und sind hauptsächlich verantwortlich für die Regulation der parazellulären Permeabilität. Gleichzeitig verhindern sie die Translokation von luminalen Mikroorganismen (Groschwitz, 2009). Am Aufbau der Tight Junctions sind mindestens neun verschiedene periphere Membranproteine und mindestens drei integrale Membranproteine beteiligt (Tsukita, 2001). Zu den peripheren Membranproteinen zählen: Occludin, Claudine, junktionale Haftmoleküle, die sog. JAM's und Tricellulin (Groschwitz, 2009; Bilkslager, 2007). Als integrale Membranproteine beteiligen sich Occludin und die sog. Claudine. Die TJ entstehen durch die Interaktion der Membanproteine Claudin und Occludin, die über die Zonula occludens Proteine (ZO-1, ZO-2) und ß-Catenin mit dem Aktin- Zytoskelett verbunden sind. Die Interaktion des TJ-Komplexes mit den Myosinleichtketten (MLC) erlaubt die zytoskeletale Regulation der Barriereintegrität durch Modulierung des Interzellularspalts (Atkinson, 2001; Cunningham, 2012).

Die Expression der junktionalen Proteine im Darm unterliegt einem streng regulierten dynamischen Prozess, an dem die Endozytose, die Migration und die Regenerierung der Zellen beteiligt ist (König, 2016). *In vitro* Analysen zeigten, dass die TJ-Komplexe über die Phosphorylierung durch entsprechende Kinasen reguliert werden können. Dazu zählen unter anderem die Tyrosinkinase c-Yes, die Proteinkinase C (PKC), Phosphatasen und die Proteinphosphatase 2A (Chen, 2002; Nunbhakdi-Craig, 2002). Darüber hinaus sind zahlreiche Zytokine in der Lage den TJ-Komplex zu modulieren. TNF-alpha z.B. induziert die TJ-Permeabilität durch den extrazellulär regulierten Kinase 1/2 Signalweg (Al-Sadi, 2013). Ebenso beeinflusst intrazelluläres cAMP, oxidativer Stress und ein Calcium-Ungleichgewicht die Regulation der Tight Junctions über die Wirkungen auf zelluläre Kinasen (Turner, 1997; Ye, 1999; Zheng, 2007; Rao, 2008).

3.2 Darm und Sepsis

Sepsis gilt als Haupttodesursache in der Intensivmedizin. Der medizinische Fortschritt der letzten Jahrzehnte hat daran nichts geändert. Weltweit werden jährlich geschätzt 31 Millionen Menschen mit einer Sepsis behandelt, von denen knapp sechs Millionen auch an der Sepsis versterben (Fleischmann, 2016). Die Definition der Sepsis, sowie die Charakterisierung und die Einteilung in klinische Stadien hat sich in den letzten 25 Jahren immer wieder geändert (Levy, 2003), zuletzt im März 2016 (Singer, 2016). Es wurde zunächst angenommen, dass septische Krankheitsbilder und das Multiorganversagen die Folge einer unkontrollierten Infektion darstellen. Es zeigte sich aber, dass die Ursachen und die Pathophysiologie der Sepsis weitaus vielfältiger sind. Die neuen Sepsis-Definitionen beschreiben Sepsis als eine „lebensbedrohliche Organdysfunktion, die einer unkontrollierten Antwort auf eine Infektion geschuldet ist“ (Singer, 2016).

Nach den neuesten Definitionen der Sepsis unterteilt man die Sepsis in zwei Stadien: die *schwere Sepsis* (severe sepsis) und der *septische Schock* (septic shock). Eine schwere Sepsis ist eine lebensbedrohliche Organdysfunktion ausgelöst durch eine unkontrollierte Antwort auf eine Infektion. Der septische Schock ist gekennzeichnet durch schwere zirkulatorische, zelluläre und metabolische Störungen assoziiert mit einem höheren Mortalitätsrisiko gegenüber der schweren Sepsis (Singer, 2016). Die

klinischen Manifestationen einer Sepsis resultieren aus einem komplexen Zusammenspiel zwischen dem eigenen Immunsystem und den infizierenden Mikroorganismen. Bakterien, Pilze oder Viren können ein septisches Syndrom hervorrufen (Ramachandran, 2014, Haag, 2015).

Die Konsequenz einer Sepsis oder einer systemischen Inflammation kann die Ausbildung eines Multi-Organ-Dysfunktions-Syndroms (MODS), sowie eines akuten progressiven Lungenversagens (ARDS) sein (Deitch, 1992; Angus, 2001; Deitch, 2006). Die klinischen Manifestationen eines MODS können variieren. Zu den Organen, die in die Manifestation eines MODS involviert sind, gehört neben der Lunge, den Nieren und der Leber, auch der Darm (Fink, 2003). Diese sog. „Schockorgane“ werden alle von Epithelzellen ausgekleidet. Im Darm und auch in der Lunge ist die epitheliale Barriere allerdings nicht nur essentiell, um flüssigkeits- oder luftgefüllte Kompartimente vom Interstitium oder vom Blut zu trennen, sondern auch unabdingbar, um eine systemische Kontamination mit Bakterien und Toxinen aus der äußeren Umgebung zu verhindern (Fink, 2003). Eine Störung der epithelialen Barriere ist daher von hoher klinischer Relevanz.

Eine gestörte Vasomotorik und eine erhöhte endotheliale Gefäßpermeabilität in der Sepsis und im septischen Schock führen zu einer regionalen Minderperfusion. Diese Störung der Mikrozirkulation bewirkt in der Folge eine Hypoxie im Gewebe und führt konsekutiv zu einer Schädigung der Organe bis hin zum Multiorganversagen (MODS) (Fink, 2003; Fink, 2005; Hotchkiss, 2003; Jorgensen, 2006). Das Darmepithel im Bereich der „letzten Wiese“ ist im Rahmen einer peripheren Mikrozirkulationsstörung daher besonders gefährdet.
Ein Multiorganversagen und der Verlust der intestinalen Barrierefunktion sind mit großen Herausforderungen bezüglich der Behandlung kritisch kranker Patienten auf Intensivstationen verbunden (Schulz, 2015).

Ein Versagen der Barrierefunktion des Darms kann weitere ernste Konsequenzen für den kritisch kranken Patienten nach sich ziehen. Hauptsächliche ätiologische Faktoren, die zu einem Verlust der intestinalen Barriere im Rahmen einer Sepsis führen, sind eine verminderte Splanchnikusperfusion, eine Motilitätsabnahme des Darms, sowie eine Hypoxie im Gewebe (Derikx, 2008). Eine mit systemischer

Inflammation und Sepsis assoziierte Hypotension resultiert in einem verminderten Blutfluss der kleinen viszeralen Gefäße zugunsten der zentralen Zirkulation. Die Abnahme der Perfusion und die Hypoxie verstärken die schädigenden Effekte auf die intestinale Gewebeintegrität (Harois, 2013, Pastores, 1996): Die Mukosa des Darms reagiert empfindlich auf eine Ischämie und nach einer wieder eintretenden Reperfusion kann diese zu einem Versagen der gastrointestinalen Barrierefunktion führen (Ischämie-Reperfusionsschaden) (Rosero, 2014).

Die intestinale epitheliale Barrierefunktion kann im Rahmen chirurgischer Erkrankungen (Trauma, Schock, schwere Verbrennungen) und im Verlauf kritischer Krankheitszustände, beeinträchtigt werden (Pape, 1994). Diese Störung der epithelialen Barrierefunktion resultiert in einem Anstieg der intestinalen Permeabilität und führt subsequent zur Translokation von Bakterien und/oder Endotoxinen aus dem Gastrointestinaltrakt in die systemische Zirkulation (Deitch, 2002; Magnotti, 2005) *(Abb.1).*

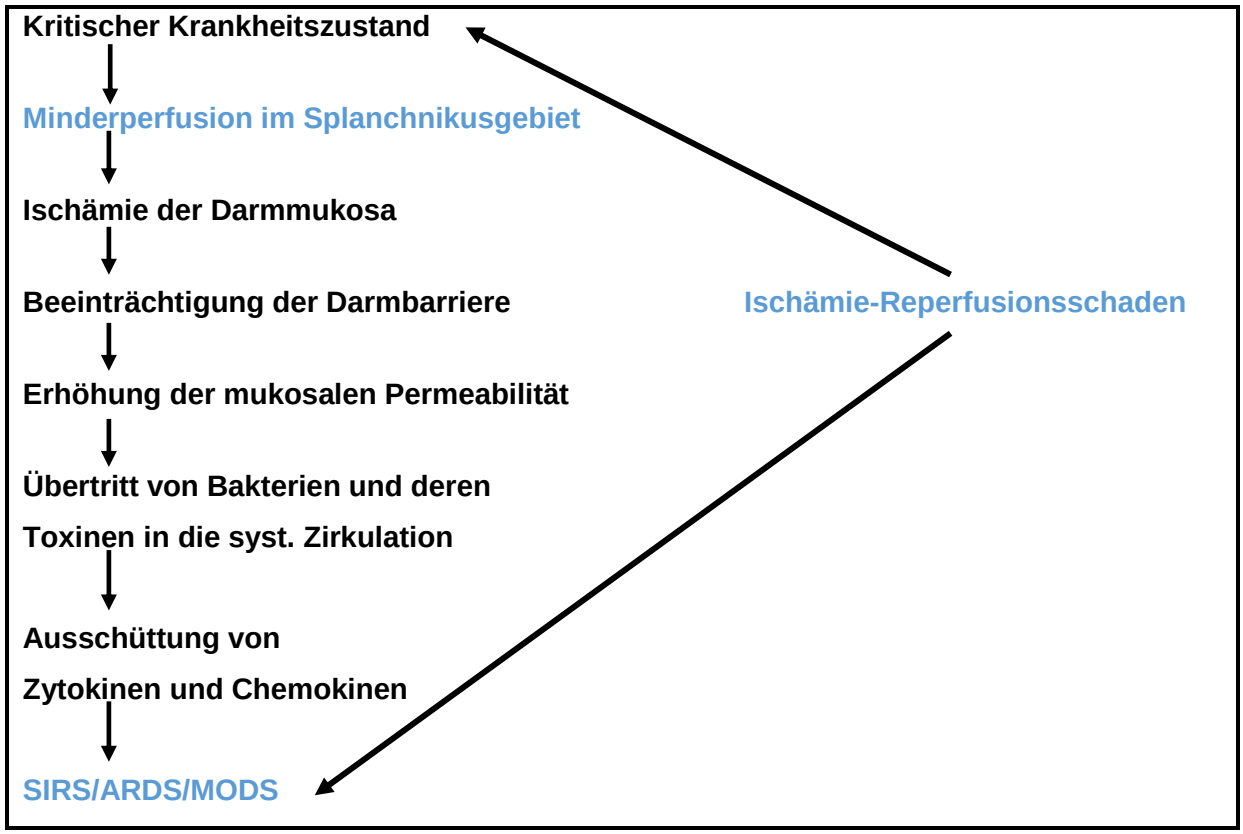

Abb. 1: *Schematisch dargestellte Abfolge der Auswirkungen einer Minderperfusion im Splanchnikusgebiet.*

Seit den 80er Jahren wird der Darm in der Literatur als „Motor“ des Multiorganversagens (multi-organ-dysfunction-syndrom, MODS) beschrieben (Carrico, 1986; Meakins, 1986; Clark, 2007; Mittal, 2014; Marcel, 2015). Es wurde zunächst angenommen, dass es durch eine Hyperpermeabilität im Darm zu einem Übertritt von Bakterien in die systemische Zirkulation kommt (Carrico, 1986; Klingensmith, 2016). Der Übertritt von luminalen Erregern in die Zirkulation und normalerweise steriles Gewebe wird als „bakterielle Translokation“ (BT) beschrieben und wurde erstmals als Begriff von Berg und Garlington definiert (Berg und Garlington, 1979). Bereits Ende des 19. und Mitte des 20. Jahrhunderts gab es die Hypothese, dass Bakterien unter bestimmten Bedingungen die Darmbarriere passieren können (Frainkel, 1891; Flexner, 1859; Schweinburg, 1949). Der Begriff der bakteriellen Translokation wird heute verwendet, um die Passage von lebensfähigen, darmansässigen Bakterien vom Gastrointestinaltrakt durch die Darmmukosa in normalerweise steriles Gewebe, wie die mesenterialen Lymphknoten und die inneren Organe zu beschreiben. Gleiches gilt auch für die Passage von antigenen Makromolekülen, Lipopolysacchariden (LPS), Endotoxinen und Peptidoglykanen durch die intestinale Mukosabarriere (Gatt, 2005).

Gramnegative (*Escherichia coli, Klebsiella, Enterobakter* u.a) und grampositive Bakterien (*Staphylococcus, Enterococcus, Streptococcus* u.a) spielen eine Rolle bezüglich der Auslösung einer Bakteriämie oder einer Sepsis (Phua, 2013). Die Beeinträchtigung der Funktion der Darmbarriere ermöglicht eine bakterielle Translokation, die wiederum zu einer systemischen Entzündung führen kann und im weiteren Verlauf zu einer Sepsis und zum septischen Schock oder im schlimmsten Fall zum Multiorganversagen (MODS).

Die in den letzten Jahren publizierten Daten zeigen, dass der Zusammenhang zwischen Darm und Sepsis weitaus komplexer ist als angenommen: Deitch et al. beschreiben die Pathogenese der Infektion des Darms als „*Three-hit-modell*“ (Deitch, 2010; Senthil, 2006): Durch schwere Krankheitszustände wie beispielsweise Verbrennungen, Traumata, Sepsis oder auch durch starken Blutverlust kommt es zu einer Minderperfusion im Splanchnikusgebiet (first hit). Die Wiederherstellung der intestinalen Perfusion (second hit) führt zu einer Schädigung im Darm mit Entzündung und Verlust der Barrierefunktion durch Ischämie-Reperfusions getriggerte

Mechanismen. Der Verlust der Barrierefunktion (third hit) erlaubt den Übertritt von intestinalen Bakterien und Endotoxinen entlang der mukosalen Barriere, wo sie in Kontakt zu intestinalen Immunzellen treten können. In der Folge führt das zur generalisierten Entzündungsreaktion im Körper, womit ein fataler Kreislauf in Gang gesetzt wird.

Weitere Untersuchungen unterstützen die „*gut-lymph-hypothesis*“: Toxische Produkte aus dem Darm gelangen über die mesenteriale Lymphe weiter mit dem Ductus thoracicus über das rechte Herz in die Lunge. De Jong et al. sprechen auch von der „*gut-lymph-lung-axis*“ (de Jong, 2016). Direkte toxische Effekte auf das pulmonale Endothel verursachen ein akutes Lungenversagen, das im weiteren Verlauf in einem ARDS gipfeln kann (Deitch, 2010) *(Abb. 2).*

Badami et al. zeigten durch die Ligatur des Ductus lymphaticus im Tierversuch mit Ratten nach Auslösung eines septischen Schocks eine deutliche Verbesserung der Überlebensrate. Eine systemische Aussaat von Pathogenen aus dem Darm konnte so verhindert werden (Badami, 2008). Ähnliche tierexperimentelle Untersuchungen ergaben, dass gesunde Ratten nach Injektion von mesenterialer Lymphe von erkrankten Ratten (Trauma, Hämorrhagischer Schock) ebenso ein ARDS entwickelten wie die Schockratten (Senthil, 2007). Die aus dem Darm stammende Lymphe, welche normalerweise aus Proteinen oder Lipidfaktoren besteht, stimuliert über den Toll-like-Receptor 4 die Aktivierung von inflammatorischen neutrophilen Granulozyten in der Lunge (Klingensmith, 2016).

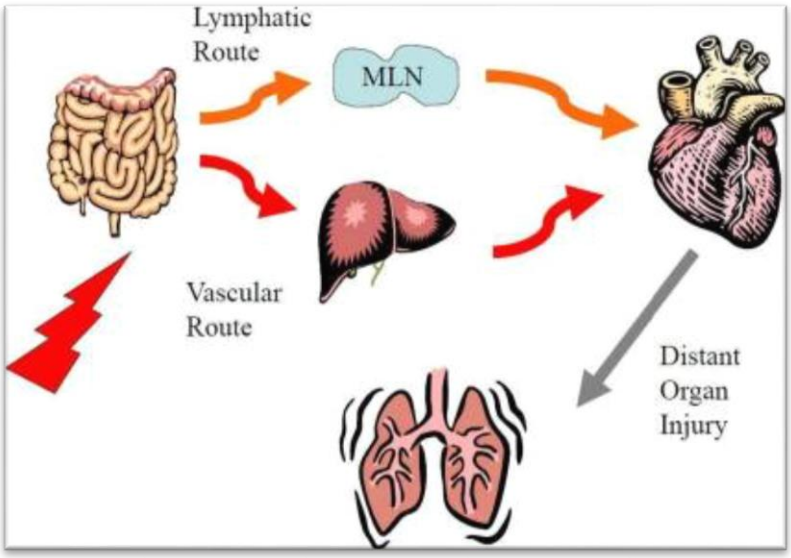

Abb. 2: *Schematische Darstellung der Modelle, die bezüglich der Hypothese „gut origin of sepsis“ in Betracht gezogen werden. Darstellung nach Deitch. Gut-origin sepsis: Evolution of a concept (Deitch, 2012).*

Obwohl eine Störung der intestinalen Barrierefunktion einen hohen Risikofaktor für die Translokation von toxischen Substanzen und Pathogenen darstellt, sind die therapeutischen Möglichkeiten, die Darmbarriere in der Sepsis und im septischen Schock zu stabilisieren, begrenzt: Zu den derzeitigen therapeutischen Möglichkeiten zählen vor allem die frühzeitige Volumensubstitution (Rivers, 2001), um die Perfusion im Splanschnikusgebiet zu verbessern, sowie der Versuch einer frühen enteralen Ernährung, die sich durch den Rückgang infektiöser Komplikationen als protektiv erwies (Elke, 2016).

Einen positiven Effekt auf die intestinale Barriere im Rahmen kritischer Krankheitszustände scheint auch das direkte oder indirekte Eingreifen an den Tight Junctions des Epithels zu haben: Die Phosphorylierung der Myosinleichtketten durch die aktivierte Myosinleichtkettenkinase führt zur Kontraktion des Intrazellularspaltes und somit zu einer erhöhten Permeabilität. Chen et al. zeigten im tierexperimentellen Modell an Mäusen nach erhöhter Alkoholaufnahme und Verbrennungstrauma eine Verminderung der bakteriellen Translokation aus dem Darm durch Inhibition der Myosinleichtkettenkinase im Gegensatz zu scheinexponierten Tieren. Ebenso konnten Veränderungen in der Tight Junctions-Expression und-Lokalisation verhindert werden (Chen, 2012; Zhas, 2012). Der Einsatz von epidermal growth factor (EGF) als zytoprotektives Peptid bewirkte im „cecal-legation and puncture“ oder *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia-Tiermodell eine Verminderung der Permeabilität und der Zellapoptose, sowie eine Verbesserung der Zellproliferation. Dadurch konnte die Überlebensprognose der Tiere deutlich verbessert werden (Clark, 2008; Dominguez, 2011). Erfolgsversprechende Therapien die Barriere des Darms im Rahmen kritischer Krankheitszustände direkt zu stabilisieren fehlen bisher.

3.2.1 *Staphylococcus aureus* Alphatoxin und Wasserstoffperoxid

Staphylococcus aureus ist ein multifaktorieller Erreger sowohl des Menschen als auch des Vertebraten. Durch ihn ausgelöste Krankheiten manifestieren sich in der Haut (eitrige Wundinfektionen, oberflächliche Akne), pulmonal (nosokomial erworbene Pneumonie), in den Schleimhäuten und im Gefäßsystem (Lowy, 1998; Berube, 2013).

Die Inzidenz der durch *S. aureus* ausgelösten Infektionen und Bakteriämien hat in den letzten Jahrzehnten deutlich zugenommen. Darüber hinaus hat der großzügige Einsatz von Antibiotika in den letzten Jahren zu vermehrten Resistenzen geführt

(Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*, MRSA) (Steinberg, 1996; Gastmeier, 2002).

Als hauptsächlicher Erreger ist *S. aureus* neben der infektiösen Endokarditis verantwortlich für die schwere Sepsis. Als wichtigster Staphylococcen-Virulenzfaktor wird *S.aureus* sehr häufig im Blut septischer Patienten gefunden (Lowy, 1998; Spaulding, 2012; Bergin, 2015;) und schädigt die endotheliale Barrierefunktion (Grimminger, 1997; Krüll, 1996; Laupland, 2004; Brell, 2005 (b)); Hocke, 2006). Über die möglichen Effekte auf die epitheliale Barrierefunktion war zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch wenig bekannt. Kwak et al. zeigten allerdings kürzlich, dass α-Toxin die epitheliale Barriereintegrität möglicherweise durch eine verminderte Expression einzelner Tight Junction Proteine schädigt (Kwak, 2012).

α-Toxin ist der bekannteste Virulenzfaktor von *S. aureus.* Es wurde 1928 von Burnet in Australien im Rahmen von Diphterie-Impfungen durch kontaminiertes Diphterie-Toxin-Antitoxin entdeckt (Burnet, 1929).

Das agressive α-Toxin stellt einen dominanten Virulenzfaktor des Pathogens dar (Bhakdi, 1991). Nach Insertion des wasserlöslichen Toxinmonomers in die Zellmembran erfolgt eine Porenbildung. Die Membraninsertion des α-Toxins ist abhängig von Toxinbindungsstellen, wobei die Empfänglichkeit einer Zielzelle durch das Vorhandensein spezifischer Bindungsstellen determiniert ist (Hildebrand, 1991; Valeva, 1997). Als ein solcher Rezeptor für α-Toxin konnte kürzlich A Desintegin und Metalloprotease 10 (ADAM10) identifiziert werden (Wilke, 2010).

Die von α-Toxin gebildete Pore hat nur einen Durchmesser von 1-2nm und lässt nur kleine Moleküle wie Natrium, Calcium, Kalium und Nukleotide wie z.B. ATP und ADP passieren (Bhakdi, 1991; Grimminger, 1997). In Abhängigkeit vom betroffenen Zelltyp können die Reaktionen vielfältig und komplex sein. Im Wesentlichen lassen sich die Reaktionen aus der intrazellulären Signalwirkung des einströmenden Calciums und den Folgen einer ATP-Depletion herleiten (Grimminger, 1997; Rose, 2002).

Beim Menschen sind insbesondere inflammatorische Zellen wie Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Thrombozyten, Endothelzellen und Epithelzellen empfänglich gegenüber α-Toxin (Suttorp, 1985; Suttorp, 1987; Bhakdi, 1988). Durch die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren und radikalbindenden

Enzymen wird die gewebsschädigende Wirkung von α-Toxin weiter verstärkt (Suttorp, 1987; Bauldry, 1992).

Die schädigende Wirkung von α-Toxin wurde bereits in isolierten Tiermodellen der Kaninchenlunge, des Rattenherzens und des Rattenileums untersucht. Es wurden sowohl Störungen der endothelialen Barrierefunktion als auch der Mikrozirkulation beobachtet (Seeger, 1984; Seeger, 1990; Walmrath, 1993; Sibelius, 2000; Brell, 2005 (b)). Im geschlossenen Endothelzellmonolayer konnte ein durch α-Toxin verursachter Anstieg der Permeabilität nachgewiesen werden. Morphologisch zeigte sich das als kontraktile Dysfunktion mit Öffnung der Interzellularspalten (Suttorp, 1998; Brell, 2005 (b)). Die von Brell et al. durchgeführten Untersuchungen am isolierten Rattenileum demonstrierten, dass zur Auslösung einer endothelialen Barrierestörung weitaus weniger α-Toxin nötig war als im Rattenherzmodell von Sibelius et al. (Siblius, 2000; Brell, 2005(b)). Es konnte demnach von einer hohen Empfänglichkeit des Darms gegenüber α-Toxin ausgegangen werden, sowie von einer Störung der Funktion des Darms in der Sepsis durch α-Toxin.

Aufgrund seiner barriereschädigenden Wirkungsweise in der Sepsis wurde α-Toxin daher als prototypischer und klinisch relevanter Virulenzfaktor zur Permeabilitätsmessung eingesetzt.

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wurde in den Untersuchungen sowohl *in vivo,* als auch *in vitro* zur Simulation der Anwesenheit aktivierter polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) verwandt. PMN sind sowohl für die Phagozytose, als auch für die Zerstörung von mikrobiellen Erregern zuständig. Im Rahmen einer Sepsis beispielsweise sezernieren sie zur Erregerbekämpfung Peroxidasen (H_2O_2) und Esterasen, die zytotoxisch wirken und damit das Wirtsgewebe schädigen. Durch oxidativen Stress kommt es zu einem Anstieg der Permeabilität des intestinalen Epithels (Rao, 1997; Jepson, 2003)

Im septischen Schock kommt es häufig zu einem sog. Ischämie-Reperfusionsschaden im Gewebe (Nakata, 2014). Dazu kommt es, wenn das Gewebe nach einer längeren Ischämieperiode wieder durchblutet wird. Durch den Sauerstoffmangel in der Ischämie kommt es in der Reperfusionsphase zur Entzündung und oxidativen Schädigung im betroffenen Gewebe. Im Darm führt das zu Schädigungen der epithelialen Barriere (Baker, 1995; Banan, 2002). Im Speziellen wird durch oxidativen Stress auf die Zelle

die Funktion der Mitochondrien beeinträchtigt und es kommt zu einer Depletion von intrazellulärem ATP (Watson, 1994).

3.3 Adrenomedullin (AM)

Auf der Suche nach neuen Therapieansätzen und der Suche nach biologischer Aktivität von Peptiden wurde im Jahr 1993 das Peptidhormon Adrenomedullin (AM) entdeckt. Der Arbeitsgruppe um Kitamura et al. (Kitamura, 1993) gelang es, Adrenomedullin aus Phäochromozytomzellen zu extrahieren. Es wird gemäß seiner Herkunft aus der Nebenniere („adrenal medulla“) Adrenomedullin genannt (Kitamura, 1993).

Das kodierende Gen des Vorläufermoleküls von AM konnte noch im selben Jahr isoliert und sequenziert werden, ebenso konnte die messenger-Ribonukleinsäure (mRNS) für humanes Adrenomedullin in verschiedenen Geweben (Herzventrikel, Lunge, Niere) nachgewiesen werden (Kitamura und Sakata, 1993).

Seit seiner Entdeckung im Jahr 1993 sind weit über 2000 Veröffentlichungen über Adrenomedullin erschienen. Es konnte gezeigt werden, dass AM in einer Vielzahl von Geweben biologisch aktiv ist und über Rezeptoren eine Vasodilatation im gesamten Organismus bewirken kann (Westphal, 2006). Es kommt zu einem Anstieg von AM im Plasma bei arterieller Hypertension, im Verlauf eines akuten Koronarsyndroms, beim Herzversagen, bei Erkrankungen der Nieren (Sogbe-Diàz, 2016), bei Pneumonien (Cheung, 2004), sowie in der Sepsis und im septischen Schock (Hirata, 1996; Ueda, 1999; Beltowsky, 2004; Struck, 2004).

Das körpereigene und ubiquitär vorkommende Polypeptid AM besteht aus 52 Aminosäuren. Es zeigt Ähnlichkeiten zum „calcitonin gene-related peptide“ (CGRP) und wird der Kalzitonin/CGRP/Amylin-Peptid-Familie zugeordnet (Kitamura 1993, Poyner, 2002). Dazu gehören auch Amylin, pro-AM N-terminal 20 Peptid (PAMP) und Intermedin (AM-2) (Bell, 2008).

Das AM-Molekül beinhaltet 6 Aminosäureringe, wobei die Aminosäuren 16 und 21 durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Am Carboxylende befindet sich aminiertes Tyrosin. Beides ist essentiell für die biologische Aktivität von AM (Ishimitsu, 1994).

AM wird aus seinem Vorläufermolekül, dem Proadrenomedullin (bestehend aus 164 Aminosäuren) enzymatisch abgespalten, welches wiederum aus dem größeren Vorläufermolekül Preproadrenomedullin (185 Aminosäuren) durch posttranslationales

„splicing“ entsteht (Hinson, 2000). Neben AM besitzt das aus 20 Aminosäuren bestehende „proadrenomedullin N-terminal 20 peptide“ (PAMP) ebenfalls biologische Aktivität (Hinson, 2000).

Durch AM werden zwei verschiedene Rezeptoren aktiviert: CGRP-Rezeptoren mit dem Antagonisten CGRP, und spezifische AM-Rezeptoren, die nicht durch CGRP stimulierbar sind (Hinson, 2000). Die AM-Rezeptoren sind über G-Proteine an die Adenylylzyklase (AC) gekoppelt, die den sekundären Botenstoff cAMP produziert. Sie besitzen zwei Untereinheiten: „calcitonin receptor-like receptor“ (CRLR, Poyner, 2002) und das „receptor-activity-modifying-protein“ (RAMP-2 oder RAMP-3, McLatchie, 1998).
Hinsichtlich der Rezeptorbindungsstellen für AM wurde in Ratten die höchste Konzentration im Herz und in der Lunge gefunden (Juaneda, 2003), beim Menschen im vaskulären Endothel, in der Lunge, sowie in gastrointestinalen Immunzellen (Hagner, 2002). Sowohl in Ratten, als auch beim Menschen zirkuliert AM in geringer Konzentration und wird in fast allen Geweben exprimiert, was wiederum die vielfältigen biologischen Wirkungen von AM erklärt. Die höchsten Gewebekonzentrationen wurden in der Nebenniere, im Hypothalamus und im Hypophysenvorderlappen gefunden (Washimine, 1995; Satoh, 1996). Hohe Expressionsraten von AM findet man auch in der Niere, Lunge, Gastrointestinaltrakt, Pankreas, Uterus, im Gefäßsystem, sowie am Herz (Washimine, 1995; Ichiki, 1994).
Im vaskulären Gewebe wird AM sowohl von den Endothelzellen, als auch von den glatten Gefäßmuskelzellen synthetisiert und sezerniert, wobei die Sekretionsrate in vaskulären Endothelzellen mit der von Endothelin-1 gleichzusetzen ist (Sugo, 1994).
Es kommt zu einer vermehrten AM-Produktion im oxidativen Stress (Ando, 1998). Faktoren, die die AM-Sekretion *in vitro* stimulieren, sind unter anderem: IL-1, IL-1ß, LPS, TNF-α, TNF-ß und Endotoxin (Sugo, 1995; Yang, 2001). Hofbauer et al. zeigten ebenfalls, dass inflammatorische Mediatoren die AM-Produktion stimulieren können (Hofbauer, 2002).
Hemmend auf die AM-Sekretion wirken unter anderem Forskolin, TGF-ß, VIP, 8-bromo-cAMP und IFN-µ (Sugo, 1995; Isumi, 1998).

Da AM vor allem vasodilatatorische Eigenschaften besitzt, sah man dessen hauptsächliche Funktion zunächst in der Blutdruckregulation (Nagoya, 1996; Kohno,

1996). In der Lunge beschrieben Hinson et al. die AM-Wirkungen in einer pulmonalen Vasodilatation, sowie in einer antiinflammatorischen Wirkung (Hinson, 2000). Neben der Lunge, hat AM auch antimikrobielle Effekte in der Haut, sowie im Gastrointestinaltrakt (Allaker, 1999). Weitere ausgewählte biologische Effekte von AM sind in der folgenden Tabelle aufgeführt (Tab.1).

Tabelle 1: Ausgewählte biologische Aktivität von Adrenomedullin

Organ	***Aktivität***
Gefäße	Vasodilatation, antikoagulative Eigenschaften im Blutstrom
Herz	Positiv-chronotrop und -inotrop
Lunge	Vasodilatation, Verminderung der Bronchokonstriktion, antiinflammatorische Wirkung
ZNS	Hemmung der Wasser- und Salzaufnahme
Hypothalamus	Inhibition der Vasopressinsekretion (White, 2009)
Hypophyse	Inhibition der ACTH-Freisetzung (Samson, 1995)
Nebennierenrinde	Verminderung der Aldosteronsekretion
Niere	Erhöhung des renalen Blutflusses, Diurese, Natriurese
Gastrointestinaltrakt	Protektion der Mukosa, antimikrobieller Effekt
Haut	Antimikrobieller Effekt

Quelle: *Westphal et al. (Westphal, 2006).*

3.3.1 AM in der Sepsis

Drei Jahre nach seiner Entdeckung wurde bei septischen Patienten ein Anstieg der AM-Konzentration im Plasma festgestellt und es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass AM als regulatorisches Peptid eine zentrale Rolle in der Sepsis und im septischen Schock spielt (Hirata, 1996; Wang, 1998; Wang, 2001). In der Sepsis und im septischen Schock kommt es zu einem deutlichen Anstieg von AM im Plasma (Hirata, 1996; Nishio, 1997; Wang, 1998; Wang, 1998; Ueda, 1999; Matheson, 2003). Shoji et al. fanden unter anderem heraus, dass bakterielle Endotoxine und proinflammatorische Zytokine die Genexpression von AM in vielen Geweben *in vitro* und *in vivo* steigern können (Shoji, 1995).

Es wurde zunächst angenommen, dass AM ursächlich an der Progredienz eines septischen Schocks beteiligt sei, vor allem durch die Induzierung einer extremen Vasodilation und Hypotension. Tierexperimentelle Untersuchungen an transgenen Mäusen mit vermehrter AM-Produktion zeigten jedoch, dass diese trotz einer bestehenden Hypotonie hochresistent gegenüber einem Endotoxinschock waren (Shindo, 2000).

AM scheint wichtig für die Stabilisierung der endothelialen Barriere in der Sepsis zu sein: Caron et al. beobachteten an AM Knock-out Mäusen einen extremen Hydrops fetalis und kardiovaskuläre Veränderungen (Caron, 2001). Vergleichbar sind auch die Untersuchungen von Shindo et al..AM Knock-out Mäuse starben *in uteri* wobei sie Abnormalitäten in der Gefäßentwicklung zeigten (Shindo, 2013). Gleiches konnte die Forschergruppe um Shindo et al. auch an AM-Rezeptor Knock-out Mäusen (RAMP-2) zeigen: Vaskuläre Phänotypen konnten mit RAMP-2 Knock-out Mäusen reproduziert werden und es zeigte sich ebenfalls eine Zunahme der endothelialen Permeabilität. Die Gabe von AM konnte die endotheliale Barriere stabilisieren (Shindo, 2013).
Untersuchungen an Ratten, bei denen ebenfalls mit *S.aureus α-Toxin* eine Sepsis induziert wurde, die bei den Tieren eine Hyperpermeabilität und ein Herzkreislaufversagen auslöste, zeigten nach der Gabe von AM eine deutliche Abnahme der Mortalität durch Reduzierung der vaskulären Hyperpermeabilität (Temmesfeld-Wollbrück, 2007).

AM bekommt in den letzten Jahren immer mehr Aufmerksamkeit bezüglich neuerer Interventionsmaßnahmen in der Sepsis, im MODS und im ARDS (Christ-Crain, 2005; Gonzalez-Rey, 2006; Guignant, 2009; Müller-Redetzky, 2014; Pugin, 2014): Müller-Redetzky et al. konnten kürzlich in Versuchen mit Mäusen (Pneumokokkus Pneumonie) zeigen, dass AM sowohl vor der Ausbildung einer beatmungs-assoziierten Lungenschädigung schützen konnte, als auch protektive Effekte gegenüber einem peripheren Organversagen (Leber und Darm) nach beatmungsassoziierter Lungenschädigung hatte (Müller-Redetzky, 2014). In zahlreichen Studien bezüglich einer barrierestabilisierenden Wirkung von AM konnte bereits gezeigt werden, dass AM die endotheliale Barriere stabilisieren kann (Hippenstiel, 2002; Hocke, 2006; Temmesfeld-Wollbrück, 2007; Müller, 2010).

3.3.2 AM-Wirkung am Darm

AM wird im gesamten Gastrointestinaltrakt exprimiert, insbesondere in den neuroendokrinen Zellen der Mukosa und in der Submukosa des Duodenums, Ileums und des Kolons (Hinson, 2000). Es konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass AM als autokriner und parakriner Wachstumsfaktor im Darmepithel agiert und die Darmmukosa schützen kann (Pio, 2000; Shichiri, 2003; Martinez-Herrero, 2016). Ebenso scheint sich AM günstig auf die Heilung entzündlicher und infektiöser Darmerkrankungen auszuwirken, indem es die Sekretion proinflammatorischer Zytokine hemmt (Beltowsky, 2004) und die epitheliale Barrierefunktion stabilisiert (Ashizuka, 2009).

Die Plasmakonzentration von AM ist in infiziertem Gewebe des Intestinums erhöht (Zhou, 2001). Dass AM eine wichtige Rolle in der mukosalen Abwehr im Falle einer intestinalen Infektion spielen könnte, indiziert eine gesteigerte AM-Synthese in intestinalen Epithelzellen der Ratte nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (Kishikawa, 2009). Als antimikrobielles Peptid trägt AM zudem auch zur Immunabwehr im Darm bei, indem es die mikrobielle Flora reguliert (Allaker, 2003).

Die Anwesenheit von AM mRNA in glatten Muskelzellen des Darms (Sakata, 1998) spricht dafür, dass AM möglicherweise auch in der Lage ist, die Kontraktilität der Gefäßmuskelzellen zu regulieren. Untersuchungen von Kravtsov et al. deuten darauf hin, dass AM über die Aktivierung der Proteinkinase A und über einen cAMP-Anstieg eine Relaxation im durch Serotonin, Acetylcholin und Histamin kontrahierten Rattenileum bewirken kann (Kravtsov, 2004)

Die Darmgefäße sind hochempfindlich gegenüber AM (Santiago, 1995; Okamura, 1997; Brell, 2005 (a/b)) und in der Mukosa des Gastrointestinaltrakts kommt es auch in der Sepsis zu einer starken AM-Produktion. (Sakata, 1998; Zhou, 2001). Zhou et al. konnten zeigen, dass AM die endotheliale Barrierefunktion des Darms *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* stabilisieren kann. Untersuchungen am isoliert perfundierten Rattendünndarm von Brell et al. ergaben, dass die vasorelaxierende Wirkung von AM nicht nur zu einer Widerstandssenkung im Darm führte, sondern auch die Verteilung des Blutflusses innerhalb der Darmwand zugunsten der inneren Wandschichten beeinflussen konnte (Brell, 2005 (b)). Eine mukosale Hypoxie, charakteristisch für

Mikrozirkulationsstörungen in der Sepsis, konnte dadurch verhindert werden. Es stellte sich daher die Frage, ob AM auch die Funktion der epithelialen Barriere positiv beeinflussen kann.

4 Zielsetzung und Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Wirkung von Adrenomedullin (AM) auf das intestinale Epithel *in vivo* und *in vitro.* Interessanterweise kommt es während einer Sepsis zu einer verstärkten AM-Produktion vor allem in der Mukosa des Gastrointestinaltrakts (Sakata, 1998, Zhou, 2001). Eine gestörte mukosale Barrierefunktion des Darms kann die Translokation von Bakterien und deren Virulenzfaktoren erlauben, und im Verlauf, das Aufrechterhalten einer Inflammation und Sepsis. *Staphylococcus aureus* ist als hauptsächlicher Erreger verantwortlich für die schwere Sepsis (Spaulding, 2012). Die Exposition mit *α-Toxin* als dominanter Virulenzfaktor des Pathogens induziert bei den Ratten die Ausbildung eines septischen Schocks, der unter anderem zu einer Störung der Darmfunktion einschließlich gesteigerter intestinaler Permeabilität führt.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit sollen die Hypothese prüfen, ob AM die epitheliale Barrierefunktion des Darms gegenüber dem Einfluss von Toxinen positiv beeinflussen kann.

Zur Bearbeitung dieser Fragestellung sollte zur Untersuchung der Wirkung von AM *in vitro* die Zellkultur von menschlichen Kolonepithelzellen (CaCo-2) etabliert werden. Die Untersuchung der intestinalen Permeabilität *in vivo* wurde am Ganztier mittels des Ligated-Loop-Modells durchgeführt.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Kann AM die epitheliale Barriere des Darms *in vivo* nach Gabe von *Staphylococcus aureus α-Toxin* stabilisieren?
2. Kann AM direkt die Barrierefunktion der Epithelzellen nach Gabe von *Staphylococcus aureus* α-Toxin und H_2O_2 stabilisieren?
3. Sind die zu beobachtenden Veränderungen dosis- und zeitabhängig?
4. Welche Mechanismen spielen bei der Vermittlung des Effekts von AM auf die epitheliale Permeabilität eine Rolle?
5. Kommt es durch eine Inhibition der entsprechenden Kinasen, die in der Vermittlung des Signalwegs für AM eine Rolle spielen könnten, zu einer AM-ähnlichen Regulation der epithelialen Barrierefunktion?

5 Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Materialien und Messgeräte für den Tierversuch

Arterielle Kanülierung: Metallkanüle (Innendurchmesser: 0,9 mm) als Sonderanfertigung	Hugo-Sachs-Elektronik, March-Hugstetten
Venöse Kanülierung: Metallkanüle (Innendurchmesser: 1,2 mm) als Sonderanfertigung	Hugo-Sachs-Elektronik, March-Hugstetten
Radiofokus Führungsdraht (Durchmesser: 0,89 mm)	Terumo Corporation, Tokyo, Japan
Mikroschlauch Teflon PTFE (Innendurchmesser: 0,56 mm)	Novidirect, Kehl
Organbad (Krebs-Henseleit Puffer)	Serag Wiesner AG, Naila
Doppelwandige Perfusatgefässe	Vogel, Lich
Organschale mit doppelten Boden	Vogel, Lich
Venenverweilkanüle (Insyte 24G)	Becton, Dickinson, Madrid, Spanien
Laborschläuche (Tygon)	Kalensee, Giessen
Steckverbindungen	Dahlhausen, Köln
Silikonschläuche	Kalensee, Giessen
Rollerpumpe (Ismatec, ISO 9001)	Ismatec SA, Glattburg, Zürich, Schweiz
Wärmeaustauschpumpe (Julabo F30C)	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Oxygenator: Polystan Safe Micro HF für Neugeborene	Polystab A/S, Vaerlose, Dänemark
Nahtmaterial: Ethibond Excel/EH6371H	Ethicon GmbH, Norderstedt
Gefässligaturen: Prolene/EH74477H	Ethicon GmbH, Norderstedt
Beatmungspumpe: Inspira Advanced Safety Ventilator	Harvard Apparatus, Inc. Holliston, USA
Elektrokauter: Battery operated small vessel cauterizer	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Perfusor-Spritze: OPS 50 ml	Braun Melsungen AG, Melsungen

Wärmeunterlage: Thermolux Wärmeunterlage	Witte und Sutor GmbH, Murrhardt
Weithalsflaschen	Schott Glas, Mainz
Leukozytenfilter: BioiR 01 max BS	Fresenius Hemo Care GmbH, Bad Homburg
Fluoreszenzspektrophotometer Fluoromax 2 Spektrofluorometer	HORIBA Jobin Yvon GmbH, München
Computer-controlled voltage clamp device	Mussler Scientific Instruments, Aachen
ELISA	Roche, Mannheim

5.1.2 Chemikalien und Pharmaka für den Tierversuch

Fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran, FD4)	Sigma Chemical Co. St Louis MI, USA
Phosphat Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratoires GmbH, Pasching, Österreich
NaCl 0,9%	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
α-Haemolysin von *Staphylococcus aureus* (α-Toxin)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Humanes Adrenomedullin (AM)	Bachem Bioscience Inc. Philadelphia, USA
Ketamin (Ketavet)	Pharmacia & Upjohn, Erlangen
Xylazin (Rompun, 20 mg/ml)	Bayer AG, Leverkusen
Lidocainhydrochlorid (Xylocain 2%)	Astra GmbH, Wedel
Tyrode Buffer Solution	Sigma Aldrich, Deisenhofen

5.1.3 Materialien und Messgeräte für die Zellkultur

Polycarbonatbeschichtete Transwells 12 mm (Porengrösse 0,3 nm)	Costar, Cambridge, USA
Infrarot Fluoreszenz Laser Scanner (Odyssey infrared imaging system)	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
Epithelialer Voltometer	World Precision Instrument, Sarasota, Florida

ELISA	Biotrend, Köln

5.1.4 Chemikalien und Pharmaka für die Zellkultur

Medium

Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit L-Glutamin

- Fetales Bovines Serum (FCS, 10% v/v), komplementinaktiviert
- Penicillin G (100 U/ml)
- Streptomycin (100 µg/ml)
- Natriumpyruvat (2mM, 1%)
- Nichtessentielle Aminosäuren (1%)

Firma: PAA Laboratoires (Pasching, Österreich)

Fluorescein isothiocyanate (FITC-dextran, FD4)	Sigma Chemical Co. St Louis MI, USA
Humanes Serumalbumin (68 kD) angereichert mit Evans Blue Dye (EBD)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Humanes Adrenomedullin (AM)	Bachem Bioscience Inc. Philadelphia, USA
Forskolin (Stimulator des Enzyms Adenylylcyclase)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Zardaverin (PDE-Inhibitor)	ALTANA Pharma AG, Konstanz
α-Haemolysin von *Staphylococcus aureus* (α-Toxin)	Sigma Aldrich, Deisenhofen

5.2 Methoden

5.2.1 Tiermodell zur Bestimmung der intestinalen Permeabilität

5.2.1.1 Tiere

Die Untersuchung der intestinalen Permeabilität wurde am Ganztier mittels des *Ligated-Loop-Modells* durchgeführt. Als Versuchstiere dienten männliche Sprague-Dawley Ratten (Firma Harlan-Winkelmann GmbH, Deutschland) mit einem

Körpergewicht von 250-300g. Alle Tiertötungen und Organversuche wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales, Referat C, Postfach 31 0929, 10639 Berlin genehmigt (Genehmigungsnummer: G0113/04). Die Versuche wurden streng nach den Richtlinien zur Umsetzung des Tierschutzgesetzes an der Charité Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

5.2.1.2 Narkose und Beatmung

Die Vorgehensweise zur Durchführung der Narkose und der mechanischen Beatmung der Tiere, ebenso die Volumenzufuhr und die Überwachung der Kreislauffunktionen wurde bereits beschrieben und durchgeführt und erfolgte analog zu dieser Vorgehensweise (Temmesfeld-Wollbrück, 2007).

Die Tiere wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn nüchtern gelassen und hatten stets freien Zugang zu Wasser. Die Narkose wurde durch ein Gemisch aus Rompun® (Xylacin), Ketavet® (Ketamin) und Xylocain® (Lidocainhydrochlorid 2%) eingeleitet. Die Menge von 28 mg Xylocain, 135 mg Ketamin und 60 mg Lidocain wurde pro Kilogramm Körpergewicht subcutan als Depot verabreicht. Das ermöglichte eine für die Ratte absolut schmerzfreie Durchführung der Laparotomie und der intraabdominellen Präparation. Über einen Zugang in der Schwanzvene erfolgte die kontinuierliche Volumengabe in Form von 3 ml/h isotonischer Kochsalzlösung. Über diesen Zugang konnte darüber hinaus bei Bedarf Narkosemittel nachgegeben werden. Als Zeichen für ein Abflachen der Narkose galten feinste Bewegungen der Barthaare (Vibrissen). Die Fixierung der narkotisierten Ratte erfolgte mittels Klebestreifen auf einer Thermolux® Wärmeunterlage. Zur Vorbereitung der Tracheotomie erfolgte zwecks Lokalanästhesie eine subkutane Injektion von 0,5 ml Xylocain® 2% in die ventrale Halsregion. Danach wurde die Trachea schichtweise unter Schonung der großen Gefäße und des Nervus vagus freipräpariert und mit einem Ligaturfaden angeschlungen. Nach Eröffnung der Trachea wurde ein Beatmungstubus eingeführt und mittels Ligaturfaden fixiert. Ein spezielles Kleintierbeatmungsgerät (Inspira-Advanced-Safety Ventilator) beatmete die Tiere volumenkontrolliert mit Raumluft (50% Sauerstoff, arterieller CO_2 Druck zwischen 33 und 43 mmHg).

5.2.1.3 Präparation der ligierten Ileumschlange (ligated loop)

Die Präparation der ligierten Ileumschlinge erfolgte leicht modifiziert nach Wang und Otamiri et al. (Wang, 1998, Otamiri, 1987).

Vorgehen:

- Mediane Laparotomie mithilfe eines Elektrokauters.
- Eröffnung des Ileums 4 cm oral des ileozäkalen Übergangs und Legung einer Doppelligatur um die Inzision.
- Eine zweite Inzision erfolgte 10 cm proximal der ersten.
- Dann erneut Doppelligatur, wobei die aborale Ligatur noch nicht festgezogen wurde.
- Vorsichtiges Ausdrücken der Fäzes und Spülen mit warmer phosphatgepufferten Kochsalzlösung.
- Festziehen der Zäkum-nahen Doppelligatur.
- Einführen einer Venenverweilkanüle (Plastikkanüle, 20G) in die proximale (orale) Inzision und Festziehen der distalen Ligatur, so dass ein Ileumstück von 10 cm entstand (konstante Austauschfläche).
- Injektion von 10 mg 4 kDa Fluorescein-isothiocyanate (FITC)-dextran (FD-4) in die Verweilkanüle in einer Lösung von 10 mg in 1 ml PBS.
- Anfeuchten des Situs mit warmen PBS während der Präparation.
- Zurückverlegen der Ileumschlinge in die Bauchhöhle zum Schutz vor Austrocknung. Abdecken der Laparotomie mit in PBS getränkter Gase und Plastikfolie.

5.2.1.4 Quantifizierung der epithelialen Permeabilität

Die Dosierungen von Adrenomedullin und *Staphylococcus aureus* α*-Toxin* wurden anhand der Daten früherer Studien zur Untersuchung der endothelialen Barrierefunktion gewählt (Brell, 2005 (a,b); Hippenstiel, 2002). Gereinigtes α-Toxin wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Bhakdi, Universität Mainz, bereitgestellt. Es hatte eine Aktivität von 143 U/µg Protein.

Die Tiere wurden einer von **vier Versuchsgruppen** zugeteilt:

Tab. 3: Versuchsgruppen des Ligated loop Modells			
Stimulus	**Versuchsabfolge**	**Konzentration**	**Anzahl (n)**
Kontrolle		Isotonische Kochsalzlösung über ZVK	10
α-Toxin	45 Minuten kontinuierlich	$4.8*10^3$ U/kg, über ZVK	15
α-Toxin und AM	45 Minuten kontinuierlich alle 60 Minuten zum Zeitpunkt t=0, kontinuierliche AM-Gabe alle 60 Minuten eine Stunde nach erster α-Toxin Gabe	$4.8*10^3$ U/kg α-Toxin über ZVK, 24µg/kg*h AM über die Schwanzvene	15
AM	kontinuierlich alle 60 Minuten	24µg/kg*h über die Schwanzvene	6

Die Versuchsdauer betrug insgesamt 6 Stunden. Die 45-minütige Infusion von α-Toxin wurde zum Zeitpunkt t=0 gestartet und eine Stunde später erfolgte die kontinuierliche Gabe von AM. Kurz vor der α-Toxin-Gabe (t=0), nach vier und nach sechs Stunden nach α-Toxin-Gabe wurden Blutproben (Plasma) aus der A.carotis entnommen. Zur Quantifizierung der epithelialen Permeabilität wurde die FITC-Dextran-Konzentration im Plasma bestimmt. Dazu wurden 1:10 Verdünnungen der Plasmaproben in PBS (pH 7,4) hergestellt und die Fluoreszenz dieser Proben in einem Fluoreszenzspektrophotometer gemessen. Von der gemessenen Fluoreszenz wurde die Aktivität aus den jeweiligen Plasmaproben des Versuchstieres vor enteraler Applikation von FITC-Dextran subtrahiert. Die Berechnung der FITC-Dextran-

Plasmakonzentration für die so ermittelten Differenzen erfolgte dann mittels einer Standardreihe in PBS. Standard und Proben wurden bei einer Anregungswelle von 490 nm und einer Extinktionswellenlänge von 520 nm gemessen.

5.2.2 Zellkultur Epithelzellen

5.2.2.1 CaCo-2 Zellen

Die Messung der Permeabilität von Darmepithelzellen wurde an CaCo-2 Zellen durchgeführt (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DMSZ, Braunschweig).

CaCo-2 Zellen stellen eine permanente und adhärente Zelllinie dar, die als *in vitro*-Modell für das intestinale Epithel diente.

CaCo-2 Zellen haben ihren Ursprung in einem Adenokarzinom des humanen Kolons (Fogh, 1977). Als Krebszellen verfügen CaCo-2 Zellen über eine uneingeschränkte Teilungsfähigkeit. Mit dem Erreichen der Konfluenz und damit einhergehendem Kontakt zu den Nachbarzellen differenzieren sie zu Darmepithelzellen aus und ähneln dann morphologisch und funktional den Epithelzellen des menschlichen Darms. Die differenzierten Zellen zeigen dabei die für Dünndarmgewebe typischen Mikrovilli und die integralen Membranproteine. So verfügen sie über Bürstensaumenzyme (alkalische Phosphatase), durch Aktin-Myosin-Filamente über ein kontraktionsfähiges Zytoskelett, sowie über junktionale Proteine (Occludin, Adhärine) (Pinto, 1983, Hidalgo, 1989, Meunier, 1995).

Sie eignen sich daher zur Untersuchung des aktiven Stoffaustausches und der passiven parazellulären Permeabilität (Artursson, 1990, Hilgers, 1990, Wilson, 1990).

5.2.2.2 Pflege und Kultivierung der CaCo-2 Zellen

Die Präkultivierung der Zellen begann mit der Entnahme der Zellen aus flüssigem Stickstoff (-196°C), in dem diese in Kryoröhrchen gelagert wurden. Inkubiert wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C, 90% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 Begasung. Zum Wachstum und zur Vitalitätserhaltung der Zellen wurde das Medium bestehend aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 10% Fetales bovines Serum (FCS), 1% Pyruvat, 1% nichtessentiellen Aminosäuren, sowie Penicillin und Streptomycin, alle zwei Tage gewechselt. Das Medium eignete sich sowohl zur Ausdifferenzierung als auch zur Vermehrung der Zellen in 75 cm^2 Kulturflaschen. Die Teillösungen wurden unter sterilen Bedingungen entnommen, und durch einen

Flaschenaufsatz-Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm in eine sterile Glasflasche filtriert. Die Lagerung des Mediums erfolgte im Kühlschrank (4°C).
Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm^2 Kulturflaschen im Brutschrank. Zum Wachstum und zur Vitalitätserhaltung der Zellen war ein regelmäßiger Wechsel des Mediums nötig, um verbrauchte essentielle Substanzen zu ersetzen und Stoffwechselprodukte zu entfernen. Da CaCo-2 Zellen schnell wachsen und metabolisch hochaktiv sind, erfolgte der Mediumwechsel umtägig. Es wurde pro Tag für eine T-75 cm^2 Kulturflasche 10 ml Medium und für eine Well einer 12-Well-Platte 1 ml Medium berechnet. Der Wechsel des Mediums erfolgte unter sterilen Bedingungen. Zuerst wurde das alte Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und dann das auf 37°C erwärmte Medium mit einer sterilen Pipette vorsichtig auf die Zellen gegeben.

Die Zellaussaat geschah direkt in die Zellkulturgefäße, ohne dass eine Oberflächenbeschichtung notwendig war. In den 12-Well-Platten wuchsen die Versuchszellen. Die Zellen in den Kulturflaschen wurden regelmäßig passagiert, um zum einen Zellen für die Versuche zu gewinnen, und zum anderen, um die Zelllinie fortzuführen. Pro Passage waren drei T-75-Flaschen in Kultur und bei Bedarf drei 12-Well-Platten für die Versuche. Waren die Zellen in den Kulturflaschen konfluent, wurden sie für die Erhaltungskultur gesplittet.
Als monolayerartig wachsende Zellen verfügen CaCo-2 Zellen über die sogenannte „Kontaktinhibition“ des Wachstums, d.h., sobald die Zellen so dicht gewachsen sind, dass sie aneinanderstoßen, hört die Zellvermehrung auf und die Ausdifferenzierung beginnt. Die Versuchszellen differenzierten 6 Tage aus. Da die Differenzierung der Zellen direkt nach der Konfluenz der Zellen einsetzte, wurde der genaue Zeitpunkt der fast vollständigen Konfluenz durch tägliches Mikroskopieren bestimmt. Die Kultur der Zellen erfolgte im Inkubator bei 37°C und 5% CO_2.

5.2.2.3 Passagieren der Zellen

Nach dem Erreichen der etwa 90%igen Konfluenz (Zelldichte >90% im mikroskopischen Übersichtsbild) nach ungefähr 4-5 Tagen konnten die Zellen in die entsprechenden Platten im Verhältnis 1:5 ausgesät oder weiter in 75 cm^2 Kulturflaschen kultiviert werden. Dazu wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit einer 15 ml PBS Puffer-Lösung gewaschen und nach Zugabe der 0,0095%

EDTA/0,06255%igen Trypsin Lösung und Inkubation bei 37°C für 3-5 min. im Brutschrank vom Flaschenboden abgelöst. Das Trypsin wurde erst kurz vor Gebrauch erwärmt, da es durch zu langen Wärmeeinfluss beschleunigt inaktiviert wird. Sobald der größte Teil der Zellen vom Flaschenboden abgelöst war, wurde die Trypsin-Zellsuspension mit einer sterilen Pipette aufgenommen und in das vorgelegte Medium mit FCS gegeben. Die Aufgabe des FCS war es, das Trypsin und zytotoxisches EDTA zu inaktivieren. Im nächsten Schritt wurden die Zellen zentrifugiert (3 min. RZB 500, 1200 U/min.). Nach Absaugen des trypsinhaltigen Überstands und Resuspension der Zellen im Medium, wurden die Zellen ausgesät. Je nach Bedarf konnte der Verdünnungsfaktor variiert werden.

5.2.2.4 Kryokonservierung der Zellen

Die Aufgabe der Kryokonservierung ist die Langzeitlagerung und Bevorratung der Zellen. Dadurch ist eine kontinuierliche Arbeit mit den Zellen möglich, und auf einen erhöhten Zellbedarf bzw. Zellverlust durch z.B. eine Kontamination kann schnell reagiert werden. Das Einfriermedium bestand aus Medium und 20% DMSO zum Zellschutz bei der Konservierung. Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

5.2.2.5 Auftauen der Zellen

Nach Erwärmen des Kryoröhrchens wurden die Röhrchen unter sterilen Bedingungen in Falconröhrchen mit vorgewärmten CaCo-Medium überführt. Wichtig war dabei, auf eine rasche Durchführung der Prozedur zu achten, um die Konzentration des DSMO schnell zu verringern. DMSO ist bei hoher Stoffwechselaktivität der Zellen zytotoxisch. 24 Stunden nach dem Auftauen und Überführen der Zellen führten wir einen Mediumwechsel durch, um eine noch gering vorhandene Menge des DMSO zu entfernen.

5.2.3 CaCo-2 Zellkultur im Transwell®-Kammersystem

Um Permeabilitätsuntersuchungen an den Epithelzellen vornehmen zu können, sowie physiologische Transportprozesse über die gastrointestinale Barriere zu ermöglichen, verwendeten wir das Transwell®-Kammer-System. Somit erreichten wir die Anzucht der Epithelzellen auf einer permeablen Oberfläche in einer geeigneten Anordnung. Wir verwendeten dafür das Transwell®-System der Firma Costar, wobei als Basis des

Systems 12-Well-Platten dienten. Die Membraneinsätze sind charakterisiert durch eine permeable Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 0,4 µm und einer Wachstumsfläche von 1,1 cm^2. Die Membran mit dem Zellmonolayer trennt das einzelne Schälchen in eine obere (apikale) und eine untere (basolaterale) Kammer. Die basolaterale Kammer ist durch drei Aussparungen zugängig. Die Monolayer der CaCo-2 Zellen diente somit als Diffusionsbarriere zwischen dem apikalen und dem basolateralen Kompartiment.

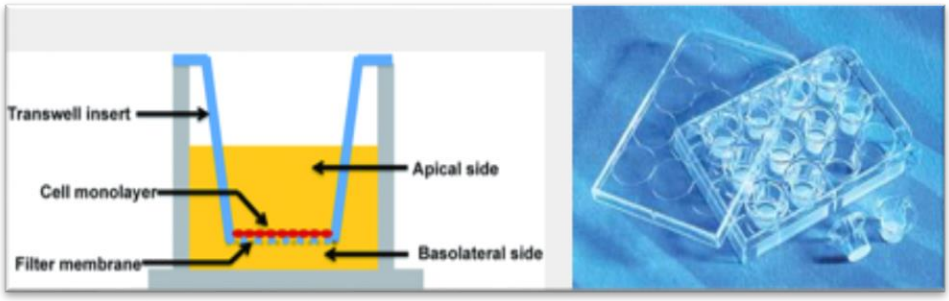

Abb. 3: *Aufbau eines einzelnen Transwelleinsatzes mit polycarbonatbeschichteter Filtermembran zur Messung der Durchlässigkeit von parazellulären molekularen Markern und 12-Well-Platte.*

Zur Aussaat wurden subkonfluente (90%) CaCo-2 Zellen nach Waschen mit PBS, Abtrypsinieren und Zentrifugieren in frischem Medium resuspendiert. Die Versuchszellen wurden am 14. postkonfluenten Tag eingesetzt. Während der Ausdifferenzierung wurde täglich der transepitheliale elektrische Widerstand der Zellen gemessen. Die eingestellte Zellsuspension wurde in die apikalen Kammern gegeben. Die Zellen erhielten eine immer gleichbleibende Menge an Medium in die apikale und die basolaterale Kammer (apikal: 0,5 ml, basolateral: 2 ml). Innerhalb von drei Tagen bildeten die CaCo-2 Zellen einen vollständig geschlossenen Zellrasen aus. Dies war wichtig für eine gleichmäßige Differenzierung der einzelnen Einsätze im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Messdaten. In den darauffolgenden Tagen differenzierten sich die Zellen aus und bildeten die für Dünndarmepithelien typischen junktionalen Strukturen, sowie ein intrazelluläres Mikrofilamentsystem aus, so dass die wesentlichen Bestandteile, die an der Regulation der parazellulären Permeabilität beteiligt sind, vorhanden waren.

5.2.3.1 Permeation von parazellulären molekularen Markern

Für die Versuche zur Messung der parazellulären Permeabilität diente Fluoreszein-isothiocyanate (FITC)-dextran (FD-4). FD-4 wurde in Medium gelöst bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml und in die apikale Kammer der Wells mit einer endgültigen Konzentration von 0,5 mg/ml FD-4 pipettiert. Nach gleicher Vorgehensweise wurde eine zweite Farbstofflösung bestehend aus 20% humanem Serumalbumin (68 kDa) angereichert mit 10 mg/ml Evans Blue Dye (EBD) in die apikale Kammer der Wells bis zu einer endgültigen Konzentration von 0,5 mg/ml EBD und 1% Albumin pipettiert. Die vollständige Bindung von EBD an Albumin konnte durch Proteinausfällung mit Trichlorethanolessig in der ersten Lösung und darauffolgender Zentrifugation bestätigt werden. Daraus resultierte ein dunkelblaues Sediment mit einem klaren und farblosen Überstand.

Um die Permeabilität des Monolayers beurteilen zu können, wurde die Menge von FD-4 und EBD aus entnommenen Mediumproben (25µl) aus dem basolateralen Kompartiment gemessen. EBD besitzt eine starke Fluoreszenz im infraroten Bereich. Es konnte mit dem *Infrarot Fluoreszenz Laser Scanner* nachgewiesen werden. Dieser misst durch punktuelle Anregung das emittierte Infrarotlicht. Dazu wurde ein Albumin-EBD Standard und alle Mediumproben des Permeabilitätsversuches in 96-Well-Platten transferiert und die Probe bei einer Wellenlänge von 70 nm gescannt. Die durchgehend detektierte Intensität jeder Transwell-Kammer wurde gespeichert und die EBD-Konzentration mittels EBD-Standardkurven berechnet. Die FD-4 Konzentration wurde wie oben bereits beschrieben mit dem *Fluoromax® 2 Spectrofluorometer* gemessen. Fluoreszenz entsteht, wenn Moleküle Lichtphotonen im UV-Licht (Wellenlänge 200-900 nm) absorbieren.

5.2.3.2 Messung des Transepithelialen Elektrischen Widerstands

Die Messung des Transepithelialen elektrischen Widerstands diente sowohl der Verlaufsuntersuchung zur Prüfung der Dichtigkeit des Zellmonolayers, als auch zur Bestimmung des genauen Zeitpunktes, an dem ein Versuch zur Permeabilitätsuntersuchung durchgeführt werden konnte. Darüber hinaus zeigte er auch die Qualität im Sinne der parazellulären Junktionen an.

Dazu wurde die Methode der Messung des *Transepithelialen Elektrischen Widerstands (TEER)* verwendet. Der transepitheliale Widerstand kann unter

Berücksichtigung des Filterwiderstands der Transwell-Kammer mit Hilfe eines epithelialen Voltometers gemessen werden. Dabei wird der elektrische Widerstand mittels einer speziellen Messelektrode zwischen dem oberen und dem unteren Kompartiment des Transwell-Membransystems gemessen. Je konfluenter die Zellen auf der Membran wuchsen und je dichter die Zellschicht war, desto höher war der gemessene Widerstand. Bei gemessenen Widerständen von 250 Ohm wurden die Zellen für die Versuche genutzt. Während des laufenden Versuches konnte der Einfluss der Stimuli sowie die Abschwächung der Permeabilität durch Adrenomedullin anhand der Widerstände des Zellmonolayers aufgezeigt werden. Ein Abfall des gemessenen Widerstandes bedeutete eine Verschlechterung der epithelialen Barrierefunktion.

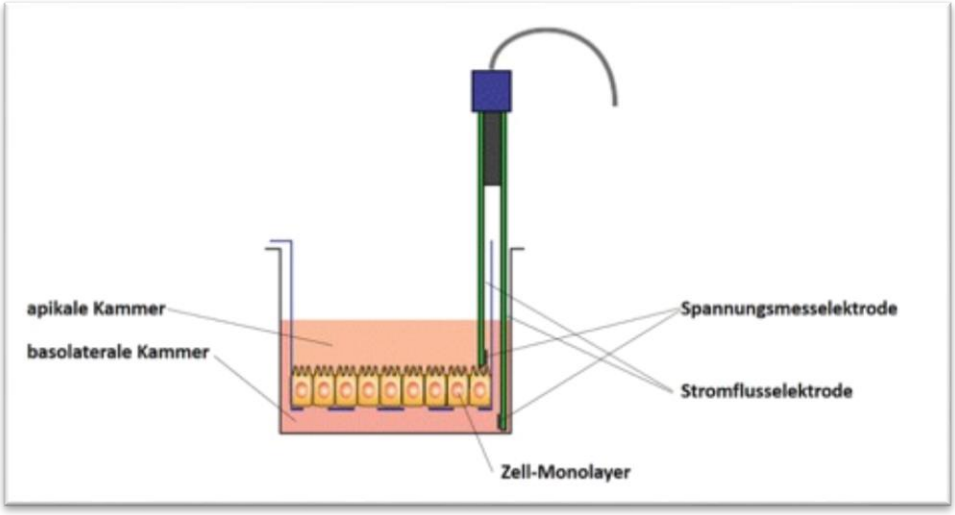

Abb. 4: *Epithelialer Voltometer zur Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER)*

5.3 Permeabilitätsversuche und experimentelles Protokoll

5.3.1.1 Vorbedingungen

Um den exakten Zeitpunkt für den Versuchsbeginn zu ermitteln, wurde die Dichte des Zellmonolayers mittels des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) bestimmt. Dieser lag bei 250 Ohm. Ein Mediumwechsel der apikalen und basolateralen Kammer erfolgte zwei Stunden vor Versuchsbeginn, um eine Temperatur von 37°C und 5%ige CO_2- Sättigung zu gewährleisten.

5.1.4.1 Experimentelles Protokoll

0	**t-2**	**Mediumwechsel mit DMEM**
1	**t-1**	Pipettieren von jeweils 25 µl **FD-4** und 25 µl **EBD_Albumin** in die apikale Kammer
		Probenentnahme aus der basolateralen Kammer für die Fluoromax und Licor-Scanner-Messung.
1 h 20		**Zardaverin** in die basolaterale Kammer
1 h 30		**Adrenomedullin** (0.01, 0.05 und 0,5 µM) in die basolaterale Kammer. **Forskolin** (1 µM) in die basolaterale Kammer.
2 h 30		**Probenentnahme und Widerstandsmessung (TEER)**
	t=0	**Stimulation mit H_2O_2** (1, 2, 5, 10, 20) und mit **Staphylococcus aureus α-Toxin** (0.1, 0.5, 1, 2 µg/ml) oder mit **PBS** in die basolaterale Kammer.
3 h 30	**t=1**	**Probenentnahme und TEER**
4 h 30	**t=2**	**Probenentnahme und TEER**
5 h 30	**t=3**	**Probenentnahme und TEER**

Bemerkungen: Für jeden Versuchsansatz wurden auf der Transwellplatte zwei Einsätze belegt und daraus für die jeweiligen Messwerte ein Mittelwert gebildet. Pro Platte konnte pro Versuch und Ansatz nur ein unabhängiger Wert erzeugt werden. Die gewählten Mengenangaben für AM und auch für α-Toxin basierten auf vorherigen Publikationen zur Analyse der endothelialen Barrierefunktion.

Kontrolle mit PBS als Negativkontrolle 0,5 ml Medium apikal 2 ml Medium basolateral	**Kontrolle**	**H_2O_2** Medium wie Kontrolle, Stimulation mit unterschiedlicher Dosierung über die basolaterale Kammer (t=0)	**H_2O_2**
H_2O_2	**H_2O_2**	**H_2O_2 + AM** Medium wie Kontrolle 30 min vor Stimulation mit H_2O_2, AM-Gabe basolateral (t=-0,5)	**H_2O_2 + AM**
α-Toxin Medium wie Kontrolle, Stimulation mit unterschiedlicher Dosierung über die basolaterale Kammer (t=0)	**α-Toxin**	**α-Toxin + AM** Medium wie Kontrolle. Stimulation mit unterschiedlicher Dosierung über die basolaterale Kammer (t=0)	**α-Toxin + AM**

Abb. 5: *Stimulationstabelle der Transwells vor dem Versuch mit zwei Kontrollen, α-Toxin und H_2O_2 als Stimuli, und AM. In die oberen Kammern wird nur der Farbstoff gegeben, so dass sie von basolateral wirken.*

5.3.2 Messung von intrazellulärem cAMP

Die Messung von intrazellulärem cAMP wurde 15 Minuten nach der Zugabe von AM bzw. Forskolin vorgenommen.

Die Dosierungen von Forskolin, AM und den Phosphodiesteraseinhibitoren (PDE's) wurden anhand der Daten aus früheren Studien zur Analyse der cAMP-Bildung und PDE-Aktivität gewählt (Suttorp, 1993; Suttorp, 1996; Hippenstiel, 2002).

Zur Bestimmung des intrazellulären cAMP-Gehalts der Proben wurde der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) benutzt.

Das Prinzip beruht auf einer festen Menge cAMP-Peroxidase-Konjugat an einer limitierten Anzahl von cAMP spezifischen Antikörpern. Die spätere Reaktion zwischen der cAMP gekoppelten Peroxidase und einer Substratlösung führt zu einer blauen Farbreaktion, die umso stärker ist, je weniger unkonjugiertes cAMP an die Antikörper

gebunden ist. Mit Hilfe eines Photometers kann diese quantitativ bestimmt werden. Anhand einer Standardkurve konnten die cAMP-Gehalte bestimmt werden.

5.3.2.1 Probengewinnung

Zur Probengewinnung wurden die CaCo-2 Zellen über 9 Tage in 12-Well-Platten ausgesät. 12 Stunden vor Versuchsbeginn wurde das Medium ausgetauscht. Ein weiterer Mediumwechsel erfolgte eine Stunde vor Versuchsbeginn. Die Stimulation erfolgte durch Applikation von AM (0.01, 0.1, 1µm), Forskolin oder PBS. In einigen Ansätzen wurde fünfzehn Minuten vor der Stimulation 10 µM Zardaverin hinzugegeben. Der Versuch wurde zehn Minuten nach der Stimulation beendet. Nach Absaugen der Überstände und kurzem Waschen der Zellen mit 4°C kaltem PBS wurden die Zellen durch eine 30minütige Inkubation mit 0.1 M HCL lysiert. Die Zelllysate wurden zentrifugiert und die Überstände weiterverwendet. CAMP wurde fünfzehn Minuten nach der Stimulation ermittelt.

Zu den lysierten Zellen bzw. zum Standard wurde dann ein Acetylierungsreagenz zugegeben und dann in die Standards oder die verdünnten Proben in die vorbereiteten Wells pipettiert. Das cAMP-Peroxidase Konjugat wurde anschließend hinzugefügt, sowohl in die Standards, als auch in die Proben. Durch Zugabe der Stimuli in jede Well wird die Bindungsreaktion ausgelöst. Nach einer Inkubation von 2 Stunden werden die Wells gewaschen und das Substrat zugegeben, welches mit dem gebundenen cAMP-Peroxidase Konjugat reagiert. Die Reaktion wird nach einer kurzen Inkubation gestoppt und die Farbreaktion mit einem ELISA-Reader bei 405 nm Messwellenlänge und 590 nm Referenzwellenlänge bestimmt.

5.3.2.2 Bestimmung der Phosphodiesterase-Isoenzyme

Probengewinnung:

1. Bepflanzen von 6-Well-Platten mit CaCo-2 Zellen.
2. Ausdifferenzierung über 9 Tage in Transwell-Platten.

Das Isoenzymmuster wurde mit und ohne inflammatorische Stimuli (TNF-α) bestimmt. Die Stimulation mit TNF-α erfolgte über 24 Stunden mit 50 µg/ml.

Zelllysat:

Die Bestimmung der Phosphodiesterase-Aktivität erfolgte nach der Methode von Thompson et al. (Thompson, 1974) modifiziert von Bauer und Schwabe (Bauer und Schwabe, 1980) mit [^{3}H]cAMP und [^{3}H]cGMP als Substrat.

Pro Wert wurden zwei Wells einer 6-Well-Platte mit 1 ml 4°C kaltem H/H$^+$/$^+$ mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde mit H/H$^+$/$^+$ auf 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert (5 min, 3000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Aufnahmepuffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zelllyse mit Hilfe eines Ultraschalls (2*15 sec, 9 Pulse) bei 4°C.

Probenbestimmung:

Der Proteingehalt der Proben wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay zur Konzentrationsbestimmung humaner und bakterieller Proteine basierend auf der Methode nach Bradford bestimmt. Die Bestimmung der PDE-Isoenzyme an CaCo-2 Zellen wurde freundlicherweise von Mitarbeitern der Firma ALTANA in Konstanz vorgenommen. Die gezielte Anwendung von spezifischen Hemmstoffen der einzelnen Phosphodiesterasen und die damit verbundene Abnahme der PDE-Gesamtaktivität führte zu einem PDE-Aktivitätsmuster. Die im Zelllysat gemessenen PDE-Aktivitäten wurden dann auf den Proteingehalt der Proben bezogen und daraufhin in Prozent der Gesamt-PDE-Aktivität umgerechnet.

5.3.3 Ussing-Kammer

Die Untersuchungen am proximalen Rattenkolon wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Holger Martens, Physiologisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät, FU Berlin unter zu Hilfenahme der Ussing-Kammer durchgeführt (Ussing, 1951). Die aus Plexiglas gefertigte Ussing-Kammer ist aus zwei verschiedenen Teilen zusammengesetzt, die im Inneren einen Hohlraum bilden. Dieser Hohlraum wird durch Gewebe, z.B. Epithelien in zwei Kompartimente unterteilt. Das eingespannte Gewebe wird von einer physiologischen Kochsalzlösung (Tyrode Buffer Solution) umspült. Ionenverschiebungen, die durch die Zellen zustande kommen, können durch in die Kammer eingebrachte Elektroden quantitativ erfasst werden. Die polar aufgebauten Epithelien sind Grundlage der Ionenverschiebungen.

Männliche Sprague-Dawley Ratten (250-300 g) wurden durch subkutane Injektion mit Xylocain (30 mg*kg -1) und Ketamin (100 mg*kg -1) anästhesiert. Ein Katheter wurde in die laterale Schwanzvene platziert. Nach dem Töten der Ratten durch eine intravenöse Überdosis der Anästhetika wurde das Abdomen weit geöffnet. Ein 7 cm langes Segment aus dem proximalen Kolon wurde entfernt und in eiskalte Tyrode Puffer Lösung (141 Na; 85 Cl; 5K; 25 HCO_3; 1 HPO_4; 2 H_2PO_4; 1 Ca; 1 Mg; 13 Acetat; 13 Propionat; 13 Butyrat; 10 Glukose; Begasung mit 95% O_2 und 5% CO_2; pH 7.4) platziert.

Das Kolonstück wurde an der mesenterialen Seite eröffnet und die durch alle Schichten gehenden Gewebepräparate in der Ussing-Kammer befestigt (Flächengröße der Proben 1 cm^2). Das befestigte Kolon wurde von beiden Seiten in Tyrode Puffer Lösung bei 38°C gewaschen und an eine computerkontrollierte Klemmspannvorrichtung angeschlossen.

Die parazelluläre epitheliale Permeabilität wurde anhand der Änderung des elektrischen Widerstands gemessen. Der Kurzschlussstrom (short-circuit current, SCC), der vornehmlich die Chloridsekretion ausmacht, wurde in uA/cm^2 gemessen. Der elektrische Widerstand der Kolonproben (Q* cm-2) wurde mit dem Ohmschen Gesetz aus dem Abstand mit der potentiellen Abweichung, hervorgerufen durch bipolare Impulse von 100 µA, gemessen. Demzufolge wurde der elektrische Widerstand, der die intestinale Barrierefunktion widerspiegelt, nicht von der potentiellen Abweichung bezüglich der epithelialen Chloridsekretion beeinflusst. Zum Vergleich zwischen Versuchsgruppen wurde die relative Änderung des SCC und des elektrischen Widerstands berechnet.

5.3.4 Statistik

Alle in dieser Arbeit präsentierten Daten sind als Mittelwert plus minus Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die graphischen Darstellungen wurden mit PlotIT® 3.2 und Power-Point® angefertigt und bei der weiteren statistischen Auswertung kam das Programm SigmaStart® (SPSS Inc. Chicago, USA) zur Anwendung. Bei Vergleichen innerhalb einer Versuchsreihe kam nach Testung auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov) der T-Test für verbundene Stichproben zur Anwendung. Bei Vergleichen zwischen zwei verschiedenen Versuchsreihen wurde das allgemeine lineare Modell für Messwiederholungen herangezogen. Bei vergleichen zwischen

mehr als zwei Versuchsreihen kam die einfaktorielle Analysis of Variance (ANOVA) zum Einsatz. In allen Fällen wurde zuvor auf Normalverteilung getestet. War diese nicht gegeben, so kam stattdessen eine ANOVA on Ranks zur Anwendung. Ein Wert von $p<0.05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

Für die Graphiken wurde die englische Dezimalschreibweise verwendet (z.B. der Wert 0.1 µM entspricht 0,1 µM).

6 Ergebnisse

6.1 AM verbessert die intestinale Barrierefunktion am Ganztier

Um zu prüfen, ob AM die epitheliale Barriere des Darms *in vivo* stabilisieren kann, untersuchten wir die intestinale Permeabilität am Ganztier mittels des Ligated Loop Modells. *Staphylococcus aureus* α-Toxin induzierte bei den Ratten wesentliche Merkmale eines septischen Schocks. Vorherige Publikationen konnten das bereits zeigen. In diesem gleichen Modell konnte gezeigt werden, dass es nach einer Infusion von $4.8*10^3$ U/kg α-Toxin bei Ratten zu einer Mortalität von 53% nach 6 Stunden kommt. Eine therapeutisch infundierte Gabe von AM (24 µg/kg*h) eine Stunde nach α-Toxin Gabe konnte die Mortalität der Ratten auf 7% senken (Temmesfeld-Wollbrück, 2007).

Im Rahmen eines Versagens der intestinalen Barriere kann es zur Translokation von Pathogenen in die systemische Zirkulation kommen. Zur Quantifizierung der epithelialen Permeabilität in diesem Versuch, ermittelten wir die FITC-Dextran Konzentration im arteriellen Plasma. Die intravenöse α-Toxin Applikation über den zentralen Venenkatheter führte nach 4 Stunden zu einem maximalen Anstieg der intestinalen Permeabilität für den Farbstoff *(Abb.6)*. Dieser Anstieg zeigte sich in einer Translokation von FITC-Dextran vom Darmlumen in die systemische Zirkulation. Die therapeutische, periphere Gabe von AM (24 µg/kg*h) über 3 Stunden startete 1 Stunde nach der α-Toxin Gabe als Infusion über die Schwanzvene. AM senkte den Anstieg von FITC-Dextran im arteriellen Plasma signifikant um 60%. Die therapeutische AM-Gabe über die Schwanzvene führte zu einer Verbesserung der intestinalen Barrierefunktion nach Applikation von α-Toxin im Ganztier.

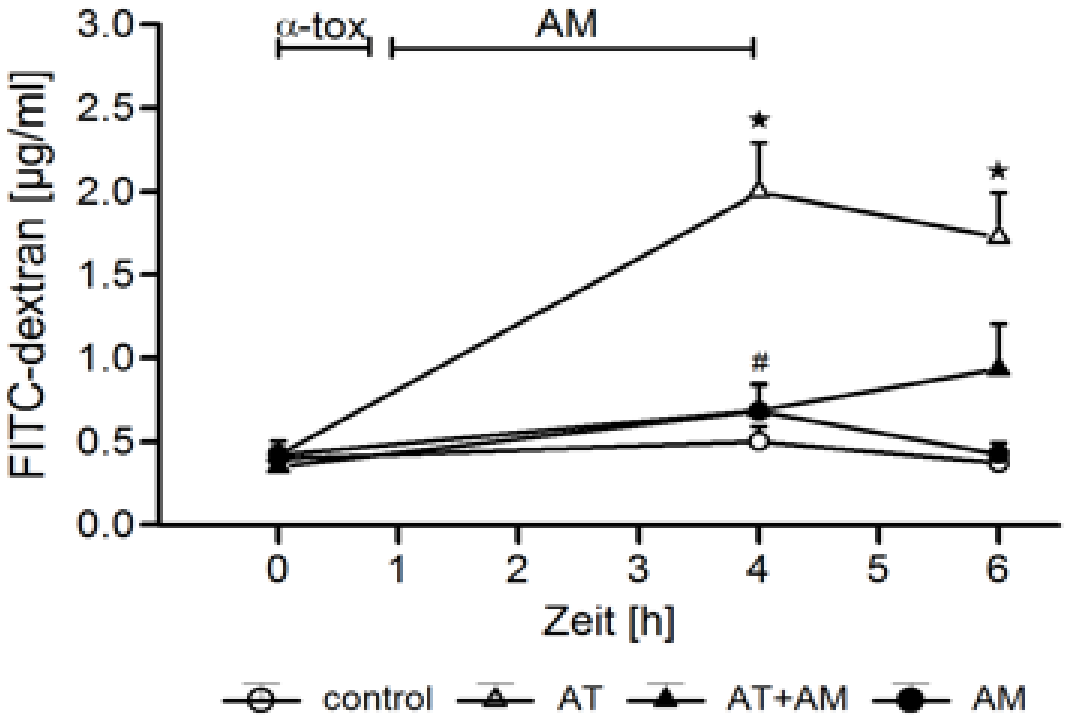

Abb.6: *FITC-Dextran Konzentration im arteriellen Plasma als Marker zur Messung der intestinalen epithelialen Permeabilität am Ligated Loop Modell der Ratte nach Applikation von α-Toxin zum Zeitpunkt t=0 und AM zum Zeitpunkt t=1. Kontrolle (leere Ringe n=10); α-Toxin (AT, leere Dreiecke, 4,8*10³ U/kg, n=15); α-Toxin und AM (gefüllte Dreiecke, 4,8*10³U/kg α-Tox. + 24µg/kg*h AM; n=15); AM (gefüllte Ringe, 24µg/kg*h, n=6). Alle Werte wurden als Mittelwert ± SEM angegeben. ★ p<0.05 getestet gegen die Kontrollgruppe. #p<0.05 getestet gegen die α-Toxin-Gruppe.*

6.2 AM senkt die Farbstoffpermeation am CaCo-2 Zellmonolayer nach Applikation von α-Toxin

Die Wirkung von α-Toxin und AM auf die Permeabilität der CaCo-2 Zellen konnte an der Farbstoffansammlung im basalen Kompartiment der Transwellkammer gemessen werden. α-Toxin führte am CaCo-2 Zellmonolayer zu einer dosisabhängigen Zunahme der Durchlässigkeit für FITC-Dextran. Es kam dosisabhängig zu einem signifikanten Anstieg der FITC-Dextran Konzentration im basalen Kompartiment, wobei der deutlichste Anstieg nach 3 Stunden bei einer α-Toxin Dosis von 2 µg/ml lag *(Abb. 7A)*. Diese α-Toxin Dosis wurde für die Untersuchung der AM Wirkung an den CaCo-2 Zellen eingesetzt. Die Auswirkungen von AM auf die Permeabilität der Zellen wurde

ebenfalls an der Farbstoffansammlung im basalen Kammerkompartiment gemessen. Die eingesetzte AM-Dosis von 0.5 µM verringerte den α-Toxin induzierten Anstieg der Durchlässigkeit, was an der Farbstoffreduktion im basalen Kompartiment zu messen war. Dieser Effekt zeigte sich 3 Stunden nach α-Toxin Applikation *(Abb. 7B)*. Die alleinige Gabe von AM hatte keinen Einfluss auf die Farbstoffpermeation. Die Abbildung 7A zeigt den von α-Toxin ausgelösten dosis (0.1 µg/ml)- und zeitabhängigen (0-3 Stunden) Übertritt von FITC-Dextran von der apikalen Kammer in die basale Kammer am CaCo-2 Monolayer auf der Filtermembran der Transwell. Die Translokation vom Farbstoff ins basale Kompartiment konnte bei einer Konzentration von 0.5 µM AM und gleichzeitiger α-Toxin Gabe von 2 µg/ml reduziert werden *(Abb. 7B)*.

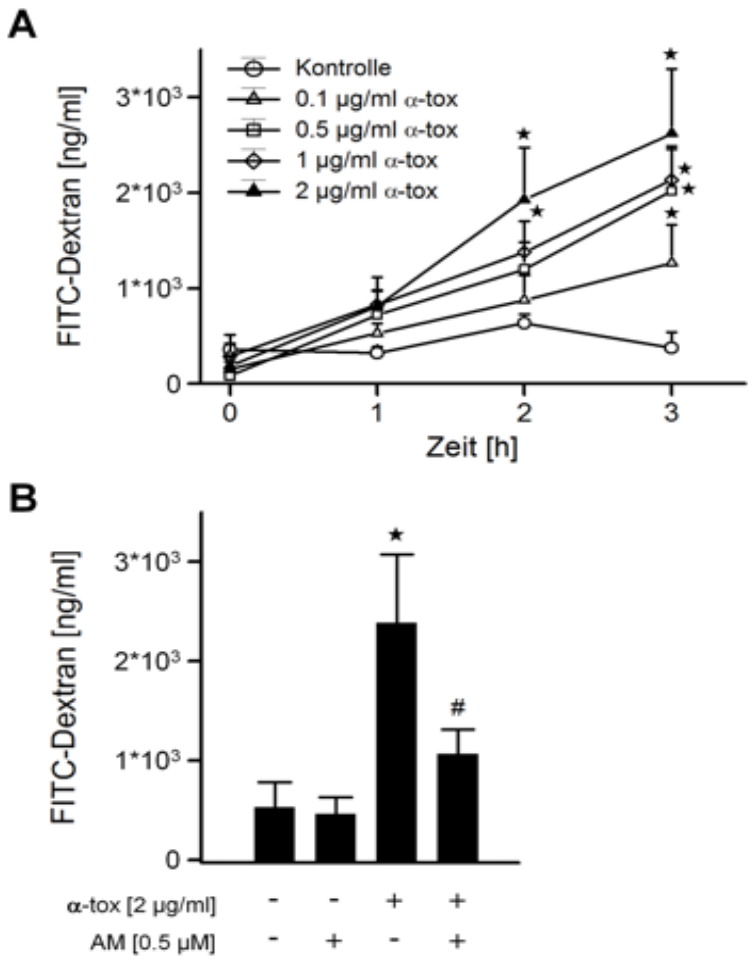

Abb.7: *FITC-Dextran Konzentration im basalen Kompartiment der Transwellkammer als Marker zur Messung der intestinalen epithelialen Permeabilität an CaCo-2 Zellen nach Applikation von α-Toxin und AM. (je n=8) (A) α-Toxin Dosisreihe zum Zeitpunkt t=0; (B) 2µg/ml α-Toxin und 0.5µM AM. ★ p<0.05 getestet gegen die Kontrollgruppe; # p<0.05 getestet gegen die α-Toxin-Gruppe. Alle Werte wurden als Mittelwert ± SEM angegeben.*

6.3 AM verbessert die durch H_2O_2 ausgelöste Dysfunktion der epithelialen Barriere

H_2O_2 führte dosis- und zeitabhängig zu einer Zunahme der Permeabilität für FITC-Dextran und EBD-Albumin, und senkte signifikant den transepithelialen elektrischen Widerstand um 60% 3 Stunden nach Applikation. Die gewählte H_2O_2 Dosis von 10mM, welche zu einem fast maximal möglichen Effekt am Epithel führte, ermöglichte eine Prüfung der Veränderung der Permeabilität des Epithels mit verschiedenen AM-Dosen. AM konnte den durch H_2O_2 ausgelösten und den daraus resultierenden FITC-Dextran und EBD-Albumin Konzentrationsgradienten signifikant senken. Ebenso kam es zu einem deutlichen Anstieg des TEER am CaCo-2 Monolayer. Der stärkste Effekt wurde bei einer AM-Konzentration von 0.5 µM erreicht mit einer daraus resultierenden Reduzierung der Permeabilität für die molekularen Marker von über 70%. Außerdem konnte die Abnahme des TEER durch H_2O_2 bei dieser AM Konzentration stark gehemmt werden.

AM verbesserte die durch H_2O_2 ausgelöste Dysfunktion der epithelialen Barriere. Dosis (1-20 mM) -und zeitabhängig kam es durch H_2O_2 zu einer vermehrten Farbstoffansammlung im basalen Kompartiment der Kammer für FITC-Dextran *(Abb. 8A)* und EBD-Albumin *(Abb. 8B)*. Der nach 3 Stunden gemessene Widerstand verringerte sich nach H_2O_2 Applikation *(Abb. 8C)*. AM konnte die Permeabilität am CaCo-2 Monolayer für FITC-Dextran und EBD-Albumin dosisabhängig (0.01-0.1 µM) reduzieren *(8D/E)*. Ebenso hemmte AM den durch H_2O_2 ausgelösten Widerstandsabfall des Epithels *(Abb. 8F).*

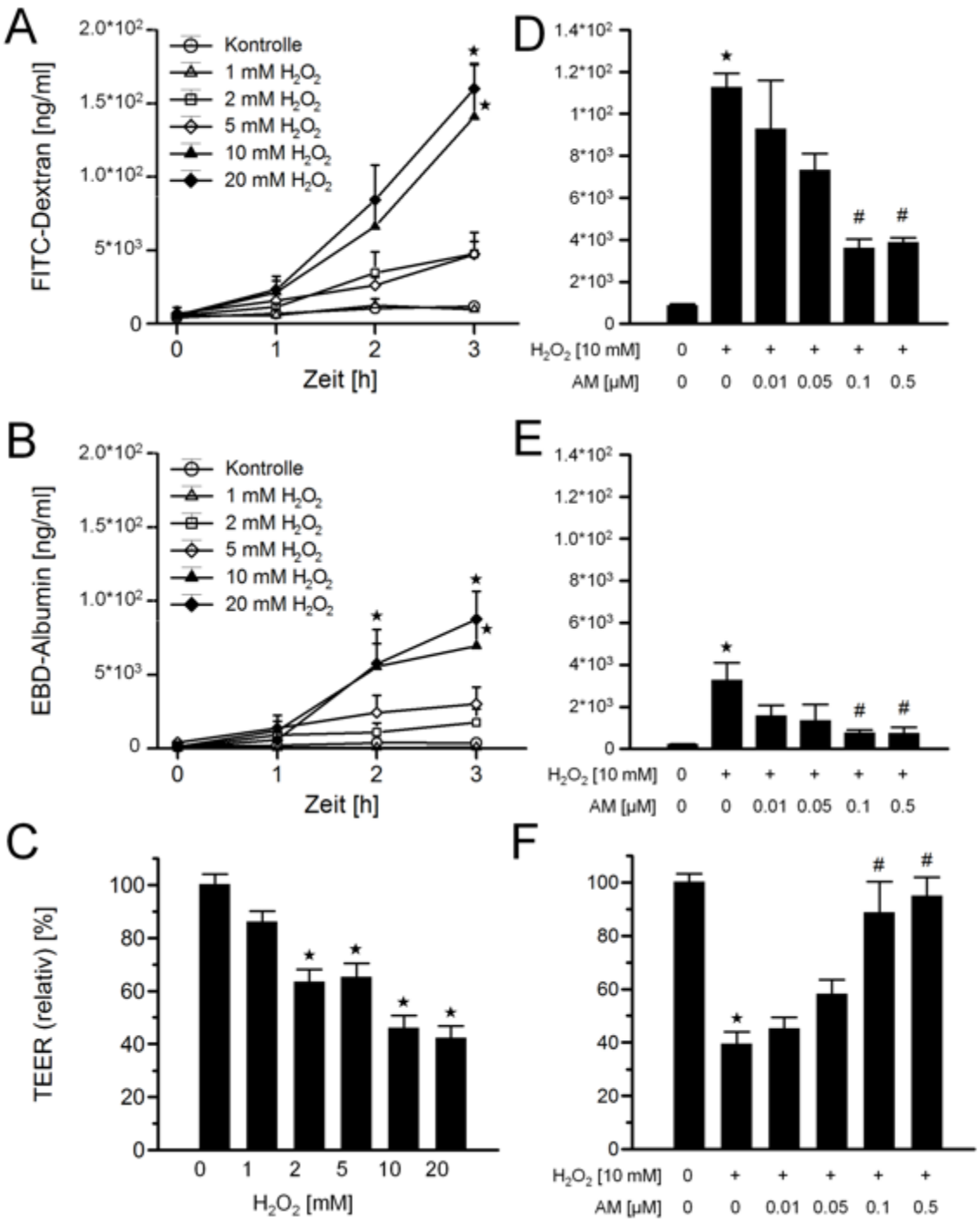

Abb. 8: *Veränderung der FITC-Dextran / EBD-Albumin-Konzentration und des TEER zur Messung der intestinalen epithelialen Permeabilität an CaCo-2 Zellen nach Applikation von H_2O_2 zum Zeitpunkt t=0 (je n=8).*

(A) H_2O_2 und FITC-Dextran; (B) H_2O_2 und EBD-Albumin; (C) H_2O_2 und TEER; (D) 0.01-0.1 µM AM und FITC; (E) AM und EBD; (F) AM und TEER. ★ p<0.05 getestet gegen die Kontrollgruppe. # p<0.05 getestet gegen die H_2O_2 Gruppe. Alle Werte wurden als Mittelwert ± SEM angegeben.

6.4 Am intakten Rattenkolon in der Ussing-Kammer senkt AM die durch H_2O_2 induzierte Hyperpermeabilität

Um zu prüfen, ob AM auch zu einer Senkung der Permeabilität in einem anderen Modell in der Lage ist, untersuchten wir den Effekt von AM an einem intakten Rattenkolon in der Ussing-Kammer. Als Toxin zur Auslösung der Hyperpermeabilität wurde ebenfalls H_2O_2 benutzt. Unter 0.5 µM H_2O_2 kam es innerhalb von 30 Minuten zu einer deutlichen Reduktion des elektrischen Widerstands des Kolons um 30% verglichen mit der Kontrolle. AM konnte diesen Widerstandsabfall vollständig aufheben *(Abb. 9)*.

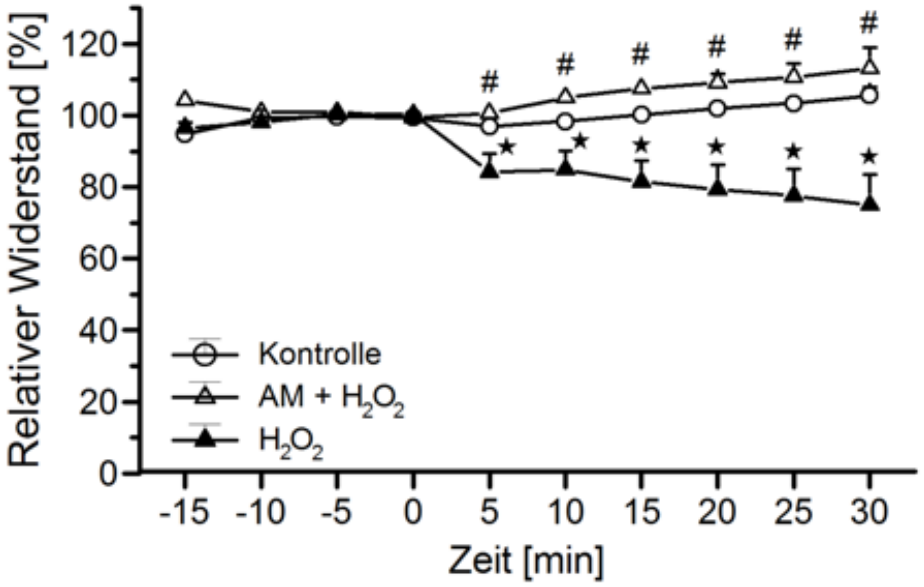

Abb. 9: *Verlauf des relativen elektrischen Widerstands an einem intakten Rattenkolon in der Ussing-Kammer nach Applikation von H_2O_2 und AM zum Zeitpunkt t=-15 min und anschließendem Messbeginn zum Zeitpunkt t=0 (n=5).*

★ *p<0.05 getestet gegen die Kontrollgruppe. # p<0.05 getestet gegen die H_2O_2-Gruppe. Alle Werte wurden als Mittelwert ± SEM angegeben.*

6.5 AM hat keinen Einfluss auf den Anstieg des sekundären Botenstoffs cAMP in den CaCo-2 Zellen

Der Anstieg des sekundären Botenstoffs cAMP gilt im Allgemeinen als der zentrale Mechanismus bei der Signalübertragung von AM (Hinson, 2000, Poyner, 2002, Temmesfeld-Wollbrück, 2007, Takata, 2009, Liao, 2013) und gilt dabei im Speziellen als Aktivator der Stabilisierung der endothelialen Barriere (Hippenstiel, 2002). Bei sehr guter Positivkontrolle mit Forskolin und auch durch eine PDE-Blockade mit Zardaverin,

dessen Effizienz am PDE-Isoenzymmuster (Firma ALTANA in Konstanz) festgemacht ist, konnten wir keinen Anstieg von cAMP in den Zellen nach Exposition mit AM feststellen *(Abb. 10A)*.

6.5.1 Aktivitätsprofil für Phosphodiesterasen der CaCo-2 Zellen

CAMP wird über Phosphodiesterasen katabolisiert und unterschiedliche Zellen zeigen verschiedene Phosphodiesterase-Aktivitätsmuster (Bender, 2006, Conti, 2007), welche darüber hinaus durch inflammatorische Stimuli reguliert werden können (Seybold, 2005). Da das Aktivitätsprofil für Phosphodiesterasen für humane epitheliale Darmzellen noch unbekannt war, untersuchten wir das PDE-Aktivitätsprofil der CaCo-2 Zellen *(Abb. 10B)*. Die Zellen zeigten eine hohe Aktivität für PDE 3 und 4 herabsetzendes cAMP, wohingegen sich eine geringe Aktivität für die PDE's 2,5 und 7 zeigte.

Zudem konnte die CaCo-2 PDE Expression auch nicht durch die Exposition der Zellen durch TNF-α modifiziert werden. Von TNF-α weiß man, dass er als Stimulus in humanen Endothelzellen die PDE 2- Expression induziert (Seybold, 2005). Nachdem die CaCo-2 PDE-Expression durch TNF-α nicht wie in humanen Endothelzellen, modifiziert werden konnte, wurden die AM-Effekte auf das cAMP in Anwesenheit des zweifach selektiven PDE 3/4 Inhibitor Zardaverin analysiert *(Abb. 10A)*. Obwohl Zardaverin den durch Forskolin induzierten cAMP-Anstieg verstärkte, konnte kein deutlicher cAMP-Anstieg in den exponierten Zellen festgestellt werden.

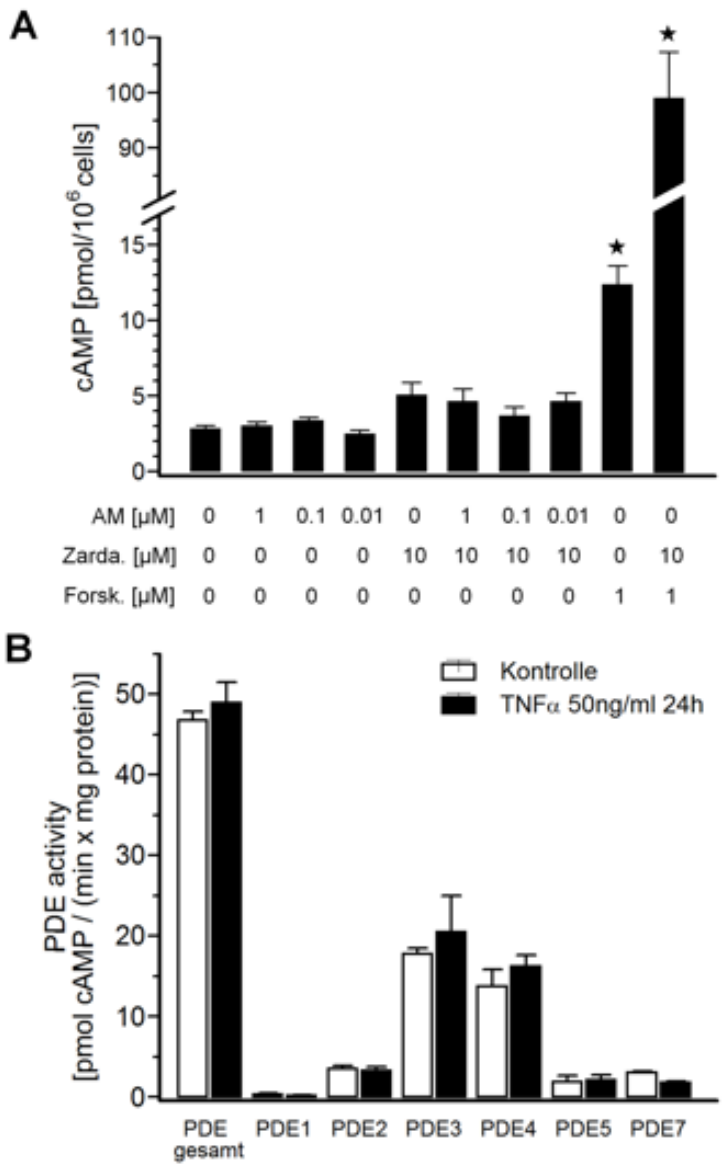

Abb. 10: *cAMP Konzentration und PDE Aktivitätsprofil in CaCo-2 Zellen (A: n=5, B: n=3).(A) Stimulation mit 0.01-0.1 µM AM oder 1 µM Forskolin; Zugabe von 10 µM Zardaverin 15 min vorher. Messung des cAMP-Gehalts nach weiteren 15 min mittels ELISA (B) leere Stäbe: Aktivitätsprofil ohne TNF-α; gefüllte Stäbe: mit 50 ng/ml TNF-α über 24 Stunden. ★ p<0.05 gemessen gegen die Kontrollgruppe. Alle Werte wurden als Mittelwert ± SEM angegeben.*

6.5.2 Durch Hemmung der Phosphodiesterasen verbessert sich die epitheliale Barrierefunktion nicht

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen in der Abbildung 10 B, kommt es zu keinem AM-abhängigen cAMP-Anstieg, was wiederum Einfluss auf die epitheliale Barrierefunktion hätte. Der folgende Versuch zeigt die Permeabilitätsuntersuchung der epithelialen Barriere in Anwesenheit von Zardaverin. Zardaverin hemmt als Inhibitor der Phosphodiesterasen den zellulären cAMP Abbau. Durch eine Hemmung der Phosphodiesterasen kam es zu keiner Verbesserung der epithelialen Barrierefunktion. AM (0.5 µM) konnte alleine den Übertritt von FITC-Dextran reduzieren, wohingegen Zardaverin in Anwesenheit von AM nicht in der Lage war, die Barrierefunktion der Zellen, die mit H_2O_2 exponiert waren, zu verbessern *(Abb. 11A)*. In den

entsprechenden Versuchen bezüglich der transepithelialen elektrischen Widerstände konnten übereinstimmende Beobachtungen gemacht werden *(Abb. 11B).*

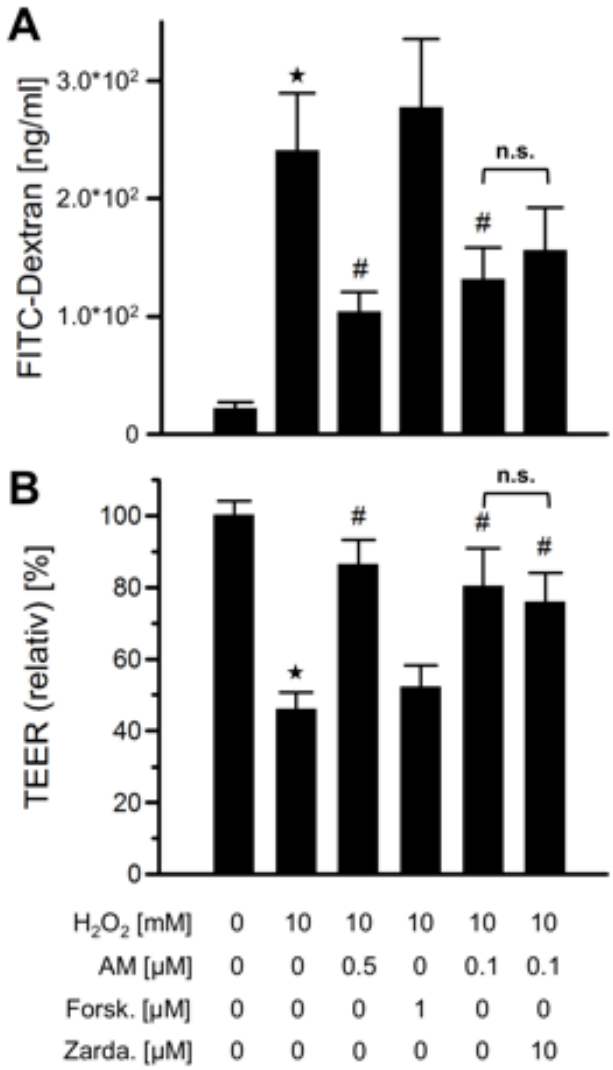

Abb. 11: *Veränderung der epithelialen Barrierestabilisierung durch AM oder Forskolin nach PDE 3/4 Inhibition anhand der FITC-Dextran Konzentration und TEER. Zugabe des PDE-Inhibitors Zardaverin 15 min vor AM (je n=12).*

(A) FITC-Dextran Messung, (B) TEER Messung. ★ p<0.05 getestet gegen die Kontrollgruppe, # p<0.05 getestet gegen die H_2O_2 Gruppe. Alle Werte wurden als Mittelwert ± SEM angegeben.

6.6 Am Kolon der Ratte in der Ussing-Kammer bewirkt die Gabe von AM keine Änderung der epithelialen Permeabilität

Die epitheliale Permeabilität kann anhand der Änderung des elektrischen Widerstands durch Messung des Kurzschlussstroms (short circuit current) gemessen werden. Der gemessene Kurzschlussstrom am Kolon der Ratte in der Ussing-Kammer ist mit der cAMP abhängigen Chloridsekretion am Darm gleichzusetzen (Andres, 1985, Sanchez de Medina, 2002). Nach Applikation von Forskolin, das durch Aktivierung der Isoenzyme eine Erhöhung des intrazellulären cAMP Gehalts bewirkt, kam es zu einem Anstieg des elektrischen Widerstands (short circuit current) um 30%. Der gemessene

Kurzschlussstrom am Kolon der Ratte veränderte sich durch die Gabe von 1 µM AM dagegen nicht (Abb.12).

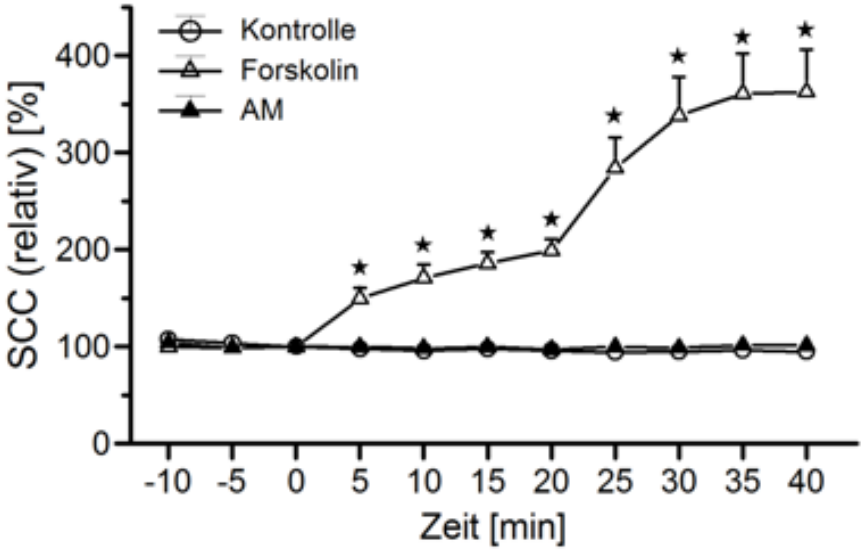

Abb. 12: *Verlauf des short circuit current (SCC) in der Ussing-Kammer am Kolon der Ratte nach Applikation von Forskolin (1 µM) und AM (1 µM) (n=5).*

★ *p<0.05 getestet gegen die Kontrollgruppe. Alle Werte wurden als Mittelwert ± SEM angegeben.*

6.7 Eine Inhibition der Proteinkinasen hat keinen Einfluss auf die Regulation der epithelialen Barrierefunktion

Kinasen wie die Proteinkinase C, die P13-Kinase oder ERK-Kinasen wurden sowohl mit AM als auch mit Permeabilitätssignalen in Verbindung gebracht (Parameswaran, 2000, Nishimatsu, 2001, Okumura, 2004, Dong, 2006). Die Signalwege über die Kinasen die epithelale Barrierefunktion des Darms beeinflussen, sind bekannt (Banan, 2001, Banan, 2003, Banan, 2005, Howe, 2005, McKay, 2007, Yang, 2002 (a)). Daher sollte geprüft werden, ob es durch eine Inhibition der entsprechenden Kinasen zu einer AM-ähnlichen Regulation oder sogar Verbesserung der epithelialen Barrierefunktion des CaCo-2 Monolayers kommt.

H_2O_2 (10 µM) führte zu einem Widerstandsabfall um 60%, welcher nach Applikation von AM (0.1 µM) wieder um mehr als 40% anstieg. Durch Vorinkubierung über 15 Minuten mit den Kinaseinhibitoren Calphostin C (PKC-Inhibitor), Gö 6976 (PKC α/ß Inhibitor), LY 29492 (P13-Kinase Inhibitor), U0126 (ERK Inhibitor) und dem p38

Inhibitor SB 202190 und anschließender Widerstandsmessung trat der Effekt, der bei AM beobachtet wurde, nicht ein *(Abb. 13)*. Unter den gewählten Bedingungen hatten diese Hemmstoffe keinen signifikanten Einfluss auf den transepithelialen elektrischen Widerstand bzw. auf die epitheliale Barrierefunktion.

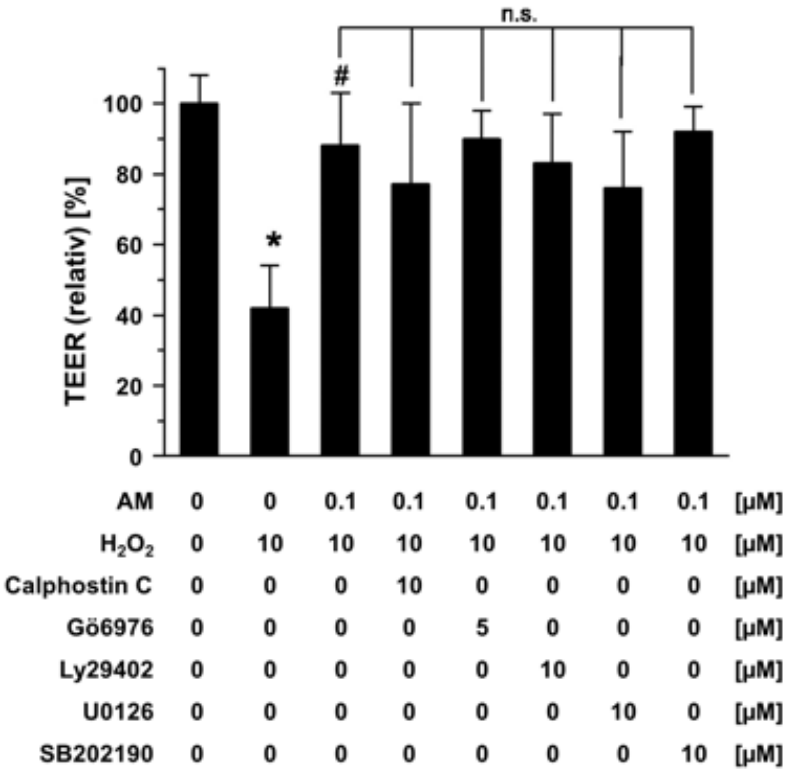

Abb. 13: *Veränderung des relativen TEER nach H_2O_2 Exposition und AM-Applikation und Inhibition der Kinasen durch 15minütige Vorinkubation (n=6). 10 µM Calphostin C (PKC Inhibitor), 5 µM Gö6976 (PKC α/ß Inhibitor), 10 µM Ly29402 (P13 Kinase-Inhibitor), 10 µM U0126 (ERK-Inhibitor), 10 µM SB202190 (p38-Kinaseinhibitor).*
✶ p<0.05 getestet gegen die Kontrollgruppe, # p<0.05 getestet gegen die H_2O_2 Gruppe. Alle Werte wurden als Mittelwert ± SEM angegeben.

7 Diskussion und Zusammenfassung

7.1 Diskussion

7.1.1 Untersuchungen zur epithelialen Permeabilität

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass exogen appliziertes AM die epitheliale Darmbarriere *in vitro, ex vivo* und *in vivo* stabilisieren kann.

Die therapeutische intravenöse Infusion von AM führte bei den *Staphylococcus aureus* α-Toxin exponierten Ratten zu einer reduzierten Translokation des Markermoleküls aus dem Darmlumen in die systemische Zirkulation.

Außerdem verminderte AM eine durch H_2O_2 ausgelöste Widerstandssenkung im Rattenkolon-Modell, sowie den durch α-Toxin und H_2O_2 induzierten Verlust der Barrierefunktion in den CaCo-2 Zellen *in vitro*.

Eine Störung der intestinalen mukosalen Barrierefunktion im Rahmen eines kritischen Krankheitszustandes, wie z.B. in der Sepsis kann die Translokation von Bakterien, Pathogenen und Entzündungsmediatoren aus dem Darmlumen in das umliegende normalerweise sterile Gewebe, sowie in die systemische Zirkulation, erlauben. α-Toxin induzierte bei den Ratten wesentliche Merkmale eines septischen Schocks, wobei es zur Schädigung der intestinalen mukosalen Barriere kam, was sich in einem Anstieg der intestinalen Permeabilität widerspiegelte. Die anschließende therapeutische Gabe von AM führte zu einer Verbesserung der intestinalen epithelialen Barrierefunktion im Tiermodell, was sich in einer singnifikanten Abnahme der FITC-Dextran Konzentration im arteriellen Plasma zeigte. Die Untersuchungen in der Zellkultur erbrachten für die CaCo-2 Zellen übereinstimmende Ergebnisse. Um die stimulusübergreifende Wirkung von AM zu demonstrieren, wurde H_2O_2 zur Simulation der Anwesenheit polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten verwandt, die es aktiv sezernieren und somit das Wirtsgewebe schädigen können. AM wirkte sich auch positiv auf die Stabilisierung der intestinalen epithelialen Barriere aus nach Induktion einer Hyperpermeabilität mit H_2O_2.

7.1.2 Endotheliale Permeabilität

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse vorangegangener Studien, scheint der hauptsächliche Wirkmechanismus von AM in der Sepsis die Stabilisierung der endothelialen Barriereintegrität und somit die Verbesserung der vaskulären Funktion zu sein (Hippenstiel, 2002; Hocke, 2006; Temmesfeld-Wollbrück, 2007; Brell, 2005 (a/b)).

In der Sepsis und im Rahmen einer Entzündungsreaktion ist die Induktion der endothelialen Hyperpermeabilität ein zentrales Ereignis (Kumar, 2009). Die Exposition mit *Staphylococcus aureus* α-Toxin bewirkte in den Untersuchungen von Suttorp et al. eine endotheliale Hyperpermeabilität (Suttorp, 1988; Seeger, 1990). Zahlreiche nachfolgende Studien konnten belegen, dass AM in der Sepsis von Bedeutung ist, indem es die Barrierefunktion des Endothels stabilisieren kann (Hocke, 2006; Temmesfeld-Wollbrück, 2007; Müller-Redetzky, 2012). Hippenstiel et al. untersuchten den Effekt von AM auf die Permeabilität von humanen Endothelzellen der Umbilikalvene (HUVEC), sowie von Endothelzellen der Pulmonalarterie des Schweins. AM verminderte eine durch H_2O_2 induzierte endotheliale Hyperpermaebilität (Hippenstiel, 2002).

Eine durch das gleiche Exotoxin ausgelöste mikrovaskuläre Hyperpermeabilität im Ileum konnte durch Vorinkubierung mit AM aufgehoben werden, und AM verhinderte einen subsequenten Barriereverlust des Endothels im Tiermodell (Brell, 2005 (a/b)). Diese Beobachtungen unterstützen auch die Untersuchungen am isoliert perfundierten Rattenileum von Hocke et al. Durch α-Toxin kam es auch zur endothelialen Barriereschädigung durch eine Abnahme der endothelialen Junktionsproteine, die durch AM sowohl in den Gefäßen des Ileums, als auch in Endothelzellen verhindert werden konnte (Hocke, 2006). In einem ähnlichen Modell und ebenfalls mit α-Toxin als Stimulus zur Auslösung einer Sepsis, konnte die therapeutische AM-Gabe die Überlebensrate der Tiere im septischen Schock verbessern. α-Toxin bewirkte ein Versagen der hämodynamischen Funktionen, die eng mit der vaskulären Hyperpermeabilität korrelierten und AM stabilisierte die endotheliale Barriefunktion, was sich in einem verminderten Austritt eines Markermoleküls in der Lunge, der Leber, den Nieren und im Ileum zeigte (Temmesfeld-Wollbrück, 2007).

Müller et al. beobachteten positive AM-Wirkungen im akuten Lungenversagen und in der Sepsis: Im Tiermodell konnte die Gabe von exogenem AM eine pulmonale Hyperpermeabilität reduzieren. Die endotheliale Barrierefunktion und die Mikrozirkulation konnten stabilisiert werden (Müller, 2010).

Als Behandlung des akuten Lungenversagens als Arzneimittel für seltene Leiden ist AM bereits ausgewiesen worden (Beschluss der Kommission vom 9.6.2010, EMA/COMP/104704/2010). Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse von Müller-Redetzky et al. zeigten ebenfalls positive therapeutische AM-Effekte in einem Pneumococcus Pneumonie-Modell. In diesem Tiermodell stellte die mechanische Beatmung die

Lungenfunktion wieder her. *Staphylococcus aureus* besiedelt Oberflächen und stellt somit für den intensivpflichtigen Patienten eine zusätzliche Infektionsquelle dar. Das beatmungsinduzierte Lungenversagen (VILI) trägt seinerseits zu einer erhöhten Mortalität und Morbidität im ARDS bei (ARDS Network, 2000, Müller, 2010). AM bewirkte eine Permeabilitätsabnahme in der Lunge, und konnte einen weiteren Anstieg der Permeabilität hervorgerufen durch die zusätzlich zur Pneumonie durchgeführte MV fast vollständig verhindern. Die Gabe von AM zeigte sich ferner therapeutisch wirksam gegenüber einer MV- induzierten Schädigung von Leber und Darm. (Müller-Redetzky, 2014).

7.1.3 Sepsis

AM zeigte neben positiven Wirkungen auf die endotheliale Barrierestabilisierung auch positive Effekte in Versuchsmodellen der polymikrobiellen Sepsis: Gonzalez-Rey et al. zeigten in einem Sepsis-Tiermodell, welches durch die intraperitoneale Injektion von Lipopolysacchariden eine Sepsis durch gramnegative Bakterien simulierte, dass AM vor einer letalen Endotoxämie schützen konnte, indem es die inflammatorische Zellinfiltration und die intravaskuläre Gerinnung verhinderte (Gonzalez-Rey, 2006).
Die Untersuchungen von Yang et al. zeigten, dass AM und AMBP-1 den Übergang von der hyperdynamen in die hypoaktive zweite Phase der Sepsis verhindern kann und die Entzündungsantwort durch proinflammatorische Zytokine herabsetzt (Yang S, 2002 (a/b)).

7.1.4 AM-Wirkungen am Darm

Während einer Sepsis ist die häufigste Komplikation im Darm die Dysfunktion der mukosalen Barrierefunktion und die Darmbarriere ist daher von pathophysiologischer Bedeutung in der Sepsis (Ammori, 1999; Deitch, 2012).
Eine Funktionsstörung der endothelialen Barriere und die proinflammatorische Aktivierung von Endothelzellen führt zu Störungen der Mikrozirkulation. Eine Störung der Mikrozirkulation ist kennzeichnend für ein Organversagen im septischen Schock. Die gestörte Vasomotorik und eine vaskuläre endotheliale Hyperpermeabilität begünstigen ein multiples Versagen peripherer Organe durch eine subsequente Minderperfusion (Lipinska-Gediga, 2016).

Am Darm führt das zu einer mukosalen Hypoxie und zu einem Verlust der mukosalen Barrierefunktion. Die mukosale Hypoxie schädigt das Darmepithel (Horton, 1992; Russel, 1995).

Darüber hinaus kommt es in der Sepsis zu einer massiven Produktion von AM in der Mukosa des Darms (Zhou, 2001). Das Gefäßsystem im Splanchnikusgebiet scheint in hohem Maße ansprechbar auf AM zu sein (Santiago, 1995, Okamura, 1997, Brain, 2004, Brell, 2005 a/b). Durch septische Mikrozirkulationsstörungen kommt es im Darm zu einer Perfusionsumverteilung zugunsten der großen Gefäße und zu einer verminderten Villusperfusion (Schmidt, 1996).

Studien dieser Arbeitsgruppe zeigten, dass AM eine durch das gleiche Exotoxin ausgelöste mukosale Hypoperfusion am Darm aufhob, und darüber hinaus die intramuskuläre Hämoglobinoxygenierung stabilisieren konnte (Brell, 2005 a/b). α-Toxin bewirkte eine vaskuläre Hyperpermeabilität und führte zu einem Schock. Die vaskuläre Hyperpermeabilität bewirkte eine Minderperfusion und eine Reduzierung der Sauerstoffversorgung der Mukosa des Darms (Brell, 2005 (a)).

In dem in dieser Arbeit verwendeten Ligated Loop Modell simulierte α-Toxin bei den Ratten einen septischen Schock, wodurch es zur Schädigung der intestinalen mukosalen Barrierefunktion kam, die durch die therapeutische Gabe von AM über die Schwanzvene verbessert werden konnte. Unter Berücksichtigung der bisher durchgeführten Studien und der Untersuchungen in dieser Arbeit zur AM-Wirkung auf den Darm, scheint AM die Barrierefunktion des Darms auf verschiedenen Ebenen stabilisieren zu können: Über eine unmittelbare Stabilisierung der Barrierefunktion der Epithelzellen, über eine Verbesserung der intramukosalen Perfusion und Hämoglobinoxygenierung in der Mikrozirkulation (Brell, 2005 (a)) und durch Optimierung der Durchblutung im Splanchnikusgebiet.

Zum Zeitpunkt der Untersuchungen zu dieser Arbeit war über den genauen Mechanismus und die möglichen Effekte von α-Toxin auf die epitheliale Barrierefunktion *in vivo* und *in vitro* wenig bekannt, und waren ausschließlich auf das Endothel fokussiert. Ein möglicher Wirkmechanismus könnte die Beeinträchtigung der Mikrovaskularisation im Darm sein und dadurch eine Schädigung des Epithels durch eine schlechte Sauerstoffversorgung der Mukosaschicht („letzte Wiese des kapillären Wegs“). Kwak et al. konnten später zeigen, dass α-Toxin die Barriereintegrität der CaCo-2 Zellen beeinträchtigte, was sich in einer Abnahme des TEER zeigte. Darüber hinaus zeigten die Versuche an CaCo-2 Zellen von Kwak et al. aber auch, dass α-

Toxin die epitheliale Barriereintegrität möglicherweise durch eine Reduzierung der Expression von junktionalen Proteinen (ZO-1, ZO-3, E-Cadherin) und durch einen Anstieg von freiem Ca^{2+} in den CaCo-2 Zellen schädigt (Kwak, 2012). Diese Effekte auf die Permeabilität und die junktionalen Proteine waren hochselektiv basolateral wirksam. Diese Untersuchungen unterstützen die Hypothese, dass freies α-Toxin im Blut die intestinale epitheliale Barriere schädigen kann.

7.2 Signalvermittlung von AM

Der durch AM vermittelte Anstieg des sekundären Botenstoffes cAMP scheint ein zentrales Ereignis im Signalübertragungsweg von AM zu sein (Hinson, 2000; Poyner, 2002; Beltowsky, 2004). In den Untersuchungen, die zur Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion gemacht wurden, konnte ein cAMP-Anstieg in der Vermittlung der AM-Wirkung beobachtet werden (Hippenstiel, 2002, Brell, 2005 a/b, Temmesfeld, 2007).
Eine cAMP-unabhängige Wirkungsweise von AM konnte auch in der positiv inotropen Funktionsverbesserung am Herzen gezeigt werden (Szokodi, 1998), obwohl cAMP in der kardiovaskulären AM-Wirkung das hauptsächliche Signalmolekül zu sein scheint (Brain, 2004; Cheung, 2004). Eine weitere cAMP-unabhängige Wirkung von AM und ebenfalls in Epithelzellen, beobachteten kürzlich Castellani et al. (Castellani, 2016): In Epithelzellen des Thymus der Ratte verringerte AM einen durch Lipopolysaccharide induzierten Anstieg von Zytokinen (IL-6) unabhängig von cAMP-Mechanismen.

Die Beobachtungen, die in dieser Arbeit zur Permeabilitätsstabilisierung von AM am Epithel gemacht wurden, lassen es fraglich erscheinen, dass die barrierestabilisierende AM-Wirkung am Epithel über einen Anstieg von intrazellulärem cAMP vermittelt wird: Es konnte kein Effekt auf den cAMP-Gehalt in den AM exponierten CaCo-2 Zellen beobachtet werden, obwohl die Zellen in Anwesenheit des Adenylylcyclase-Stimulus Forskolin mit einem starken cAMP-Anstieg reagierten.

Bezüglich der Signifikanz dieser Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass es sich bei den CaCo-2 Zellen um Tumorzellen handelt, die sich rasch erneuern und verändern können. Bestimmte Zelleigenschaften, sowie die Exprimierung von Transporteigenschaften sind somit evtl. nicht unbedingt gewährleistet. Da es sich um Zellen des Kolonepithels handelt, sind andere Darmabschnitte wie z.B. der Dünndarm

hier nicht berücksichtigt worden. Ferner könnte ebenfalls eine Veränderung bezüglich der Dosierung und des Zeitpunktes der AM-Gabe eine Rolle gespielt haben.
Um zu sehen, ob im Darm überall die gleichen cAMP- unabhängigen barrierestabilisierenden AM-Effekte eintreten, sind daher auch Versuche an primären Darmepithelzellen verschiedener Darmabschnitte, sowie an Darmpräparaten nach Operationen, anzustreben.

Phosphodiesterasen metabolisieren cAMP (und cGMP) in das biologisch inaktive Nukleosid-5´-monophosphat. Sie werden in 11 Genfamilien eingeteilt, wobei jede Familie unterschiedliche Isoformen und Verbindungsvarianten aufweist (Bender, 2006; Conti, 2007). Da zu dem Isoenzymmuster für Phosphodiesterasen für Darmepithelzellen zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch keine Ergebnisse vorlagen, analysierten wir in dieser Arbeit erstmalig das PDE-Isoenzymmuster für die CaCo-2 Zellen. Es zeigte sich eine Prädominanz von PDE 3 und PDE 4 in den Zellen, die rund 80% der Gesamt-cAMP Abbaukapazität darstellen und beide cAMP effizient hydrolisieren können. Die Aktivität der PDEs 2, 5 und 7 war sehr gering.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen in Endothelzellen, kam es hier zu keiner Veränderung der PDE-Aktivität und damit einhergehender Barriereschädigung durch TNF-α (Seybold, 2005). Basierend auf dem PDE-Isoenzymmuster der CaCo-2 Zellen untersuchten wir den AM-Effekt auf den intrazellulären cAMP-Gehalt durch kombinierte Inhibition der PDE 3 und 4 mit dem zweifach selektiven PDE 3/4 Inhibitor Zardaverin. Obwohl Zardaverin den durch Forskolin induzierten cAMP-Anstieg in den Zellen deutlich verstärkte, bewirkte AM keinen Anstieg des intrazellulären cAMP-Gehalts. Dadurch konnte die Effektivität der PDE-Inhibition zwar nachgewiesen werden, dennoch kam es unter dem kombinierten Einsatz von AM und Zardaverin zu keiner weiteren Steigerung des intrazellulären cAMP-Gehalts. Diese Ergebnisse stützen die Vermutung, dass der AM-Effekt auf die epitheliale Barrierefunktion nicht über cAMP vermittelt wird.

In der Annahme, dass cAMP-Signale in subzellulären Kompartimenten wirksam sein könnten und sich dadurch nicht zwingend auf das gesamtzelluläre cAMP auswirken müssen, oder ein lokaler oder geringer cAMP-Anstieg nicht vom ELISA erfasst werden konnte, untersuchten wir die AM-Wirkung in Anwesenheit des PDE 3/4 Inhibitors auf

die CaCo-2-Barrierefunktion im Permeabilitätsmodell als funktionelle Kontrolle. Es zeigte sich auch hier, dass eine Hemmung des cAMP-Abbaus durch Zardaverin die barrierestabiliserende AM-Wirkung nicht verstärken konnte.
Diese Daten stehen im Gegensatz zu den Daten, die bereits für andere Zellen, sowie für die Endothelzellen erhoben werden konnten (Suttorp, 1993; Hippenstiel, 2002; Hagi-Pavli, 2004; Seybold, 2005). Durch die Inhibition der PDE's kam es in Endothelzellen zu einem verstärkten AM-abhängigen cAMP-Anstieg, aus dem gleichzeitig eine Stabilisierung der Barrierefunktion resultierte. Außerdem konnte Forskolin, das einen starken cAMP-Anstieg in den CaCo-2 Zellen bewirkte, die Barriere in den Zellen nicht stabilisieren (wohl aber die des Endothels, Suttorp, 1993).

Um weitere cAMP-abhängige Wirkungen auszuschließen, verifizierten wir diese Befunde auch in einem anderen Modell durch Messung des Kurzschlussstroms am Kolon der Ratte in der Ussing-Kammer, der mit der cAMP-abhängigen Chloridsekretion im Darm gleichzusetzen ist (Andres, 1985; Sanchez de Medina, 2002). Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Holger Martens am Physiologischen Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät in Berlin durchgeführt. In diesen Versuchen wurde zum einen die cAMP-abhängige Chloridsekretion unter dem Einfluss von Forskolin und AM und zum anderen der Einfluss von AM auf den elektrischen Widerstand der Kolonmukosa untersucht. Forskolin bewirkte einen hochsignifikanten Anstieg der epithelialen Chloridsekretion, während es durch AM zu keiner Änderung der basalen Chloridsekretion kam. Hinsichtlich der epithelialen Permeabilität, die anhand der Änderung des elektrischen Widerstands erfasst wurde, ergab sich, dass AM auch im Ussing-Kammermodell an nativer Kolonmukosa den H_2O_2 induzierten Anstieg der Permeabilität vollständig hemmen konnte.

Zusammenfassend suggerieren diese erhobenen Daten, dass die AM-Wirkung auf die epitheliale Barrierefunktion unabhängig von cAMP-abhängigen Mechanismen ist. Auch durch gleichzeitige Inhibition der PDE's konnte mit AM kein vermehrtes cAMP Signal gemessen werden, so dass ein fokales cAMP-Signal möglich sein kann, da es außer der cAMP-Steigerung zu keiner zusätzlichen Senkung der Permeabilität kam. Fernandez de Arcaya et al. diskutieren im Zusammenhang mit Untersuchungen zur AM-Wirkung im Rattendarm auf die Absorption von Zuckern, dass ein cAMP-Anstieg

möglicherweise beteiligt sein könnte. In dieser Studie wurde die cAMP-Abhängigkeit allerdings nicht untersucht (Fernandez de Arcaya, 2005).

In der Annahme, dass Kinasen bei der Vermittlung des Signalweges für AM eine Rolle spielen, prüften wir, ob es durch die Inhibition der entsprechenden Kinasen zu einer AM-ähnlichen Regulation oder Verbesserung der epithelialen Barrierefunktion kommt. Die komplexen dynamischen Strukturen, so wie die Tight-junctions oder das Aktin-Zytoskelett regulieren die Dichtigkeit der epithelialen Darmbarriere (Berkes, 2003; Hollande, 2005; Shen, 2006). AM ist an der Aktivierung einer Vielzahl von Signalwegen einschließlich der Proteinkinase C (Dong, 2006), der Phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K) (Nishimatsu, 2001; Okamura, 2004) und ERK-Kinasen (Parameswaran, 2000) beteiligt. Studienergebnisse indizieren, dass diese gleichfalls die Regulation der epithelialen Darmbarriere beeinflussen (Banan, 2001; Banan, 2003; Banan, 2005; Howe, 2005; Yang, 2005; McKay, 2007).
Die Inhibition dieser Kinasen (PKC, PI-3K, ERK, p38) durch spezifische chemische Inhibitoren konnte den positiven Effekt von AM auf die epitheliale Barrierefunktion jedoch nicht verschlechtern.
Im experimentellen *in vitro* Versuchsaufbau mit den CaCo-2 Zellen zeigte sich weder in der anschließenden Messung des TEER, noch anhand des gemessenen FITC-Dextran-Konzentrationsgradienten eine deutliche Änderung der AM-Wirkung. Die Regulation der epithelialen Schlussleisten und die damit zusammenhängende Kontraktion der Zellen ist hoch komplex (Fink, 2005; Hollande, 2005), und es sind evtl. verschiedene Kinasen gleichzeitig an der Regulation beteiligt, was die hier gemachten Beobachtungen erklären könnte. Darüber hinaus könnten auch andere Kinasen, wie z.B. die ROCK-Kinase (Rho-associated coiled-coil forming kinase) (Wu, 2006; Moyer, 2007) oder Kinasen der Src-Familie (Basuroy, 2003), die hier nicht untersucht wurden, eine Rolle spielen. Um letztendlich die cAMP-unabhängige Wirkungsweise von AM auf die epitheliale Permeabilität des Darms entschlüsseln zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen in evtl. folgenden Studien mit beispielsweise einem large-scale siRNA screen für Kinasen.

7.3 Zusammenfassung

Zusammenfassend und bezüglich der Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit, zeigen die Ergebnisse eine protektive Wirkung von AM auf die epitheliale

Barrierefunktion des Darms *in vivo* und *in vitro*. In den Analysen zur PDE-Aktivität in CaCo-2 Zellen konnten PDE 3 und 4 als die vorrangig cAMP-katabolisierenden Enzyme identifiziert werden. Durch AM kam es, gegensätzlich zu den Untersuchungen an Endothelzellen, weder zu einem cAMP-Anstieg, noch konnte die durch AM ausgelöste Stabilisierung der Barrierefunktion in Anwesenheit von PDE 3 und 4 Inhibitoren weiter verstärkt werden. Zudem konnte eine durch Forskolin erbrachte cAMP-Erhöhung die Barrierefunktion der CaCo-2 Zellen nicht stabilisieren, welches die Hypothese stützt, dass cAMP-unabhängige Signale an der Stabilisierung der epithelialen Barriere des Darms beteiligt sind.

7.4 Therapeutische Ansätze und Ausblick

In den letzten Jahren ist die wichtige Rolle des Darms als Schockorgan zunehmend Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Dagegen finden die klassischen Schockorgane (Lunge, Leber, Niere) als wichtige Zielorgane im Rahmen inflammatorischer Veränderungen wie z.B. in der Sepsis schon lange Beachtung.

In der Intensivmedizin sind Sepsis und Multiorganversagen nach wie vor die Haupttodesursachen (SepNet Critical Care Trials Group, 2016). Es ist daher unabdingbar, durch weitere Studien in der Forschung voranzukommen um die Mortalität der Sepsis zu senken. Die zunehmende invasive Diagnostik und Multimorbidität der Patienten, sowie das vermehrte Auftreten resistenter Keime erschweren die Diagnose und Behandlung der Sepsis (Pittet, 2004; Huttner, 2013; Tsertsvazde, 2016). Es stehen nach wie vor keine therapeutischen Möglichkeiten zur Verfügung, die intestinale Barriere zu stabilisieren, vor allem in der Sepsis und im septischen Schock. Dazu kommt noch die Tatsache, dass in den allgemeinen Bewertungssystemen zum klinischen Verlauf einer Sepsis, wie z.B. der SOFA-score (Ferreira, 2001) der Darm als mögliches Zielorgan keine ausreichende Bewertung findet (Gatt, 2015). Die Dysfunktion der mukosalen Darmbarriere scheint aber ein wesentlicher Faktor bezüglich der Prognose der Sepsis zu sein, und sollte daher stärker in den Fokus der Sepsisbehandlung gestellt werden. An der steigenden Anzahl von Publikationen in den letzten Jahren zeigt sich aber, dass die Suche nach therapeutischen Möglichkeiten zur Stabilisierung der intestinalen Barriere immer mehr in den Fokus der Untersuchungen rückt. Dazu zählen unter anderem Untersuchungen zur Wiederherstellung des Gleichgewichts der intestinalen Mikroflora durch Transplantation von fekaler Mikrobiota (Wei, 2016), und die Plasmadiafiltration zur

Reduktion einer inflammatorischen Schädigung der intestinalen Mukosabarriere duch Eliminierung von Entzündungsmediatoren (Li, 2016). Eine mögliche therapeutische Wirkamkeit von AM bezüglich entzündlicher Darmerkrankungen (inflammatory bowel disease, IBD) zeigten tierexperimentelle Studien: Im Tiermodell mit Morbus Crohn und Colitis ulzerosa war AM antiinflammatorisch wirksam (Gonzalez-Rey, 2006; Ashizuka, 2005). Kürzlich veröffentlichte Daten von Ashizuka et al. zeigten erstmals einen therapeutischen Effekt von AM an einem ausgewählten Patientenkollektiv. Die therapeutische intravenöse Infusion von AM verbesserte die mukosale Regeneration und bewirkte eine Neovaskularisation der ulzerativen Läsionen in der Colitis (Ashizuka, 2016).

AM könnte in Zukunft eine mögliche therapeutische Option in der Sepsis darstellen. Dabei ist allerdings zu bedenken, dass AM als starker Vasodilatator hypotensiv wirkt und somit auch erhebliche Nebenwirkungen haben kann.
Als prognostischer Marker erwies sich AM bereits als wirksam: erhöhte AM-Spiegel im Plasma korrelierten mit einer steigenden Mortalität in der Sepsis, und zirkulierendes Propeptid von AM (pro-AM) könnte als Verlaufsmarker dienen, die Mortalität und die Schwere einer Sepsis abzuschätzen (Ueda, 1999; Guignant, 2009, Cicuendez, 2015). Andaluz-Ojeda et al. zeigten kürzlich, dass Pro-AM in der Sepsis oder im septischen Schock von prognostischer Bedeutung sein könnte. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen pro-AM und dem SOFA-score in der ersten Woche nach Diagnosestellung in allen zu evaluierenden Zeitpunkten festgestellt werden (Andaluz-Ojeda, 2015). Bezüglich einer Korrelation von erhöhtem AM in der Sepsis sind aber auch widersprüchliche Ergebnisdaten in Einklang zu bringen: Erhöhte endogene AM-Konzentrationen korrelieren mit einer erhöhten Mortalität in der Sepsis und die exogene Gabe von AM führte zu einer Verbesserung der Sterberate. Struck et al. fanden allerdings heraus, dass monoklonale AM-Antikörper wiederum die Sepsis induzierte Mortalität herabsetzen konnten (Struck, 2013). Bezüglich einer therapeutischen Gabe von AM scheint möglicherweise der genaue Zeitpunkt der Gabe, als auch die Dosierung eine wichtige Rolle zu spielen. Die klinischen Phasen der Sepsis (hyperdyname und hypoaktive Phase) scheinen in diesem Zusammenhang ebenfalls einen möglichen positiven Effekt der AM-Wirkung zu beeinflussen (Kox, 2014).

Insgesamt erhält das regulatorische Peptidhormon AM immer mehr Aufmerksamkeit als neue therapeutische Option bei schweren Entzündungen. Dazu zählen, um hier nur einige Bereiche zu nennen, unter anderem die Behandlung des akuten Lungenversagens, der Sepsis, von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, von malignen Erkrankungen, sowie von neurologischen und kardialen Erkrankungen.

8 Literaturverzeichnis

1. Allaker RP, Zihni C, Kapas S. An investigation into the antimicrobial effects of adrenomedullin on members of the skin, oral, respiratory tract and gut microflora. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;23:289-293.

2. Allaker RP, Kapas S. Adrenomedullin and mucosal defence: Interaction between host and microorganism. *Regul Pept* 2003;112:147-152.

3. Alarcon P, Gonzalez M, Castro E. The role of gut microbiota in the regulation of the immune response. *Rev Med Chil* 2016;144:910-916.

4. Al-Sadi R, Guo S, Ye D. TNF-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier is regulated by ERK 1/2 activation of Elk-1. *Am J Path* 2013;183:1871-1884.

5. Ammori BJ, Leeder PC, King RF, Barclay GR, Martin IG, Larvin M, McMahon MJ. Early increase in intestinal permeability in patients with severe acute pancreatitis: correlation with endotoxemia, organ failure, and mortality. *J Gastrointest Surg* 1999;3:252-262.

6. Andaluz-Ojeda D, Cicuendez R, Calvo D, Nogales L, Munoz MF, Bueno P, Eiros JM, Gandia F, bermejo-Martin JF. Sustained value of proadrenomedullin as mortality predictor in severe sepsis. *Jounal of Infection* 2015;71:136-139.

7. Ando K, Ito Y, Kumada M, Fujita T. Oxidative stress increases adrenomedullin mRNA levels in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res* 1998;21:187-191.

8. Andres H, Rock R, Bridges RJ, Rummel W, Schreiner J. Submucosal plexus and electrolyte transport across rat colonic mucosa. *J Physiol* 1985;364:310-312.

9. Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med* 2001;29:109-116.

10. ARDS Network, Brower RG, Matthay MA, Morris A, Schoenfeld D, Thompson BT, Wheeler A. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000;342:1301-1308.

11. Artursson P. Epithelial transport of drugs in cell culture: a model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (CaCo-2) cells. *J Pharma Sci* 1990;79:476-482.

12. Ashizuka S, Ishikawa N, Kato J, Yamaga J, Inatsu H, Eto T, Kitamura K. Effect of adrenomedullin administration on acetic acid-induced colitis in rats. *Peptides* 2005;26:2610-2615.

13. Ashizuka S, Inagaki-Ohara K, Kuwasako K, Kato J, Inatsu H, Kitamura K. Adrenomedullin treatment reduces intestinal inflammation and maintains epithelial barrier function in mice administered dextran sulphate sodium. *Microbiol Immunol* 2009;53:573-581.

14. Ashizuka S, Inatsu H, Kita T, Kitamura K. Adrenomedullin therapy in patients with refractory ulcerative colitis: A case series*. Dig Dis Sci* 2016;61:872-880.

15. Atkinson KJ, Rao RK. Role of protein tyrosine phosphorylation in acetaldehyde-induced disruption of epithelial tight junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:1280-1288.

16. Badami CD, Senthil M, Caputo FJ. Mesenteric lymph duct ligation improves survival in a lethal shock model. *Shock* 2008;30:680-685.

17. Baker RD, Baker SS, La Rosa K. Polarized CaCo-2 cells. Effect of reactive oxygen metabolites on enterocyte barrier function. *Dig Dis Sci* 1995;40:510-518.

18. Banan A, Fields JZ, Talmage DA, Zhang Y, Keshavarzian A. PKC-ß1 mediates EGF protection of microtubules and barrier of intestinal monolayers against oxidants. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:833-847

19. Banan A, Fields JZ, Talmage DA, Zhang L, Keshavarzian A. PKC-zeta is required in EGF protection of microtubules and intestinal barrier integrity against oxidant injury. *Am J Physiol* 2002;282:794-808.

20. Banan A, Fields JZ, Zhang LJ, Shaikh M, Farhadi A, Keshavarzian A. Zeta isoform of protein kinase C prevents oxidant-induced nuclear factor-kappaB activation and I-kappaB alpha degradation: a fundamental mechanism for epidermal growth factor protection of the microtubule cytoskeleton and intestinal barrier integrity. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307:53-66.

21. Banan A, Zhang LJ, Farhadi A, Fields JZ, Shaikh M, Forsyth CB, Choudhary S, Keshavarzian A. Critical role of the atypical lambda isoform of protein kinase C (PKC-lambda) in oxidant-induced disruption of the microtubule cytoskeleton and barrier function of intestinal epithelium. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312:458-471.

22. Basuroy S, Sheth P, Kuppuswamy D, Balasubramanian S, Ray RM, Rao RK. Expression of kinase-inactive c-Src delays oxidative stress-induced disassembly and accelerates calcium-mediated reassembly of tight junctions in the CaCo-2 cell monolayer. *J Biol Chem* 2003;278:11916-11924.

23. Bauer AC, Schwabe U. An improved assay of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterases with QAE-Sephadex columns. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1980;311:193-198.

24. Bauldry SA, Elsey KL, Bass DA. Activation of NADPH oxidase and phospholipase D in permeabilized human neutrophils. Correlation between

oxidase activation and phosphatidic acid production. *J Biol Chem* 1992;267:25141-25152.

25. Bell D, McDermott BJ: Intermedin (adrenomedullin-2): a novel counter-regulatory peptide in the cardiovascular and renal systems. *British Journal of Pharmacology* 2008;153:247-S262.

26. Beltowsky J, Jamroz A. Adrenomedullin- what do we know 10 years since ist discovery? *Pol J Pharmacol* 2004;65:5-27.

27. Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 2006;58:488-520.

28. Bene del R, Lazzeri C, Barletta G, Vecchiarino S, Guerra CT, Franchi F, la Villa G. Effects of low-dose adrenomedullin on cardiac function and systemic haemodynamics in man. *Clin Physiol* 2000;20:457-465.

29. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastriontestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979;23:403-411.

30. Bergin SP, Holland TL, Fowler VG Jr., Tong SY. Bacteremia, Sepsis, and infective Endocarditis associated with Staphylococcus aureus. *Curr Top Microbio Immunol* 2015;1-34.

31. Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD, Hecht G. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 2003; 52:439-451.

32. Berube BJ, Bubeck Wardenburg J. Staphylococcus aureus alpha-toxin: Nearly a century of intrigue. *Toxins* 2013;5:1140-1166.

33. Bhakdi S, Muhly M, Mannhardt U, Hugo F, Klapettek K, Mueller-Eckhardt C, Roka L. Staphylococcus alpha-toxin promotes blood coagulation via attack on human platelets. *J Exp Med* 1988;168:527-542.

34. Bhakdi S, Tranum-Jenssen J. Alpha-toxin of Staphylococcus aureus. *Microbiol Rev* 1991;55:733-751.

35. Bilkslager A, Moeser AJ, Gookin JL, Jones SL, Odle J. Restoration of Barrier Function in Injured Intestinal Mucosa. *Physiol Rev* 2007;87:545-564.

36. Bischoff SC, Giovanni B, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke JD, Serino M, Tilg H, Watson A, Wells JM. Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology* 2014;14:189.

37. Bondow B, Faber M, Wojta K, Walker E, Battle M. E-Cadherin is required for intestinal morphogenesis in the mouse. *Develop Biology* 2012;371:1-12.

38. Brain SD, Grant AD. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev* 2004;84:903-934.

39. Brandtzaeg P. The gut as a communicator between environment and host: immunological consequences. *Eur J Pharmacol* 2011;668:16-32.

40. Brell B, Hippenstiel S, David I, Pries AR, Habazettl A, Schmeck B, Suttorp N, Temmesfeld-Wollbrück B. Adrenomedullin treatment abolishes ileal mucosal hypoperfusion induced by staphylococcus aureus alpha-toxin: an intravital microscopic study on an isolated rat ileum. *Crit Care Med* 2005;33:2810-2816 (a).

41. Brell B, Temmesfeld-Wollbrück B, Altzschner I, Frisch E, Schmeck B, Hocke AC, Suttorp N, Hippenstiel S. Adrenomedullin reduces Staphylococcus aureus alpha-toxin-induced rat Ileum microcirculatory damage. *Crit Care Med* 2005;33:819-826 (b).

42. Bunton D, Petrie M, Hillier C, Johnston F, McMurray J. The clinical relevance of adrenomedullin: a promising profile? *Pharm and Therap* 2004;103:179-201.

43. Burnet FM. The exotoxins of Staphylococcus pyogenes aureus. *J Pathol Bacteriol* 1929;32:717-734.

44. Caron KM, Smithies O. Extreme hydrops fetalis and cardiovascular abnormalities in mice lacking a functional adrenomedullin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:615-619.

45. Carrico CJ, Meakins JL, Marshall JC, Fry D, Mayer RV. Multiple-organ-failure syndrome. The gastrointestinal tract: the “motor“ of MOF. *Arch Surg* 1986;121:196-208.

46. Castellani G, Paliuri G, Orso G, Paccagnella N, D’Amore C, Facci L, Cima F, Caicci F, Palatini P, Bova S, De Martin S. An intracellular adrenomedullin system reduces IL-6 release via a NFkB-mediated, cAMP-independent transcriptional mechanism in rat thymic epithelial cells. *Cytokine* 2016;88:136-143.

47. Ceppa EP, Fuh KC, Buckley GB. Mesenteric hemodynamic response to circulatory shock. *Curr Opin Crit Care* 2003;9:127-132.

48. Chen ML, Pothoulakis C, LaMont JT. Proteinkinase C signaling regulates ZO-1 translocation and increased paracellular flux of T84 colonocytes exposed to Clostridium difficile toxin. *A J Biol Chem* 2002;277:4247-4254.

49. Chen C, Wang P, Su Q. Myosin light chain kinase mediates intestinal barrier disruption following burn injury. *PloS ONE* 2012;7:34946.

50. Cheung BM, Hwang IS, Li CY, O WS, Tsang KW, Leung RY, Kumana CR, Tang F. Increased adrenomedullin expression in lungs in endotoxaemia. *J Endocrinol* 2004;181:339-345.

51. Cheung BM, Li CY, Wong LY. Adrenomedullin: its role in the cardiovascular system. *Semin Vasc Med* 2004;4:129-134.

52. Christ-Crain M, Morgenthaler MG, Struck J, Harbarth S, Bergmann A, Müller B. Mid-regional pro-adrenomedullin as a prognostic marker in sepsis: an obsevational study. *Crit Care* 2005;9:816-824.

53. Cicuendez R, Nogales L, Bueno A, Gonzalez de Zarate S, Calvo D, Andres C, Bueno P, Zarca E, Munoz MF, Bermejo J, Eiros JM, Gandia F, Andaluz-Ojeda D. Sustained prognostic value of proadrenomedullin in severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2015;3:792.

54. Clark JA, Coopersmith CM. Intestinal crosstalk: A new paradigm for understanding the gut as the motor of critical illness. *Shock* 2007;28:384-393.

55. Clark JA, Clark AT, Hotchkiss RS, Buchmann TG, Coopersmith CM. Epidermal growth factor treatment decreases mortality and is associated with improved gut integrity in sepsis. *Shock* 2008;30:36-42.

56. Conti M, Beavo J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem* 2007;76:481-511.

57. Cummings JH, Antoine JM, Azpiroz F, Bourdet-Sicard R, Brandtzaeg P, Calder PC, Gibson GR, Guarner F, Isolauri E, Pannemans D, Shortt C, Tuijtelaars S, Watzl B: PASSCLAIM-gut health and immunity. *Eur J Nutr* 2004;43:118-173.

58. Cunningham KE, Turner JR. Myosin light chain kinase: pulling the strings of epithelial tight junction function. *Ann NY Acad Sci* 2012;1258:34-42.

59. Deitch EA. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg* 1992;216:117-134.

60. Deitch EA. Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut. What is important in human beings? *Surgery* 2002;131:241-244.

61. Deitch EA, Xu D, Krise VL. Role of the gut in the development of injury and shock induced SIRS and MODS: the gut-lymph hypothesis, a review. *Front Biosci* 2006;11:520-528.

62. Deitch EA. Gut lymph and lymphatics: a source of factors leading to organ injury and dysfunction. *Ann N.Y. Acad Sci* 2010;103-111.

63. Deitch EA. Gut-origin sepsis: evolution of a concept. *Surgeon* 2012;10:350-356.

64. Derikx JP, van Waardenburg DA, Thuijls G, Willigers HM, Koenraads M, van Bijnen AA, Heineman E, Poeze M, Ambergen T, van Ooij A, van Rhijn LW, Buurman WA. New insight in loss of gut barrier during major non-abdominal surgery. *PLoS One* 2008;3:3954.

65. Dominguez JA, Vithayathil PJ, Khailova L, Lawrance CP, Samoch AJ, Jung E, Leathersich AM, Dunne WM, Coopersmith CM. Epidermal growth factor improves survival and prevents intestinal injury in a murine model of pseudomonas aeruginosa pneumonia. *Shock* 2011;36:381-389.

66. Dong JM, Leung T, Manser E, Lim L: CAMP-induced morphological changes are counteracted by the activated RhoA small GTPase and the Rho kinase ROK alpha. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:22554-22562.

67. Dong F, Taylor MM, Samson WK, Ren J. Intermedin (adrenomedullin-2) enhances cardiac contractile function via a protein kinase C- and protein kinase A-dependent pathway in murine ventricular myocytes. *J Appl Physio* 2006;101:778-784.

68. Dupont A, Heinbockel L, Brandenburg K, Hornef MW. Antimicrobial peptides and the enteric mucus layer act in concert to protect the intestinal mucosa. *Gut Microbes* 2014;5:761-765.

69. Elke G, van Zanten AR, Lemieux M, McCall M, Jeejeebhoy KN, Kott M, Jiang X, Day AG, Hexland DK. Enteral versus parenteral nutrition in critical ill patients: an updated systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Crit Care* 2016;20:117.

70. Fernandez de Arcaya I, Lostao MP, Martinez A, Berjon A, Barber A. Effect of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide on sugar transport in the rat intestine. *Regul Pept* 2005;129:147-154.

71. Ferreira FL, Bota DP, Bross A, Mélot C, Vincent JL. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *JAMA* 2001;286:1754-1758.

72. Fink MP. Intestinal epithelial hyperpermeability: update on the pathogenesis of gut mucosal barrier dysfunction in critical illness. *Curr Opin Crit Care* 2003;9:143-151.

73. Fink MP, Delude RL. Epithelial barrier dysfunction: a unifying theme to explain the pathogenesis of multiple organ dysfunction at the cellular level. *Crit Care Clin* 2005;21:177-196.

74. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K. International Forum of Acute Care Specialists. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;193:259-272.

75. Flexner S. Peritonitis caused by the invasion of the micrococcus Lanceolatus from the intestine. *John Hopkins Hospital Bull* 1859;6:64-67.

76. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1977;59:221-226.

77. Fowler D, wang P. The cardiovascular response in sepsis: proposed mechanisms of the beneficial effect of adrenomedullin and ist binding protein. *Int J Mol Med* 2002;9:443-449.

78. Frainkel A. Ueber peritoneale infection. *Wien Klein Wochenschr* 1891;4:241,265,285.

79. Gastmeier P, Sohr D, Geffers C, Nassauer A, Dettenkofer M, Ruden H. Occurence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in German intensive care units. *Infection* 2002;30:198-202.

80. Gatt M, MacFie J. Bacterial translocation in surgical patients. In: Recent advances in surgery, vol. 28. London: *The Royal Society of Medicine Press Limited* 2005;23-23.

81. Gatt M. The role of the gut in sepsis. *Infection* 2015;33:534-541.

82. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Varela N, Robledo G, Delgado M. Urocortin and adrenomedullin prevent lethal endotoxemia by down-regulating the inflammatory response. *Am J Pathol* 2006;168:1921-1930.

83. Grimminger F, Rose F, Sibelius U, Meinhardt M, Potzsch B, Spriestersbach R, Bhakdi S, Suttorp N, Seeger W. Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial endotoxins Escherichia coli hemolysin and staphylococcal alpha-toxin. *J Immunol* 1997;159:1909-1916.

84. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:3-20.

85. Guignant C, Voirin N, Venet F, Poitevin F, Malcus C, Bohe J, Lepape A, Monneret G. Assessment of pro-vasopressin and pro-adrenomedullin as predictors of 28-day mortality in septic shock patients. *Intensive Care Med* 2009;35:1859-1867.

86. Haag LM, Hofmann J, Kredel LI, Holzem C, Kühl AA, Taube ET, Schubert S, Siegmund B, Epple HJ. Herpes simplex virus Sepsis in a young woman with Crohn's Disease. *J Crohns Colitis 2015;1169-1173.*

87. Hagner S, Knauer J, Haberberger R, Goke B, Voigt K, McGregor G. Calcitonin-receptor-like receptor is expressed on gastrointestinal immune cells. *Digestion* 2002;66:197-203.

88. Hagli-Pavli E, Farthing PM, Kapas S. Stimulation of adhesion molecule expression in human endothelial cells (HUVEC) by adrenomedullin and corticotrophin. *Am J Physiol* 2004;286:239-246.

89. Harois A, Baudry N, Huet O, Kato H, Lohez M, Ziol M, Duranteau J, Vicaut E. Synergistic deleterious effect of hypoxemia and hypovolemia on microcirculation in intestinal villi. *Crit Care Med* 2013;41:376-384.

90. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (CaCo-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1989;96:736-749.

91. Hildebrandt A, Pohl M, Bhakdi S. Staphylococcus aureus alpha-toxin. Dual mechanism of binding to target cells. *J Biol Chem* 1991;266:17195-17200.

92. Hilgers AR, Conradi RA, Burton PS. CaCo-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharm Res* 1990;7:902-910.

93. Hinson JP, Kapas S, Smith DM. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocrin Rev* 2000;21:138-167.

94. Hippenstiel S, Witzenrath M, Schmeck B, Hocke A, Krisp M, Krüll M, Seybold J, Seeger W, Rascher W, Schütte H, Suttorp N. Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability. *Circ Res* 2002;91:618-625.

95. Hirata Y, Mitaka C, Sato K, Nagura T, Tsunoda Y, Amaha K, Marumo F. Increased circulating adrenomedullin, a novel vasodilatory peptide, in sepsis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:1449-1453.

96. Hocke AC, Temmesfeld-Wollbrück AC, Schmeck B, Berger K, Frisch EM, Witzenrath M, Brell B, Suttorp N, Hippenstiel S. Perturbation of endothelial junction proteins by Staphylococcus aureus alpha-toxin: Inhibition of endothelial gap formation by adrenomedullin. *Histochem Cell Biol* 2006;126:305-316.

97. Hofbauer K, Schoof E, Kurtz A, Sandner P. Inflammatory cytokines stimulate adrenomedullin expression through nitric oxide-dependent and -independent pathways. *Hypertension* 2002;39:161-167.

98. Hollande F, Shulkes A, Baldwin GS. Signaling the junctions in gut epithelium. *Sci STKE* 2005;e13, 2005.

99. Horton JW. Alterations in intestinal permeability and blood flow in a new model of mesenteric ischemia. *Circ Shock* 1992;36:134-139.

100. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348:138-150.

101. Howe KL, Reardon C, Wang A, Nazli A, McKay DM. Transforming growth factor-beta regulation of epithelial tight junction proteins enhances barrier function and blocks enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7-induced increased permeability. *Am J Pathol* 2005;167:1587-1597.

102. Huttner A, Harbarth S, Carlet J, Cosgrove S, Goossens H, Holmes A, Jarlier V, Voss A, Pittet D. Antimicrobial resistance: a global view from the 2013 World

Healthcare-Associated Infections Forum. *Antimicrob Resist Infect Control* 2013;2:31.

103. Ishimitsu T, Kojima M, Kangaea K, Hino J. Genomic structure of the Adrenomedullin Gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;203:631-639.

104. Isumi Y, Minamino N, Kubo A, Nishimoto N, Yoshizaki K, Yoshioka M, Kangawa K, Matsuo H. Adrenomedullin stimulates interleukin-6 production in Swiss 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;244:325-331

105. Jepson MA. Disruption of epithelial barrier function by H2O2: distinct responses of Caco-2 and Madin-Darby canine kidney (MDCK) strains. *Cell Mol Biol* 2003;101-112.

106. Jong de PR, Gonzàlez-Navajas JM, Jansen NJ. The digestive tract of the origin of systemic inflammation. *Crit Care* 2016;20:279.

107. Jorgensen VL, Nielsen SL, Espersen K, Perner A. Increased colorectal permeability in patients with severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2006;32:1790-1796.

108. Juaneda C, Dumont Y, Chabot J, Fournier A, Quirion R. Adrenomedullin receptor binding sites in rat brain and peripheral tissues. *Eur J Pharmacol* 2003;474:165-174.

109. Keita AV, Söderholm JD. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterol Motil* 2010;22:718-733.

110. König J, Wells J, Cani PD, Garcia-Rodenas CL, MacDonald T, Mercenier A, Whyte J, Troost F, Brummer RJ. Human intestinal barrier function in health and disease. *Clin and Transl Gastroenterol* 2016;7:196.

111. Kiela PR, Ghishan FK. Ion transport in the intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 2009;25:87-89.

112. Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Eto T. Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;194:720-725.

113. Kishikawa H, Nishida I, Ichikawa H, Kaida S, Morishita T, Miura S, Hibi T. Lipopolysaccharides stimulate adrenomedullin sythesis in intestinal epithelial cells: release kinetics and secretion polarity. *Peptides* 2009;30:906-912.

114. Klingensmith N.J., Coopersmith C.M. The gut as the motor of Multiple Organ Dysfunction in Critical Illness. *Crit Care Clin* 2016;32: 203-212.

115. Kohno M, Hanehira T, Kano H, Horio T, Yokokawa K, Ikeda M, Minami M, Yasunari K, Yoshikawa J. Plasma adrenomedullin concentrations in essential hypertension. *Hypertension* 1996;27:102-107.

116. Kox M, Pickkers P. Adrenomedullin: ist double-edged sword during sepsis slices yet again. *Intensive Care Med Exp* 2014;2:1.

117. Kravtsov KM, Hwang IS, Tang F. The inhibitory effect of adrenomedullin in the rat ileum: crosstalk with beta-3-adrenoceptor in the serotonin-induced muscle contraction. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308:241-248.

118. Krüll M, Dold C, Hippenstiel S, Rosseau S, Lohmeyer J, Suttorp N. Escherichia coli hemolysin and Staphylococcus aureus alpha-toxin potently induce neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells. *J Immunol 1996*;4133-4140.

119. Kumar P, Shen Q, Pivetti CD, Lee ES, Wu MH, Yuan SY. Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. *Expert Rev Mol Med* 2009;30:11.

120. Kunzelmann K, Mall M. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev* 2002;82:245-289.

121. Kwak YK, Vikström E, Magnusson KE, Vecsey-Semjen B, Colque-Navarro P, Möllby R. The Staphylococcus aureus alpha-toxin perturbs the barrier function in Caco-2 epithelial cell monolayers by altering junctional integrity. *Infect Immun* 2012;80:1670-1680.

122. Laupland KB, Gregson DB, Zygun DA, Doig CJ, Mortis G, church DL. Severe bloodstreem infections: a population-based assessment. *Crit Care Med* 2004;32:992-997.

123. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. (2003). International Sepsis Definitions Conference. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Medicine* 29:530-538.

124. Li XM, Liu JF, Lu JD, Zhu Y, Kuang DW, Xiang JB, Sun P, Wang W, Xue J, Gu Y, Hao CM. Plasmadiafiltration ameliorating gut mucosal barrier dysfunction and improving survival in porcine sepsis models. *Intensive Care Med* 2016;4:31.

125. Liao SB, Cheung KH, Cheung MP, To YT, O WS, Tang F. Adrenomedullin increased the short-circuit current in the pig oviduct through chloride channels via the CGRP receptor: mediation by cAMP and calcium ions but not by nitric oxide. Biol Reprod 2013;89:99.

126. Lipinska-Gediga M. Sepsis and septic shock- is a microcirculation a main player? *Anaestesiol Intensive Ther* 2016;48:261-265.

127. Lowy FD. Medical progress: Staphylococcus aureus infections. *N. Engl. J. Med*. 1998;339:520-523.

128. Luissint AC, Parkos CA, Nusrat A. Inflammation and the intestinal barrier: Leukozyte-epithelial cell Interactions, cell junction remodeling, and mucosal repair. *Gastroenterol* 2016;151:616-632.

129. Magnotti LJ, Deitch EA. Burns, bacterial translocation, gut barrier function, and failure. *J Burn Care Rehabil* 2005;26:383-391.

130. Marcel G. The role of the gut in sepsis. *Surgery* 2015;33:534-541.

131. Martìnez-Herrero S, Martìnez A. Adrenomedullin regulates intestinal physiology and pathophysiology. *Domest Anim Endocrinol* 2016;56:66-83.

132. Matheson PJ, Mays MP, Hurt RT, Harris PD, Garrison RN. Adrenomedullin is increased in the portal circulation during chronic sepsis in rats. *Am J Surg* 2003;186:519-525.

133. McKay DM, Watson JL, Wang A, Caldwell J, Presott D, Ceponis PM, Di L, Lu J. Phosphatidylinositol 3'-kinase is a critical mediator of interferon-gamma-induced increases in enteric epithelial permeability. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;320:1013-1022.

134. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM. RAMP's regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 1998;393:333-339.

135. Meakins JL, Marshall JC. The gastrointestinal tract: The motor of MOF. *Arch Surg* 1986;121:197-201.

136. Meunier V, Bourrié M, Berger Y, Fabre G. The human intestinal epithelial cell line CaCo-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol and Toxicol* 1995;11:187-194.

137. Mittal R, Coopersmith CM. Redefining the gut as the motor of critical illness. *Trends Mol Med* 2014;20:214-223.

138. Moreira AP, Texeira TF, Ferreira AB, Peluzio Mdo C, Alfenas Rde C. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br J Nutr* 2012; 108:801-809.

139. Moyer RA, Wendt MK, Johanesen PA, Turner JR, Dwinell MB. Rho activation regulates CXCL12 chemokine stimulated actin rearrangement and restitution in model intestinal epithelia. *Lab Invest* 2007;87:807-817.

140. Müller HC, Witzenrath M, Tschernig T, Gutbier B, Hippenstiel S, Santel A, Suttorp N, Rosseau S. Adrenomedullin attenuates ventilator-induced lung injury in mice. *Thorax* 2010;65:1077-1084.

141. Müller-Redetzky HC, Will D, Hellwig K, Kummer W, Tschernig T, Pfeil U, Paddenberg R, Menger MD, Kershaw O, Gruber AD, Weissmann N, Hippenstiel S, Suttorp N, Witzenrath M. Mechanical ventilation drives pneumococcal pneumonia into lung injury and sepsis in mice: protection by adrenomedullin. *Crit Care* 2014;18:73.

142. Nagoya N, Miyatake K, Kyotani S, Nishikimi T, Nakanishi N, Kangawa K. Pulmonary vasodilatator response to adrenomedullin in patients with pulmonary hypertension. *Hypertens Res* 1996;26:141-146.

143. Nakata K, Sato N, Hirakawa K, Asakura T, Suzuki T, Zhu R, Asano T, Koike K, Ohno Y, Yokota H. Pattern recognition analysis of proton nuclear magnetic resonance spectrs of extracts of intestinal epithelial cells under oxidative stress. *J of Ni Med School* 2014;4:236-247.

144. Nishimatsu H, Suzuki E, Nagata D, Moriyama M, Satonaka H, Walsh K, Sata M, Kangawa K, Matsuo H, Goto A, Kitamura T, Hirata Y. Adrenomedullin induces endothelium-dependent vasorelaxation via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway in rat aorta. *Circ Res* 2001;89:63-70.

145. Nishio K, Akai Y, Murao Y, Doi N, Ueda S, Tabuse H, Miyamato S, Dohi K, Minamino N, Shoji H, Kitamura K, Kangawa K, Matsuo H. Increased plasma concentrations of adrenomedullin correlate with relaxation of vascular tone in patients with septic shock. *Crit Care Med* 1997;25:953-957.

146. Nunbhakdi-Craig V, Machleidt T, Ogris E, Belloto D, White CL, Sontag E. Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex. *J Cell Biol* 2002;158:967-978.

147. Odenwald MA, Turner JR. Intestinal permeability defects: it is time to treat? *Clin Gastroenterol hepatol* 2013;11:1075-1083.

148. Okamura T, Zhang JX, Kangawa K, Toda N. Inhibition by adrenomedullin of the adrenergic neurogenic response in canine mesenteric arteries. *Jpn J Pharmacol* 1997;73:259-261.

149. Okumura H, Nagaya N, Itoh T, Okano I, Hino J, Mori K, Tsukamoto Y, Ishibashi-Ueda H, Miwa S, Tambara K, Toyokuni S, Yutani C, Kangawa K. Adrenomedullin infusion attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Circulation* 2004;109:242-248.

150. Otamiri T, Sjodahl R, Tagesson C. An experimental model for studying reversible intestinal ischemia. *Acta Chir Scand* 1987;153:51-56.

151. Pape HC, Dwenger A, Regel G, Auf'm Kolck M, Gollub F, Wisner D, Sturm JA, Tscherne H. Increased gut permeability after multiple trauma. *Br J Surg* 1994;81:850-852.

152. Parameswaran N, Nambi P, Hall CS, Brooks DP, Spielmann WS. Adrenomdullin decreases extracellular signal-regulated kinase activity through an increase in protein phosphatase -2A activity in mesangial cells. *Eur J Pharmacol* 2000;388:133-138.

153. Pastores SM, Katz DP, Kvetan V. Splanchnic ischemia and gut mucosal injury in sepsis and the multiple organ dysfunction syndrome. *AM J Gastroenterol* 1996;91:1697-1710.

154. Phua J, Ngerng W, See K, Tay C, Kiong T, Lim H, Chew M, Yip H, Han A, Khalizah H, Capistrano R, Lee K, Mukhopadhyay A. Characteristics and outcomes of culture-negative versus culture-positive severe sepsis. *Crit Care* 2013;17:202

155. Pinto M, Robineleon S, Appay MD. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line CaCo-2 in culture. *Biol Cell* 1983;47:323-330.

156. Pio R, Martinez A, Elsasser TH, Cuttitta F. Presence of immunoreactive adrenomedullin in human and bovine milk. *Peptides* 2000;21:1859-1863.

157. Pittet D. Challenges, treatment strategies and clinical progression of MRSA bacteremia. *Presse Med* 2004;33:2.

158. Poyner D, Sexton P, Marshall I, Smith D, Quirion R, Born W, Muff R, Fischer J, Foord S. International Union of Pharmacology. XXXII. The Mammalian Calcitonin Gene-related peptides, Adrenomedullin, Amylin and Calcitonin Receptors*. Pharmacological Reviews* 2002;54:233-246.

159. Pugin J. Adrenomedullin: a vasodilatator to treat sepsis? *Crit Care* 2014;18:152.

160. Ramachandran G. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis. *Virulence* 2014;231-218.

161. Rao RK, Baker RD, Baker SS, Gupta A, Holycross M. Oxidant-induced disruption of intestinal epithelial barrier function: role of protein tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol* 1997;273:812-823.

162. Rao R. Oxidative stress-induced disruption of epithelial and endothelial tight junctions. *Front Biosci* 2008;13:7210-7226.

163. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M; Early Goal-Dircted therapy Collaborative Group. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001;345:1368-1377.

164. Rose F, Dahlem G, Guthmann B, Grimminger F, Maus U, Hanze J, Duemmer N, Grandel U, Seeger W, Ghofrani HA. Mediator generation and signaling events in alveolar epithelial cells attacked by S.aureus alpha-toxin. *Am J Physiol* 2002;282:207-214.

165. Rosero O, Ònody P, Kovàcs T, Molnàr D, Lotz G, Tòth S, Turòczi Z, Fülöp A, Garbaisz D, Harsànyi L, Szijàrtò A. Impaired intestinal mucosal barrier upon ischemia-reperfusion: „patching holes in the shield with a simple surgical method. *Biomed Res Int* 2014;210901.

166. Russel DH, Barreto JC, Klemm K, Miller TA. Hemorrhagic shock increases gut macromolecular permeability in the rat. *Shock* 1995;4:50-55.

167. Sakata J, Asada Y, Shimokubo T, Kitani M, Inatsu H, Kitamura K, Kangawa K, Matsuo H, Sumiyoshi A, Eto T. Adrenomedullin in the gastrointestinal tract. Distribution and gene expression in rat and augmented gastric adrenomedullin after fasting. *J Gastroenterol* 1998;33:828-834.

168. Samson WK, Murphy T, Schell DA. A novel vasoactive peptide, adrenomedullin, inhibits pituitary adrenocorticotropin release. *Endocrinology* 1995;136:2349-2352.

169. Sanchez de Medina F, Perez R, Martinez-Augustin O, Gonzalez R, Lorente MD, Galvez J, Zarzuelo A. Disturbances of colonic ion secretion in inflammation: role of the enteric nervous system and cAMP. *Pflügers Arch* 2002;444:378-388.

170. Sanchez de Medina F, Romero-Calvo I, Mascaraque C, Martinez-Augustin O. Intestinal inflammation and mucosal barrier function. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20:2394-2404.

171. Santiago JA, Garrison E, Purnell WL, Smithe RE, Champion HC, Coy DH, Murphy WA, Kadowitz PJ. Comparison of responses to adrenomedullin and adrenomedullin analogs in the mesenteric vascular bed of the cat. *Eur J Pharmacol* 1995;272:115-118.

172. Satoh F, Takahashi K, Murakami O, Totsune K, Sone M, Ohneda M, Sasano H, Muori T. Immuncytochemical localization of adrenomedullin-like immunoreactivity in the human hypothalamus and the adrenal gland. *Neurosci lett* 1996;203:207-210.

173. Schmidt H, Secchi A, Wellmann R, Bach A, Böhrer H, Gebhard MM, Martin E. Effect of endotoxemia on intestinal villus microcirculation in rats. *J Surg Res* 1996;61:521-526.

174. Schweinburg FB, Frank HA, Frank ED, Heimberg F, Fine J. Transmural migration of intestinal bacteria during peritoneal irrigation in uremic dogs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1949;71:150-153.

175. Schulz K, Sommer O, Jargon D, Utzolino S, Clement HW, Strate T, von Dobschuetz E. Cytokine and radical inhibition in septic intestinal barrier failure. *J Surg Res* 2015;193:831-840.

176. Seeger W, Bauer M, Bhakdi S. Staphylococcal alpha-toxin elicits hypertension in isolated rabbit lungs. Evidence for thromboxane formation and the role of extracellular calcium. *J Clin Invest* 1984;74:849-858.

177. Seeger W, Birkenmeyer RG, Ermert L, Suttorp N, Bhakdi S, Duncker HR. Staphylococcal alpha-toxin-induced vascular leakage in isolated perfused rabbit lungs. *Lab Invest* 1990;63:341-349.

178. Senthil M, Brown M, Xu DC, Lu Q, Feketeova E, Deitch EA. Gut-lymph hypothesis of systemic inflammatory response syndrome/multiple organ dysfunction syndrome: validating studies in a porcine model. *J Trauma* 2006;60:958-965.

179. Senthil M, Watkins A, Barlos D. Intravenous injection of trauma-hemorrhagic shock mesenteric lymph causes lung injury that is dependent upon activation of the inducible nitrit oxide synthase pathway. *Ann Surg* 2007;246:822-830.

180. SepNet Critical Care Trials Group. Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study. *Intensive Care Med* 2016;42:1980-1989.

181. Seybold J, Thomas D, Witzenrath M, Boral S, Hocke AC, Burger A, Hatzelmann A, Tenor H, Schudt C, Krull M, Schutte H, Hippenstiel S, Suttorp N. Tumor necrosis factor-alpha-dependent expression of phosphodiesterase 2: role in endothelial hyperpermeability. *Blood* 2005;105:3569-3576.

182. Shen L, Turner JR. Role of epithelial cells in initiation and propagation of intestinal inflammation. Eliminating the static: tight junction and dynamics exposed. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:577-582.

183. Shichiri M, Hirata Y. Regulation of cell growth and apoptosis by adrenomedullin. *Hypertens Res* 2003;26:9-14.

184. Shindo T, Kurihara H, Maemura K, Kurihara Y, Kuhaki T, Izumida T, Minamino N, Ju KH, Morita H, Ohashi Y, Kumada M, Kangawa K, Nagai R, Yazaki Y. Hypotension and resistance to lipopolysaccharide-induced shock in transgenic mice over expressing adrenomedullin in their vasculature. *Circulation* 2000;101:2309-2316.

185. Shindo T, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ishiwaka-Shindo Y, Shimoyama N, Iinuma N, Arai T, Miyagawa S. Regulation of adrenomedullin and its family peptide by RAMP system-lessons from genetically engineered mice. *Curr Protein Pept Sci* 2013;14:347-357.

186. Shoji H, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Endotoxin markedly elevates plasma concentration and gene transcription of adrenomedullin in rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;215:531-537.

187. Sibelius U, Grandel U, Buerke M, Mueller D, Kiss L, Kraemer HJ, Braun-Dullaeus R, Haberbosch W, Seeger W, Grimminger F. Staphylococcal alpha-toxin provokes coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility in perfused rat hearts: role of thromboxane generation. *Circulation* 2000;101:78-85.

188. Singer M, Deutschmann CS, Seymour CW. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315:801-810.

189. Sogbe-Diàz ME, Diàz-Lopèz EE. Adrenomedullin in the kidney: physiology and pathophysiology. *Invest Clin* 2016;66-76.

190. Spaulding AR, Satterwhite EA, Lin YC, Smith-Chuang O, Frank KL, Merriman JA, Schaefers MM, Yarwood JM, Peterson ML, Scjlevert PM. Comparison of

Staphylococcus aureus strains for ability to cause infective endocarditis and lethal sepsis in rabbits. *Front Cell Infect Microbiol* 2012;2:18.

191. Steinberg JP, Clark CC, Hackman BO. Nosocomial and community-acquired Staphylococcus aureus bacteremias from 1980-1993: impact of intravascular devices and methicillin resistance. *Clin Infect Diss* 1996;23:255-259.

192. Struck J, Tao C, Morgenthaler NG, Bergmann A. Identification of an Adrenomedullin precursor fragment in plasma of sepsis patients. *Peptides* 2004;25:1369-1372.

193. Struck J, Hein F, Karasch S, Bergmann A. Epitope specificity of anti-adrenomedullin antibodies determines efficacy of mortality reduction in a cecal ligation and puncture mouse model. *Intensive Care Med Exp* 2013;1:3.

194. Sugo S, Minamiro N, Kangawa K. Endothelial cells actively sythesize and secrete adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;201:1160-1166.

195. Sugo S, Minamino N, Shoji H, Kangawa K, Kitamura K, Eto T, Matsuo H. Interleukin-1, tumor necrosis fasctor and lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;207:25-32.

196. Suttorp N, Seeger W, Dewein E, Bhakdi S, Roka L. Staphylococcus alpha-toxin-induced PG12 production in endothelial cells: role of calcium. *Am J Physiol* 1985;248:127-134.

197. Suttorp N, Seeger W, Zucker-Reimann J, Roka L, Bhakdi S. Mechanism of leukotriene in polymorphnuclear leukocytes by staphylococcal alpha-toxin. *Infect Immun* 1987;55:104-110.

198. Suttorp N, Hessz T, Seeger W, Wilke A, Koob R, Lutz F et al.: Bacterial exotoxins and endothelial permeability for water and albumin in vitro. *American Journal of Physiology* 1988;255:368-376.

199. Suttorp N, Weber U, Welsch T, Schudt C. Role of phosphodiesterases in the regulation of endothelial permeability in vitro. *J Clin Invest* 1993;91:1421-1428.

200. Suttorp N, Hippenstiel S, Fuhrmann M, Krull M, Podzuweit T. Role of nitric oxide and phosphodiesterase isoenzyme II for reduction of endothelial hyperpermeability. *Am J Physiol* 1996;270:778-785.

201. Suttorp N, Hessz T, Fuchs T, Seeger W, Drenckhahn D, Neuhof H. Effects of bacterial toxins and calcium-ionophores on endothelial permeability *in vitro*. *Prog Clin Biol Res* 1998;308:127-131.

202. Szokodi I, Kinnunen P, Tavi P, Weckström M, Tòth M, Ruskoaho H. Evidence for cAMP-independent mechanisms mediating the effects of adrenomedullin, a new inotropic peptide. *Circulation* 1998;97:1062-1070.

203. Takata F, Dohgu S, Nishioku T, Takahashi H, Harada E, Makino I, Nakashima M, Yamauchi A, Kataoka Y. Adrenomedullin-induced relaxation of rat brain

pericytes is related to the reduced phosphorylation of myosin light chain through the cAMP/PKA signaling pathway. *Neurosci Lett* 2009;449:71-75.

204. Temmesfeld-Wollbrück B, Brell B, David I, Dorenberg M, Adolphs J, Schmeck B, Suttorp N, Hippenstiel S. Adrenomedullin reduces vascular hyperpermeability and improves survival in rat septic shock. *Intensice Care Med* 2007;33:703-710.

205. Temmesfeld-Wollbrück B, Hocke AC, Suttorp N, Hippenstiel S. Adrenomedullin and endothelial barrier function. *Thromb Haemost* 2007;98:944-951.

206. Thompson WJ, Brooker G, Appleman MM. Assay of cyclic nucleotide phosphodiesterases with radioactive substrates. *Methods Enzymol* 1974;38:205-212.

207. Tsertsvazde A, Royle P, Seedat F, Cooper J, Crosby R, McCarthy M. Community-onset sepsis and its public health burden: a systematic review. *Syst Rev* 2016;5:81.

208. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:285-293.

209. Turner JR, Rill BK, Carlson SL, Carnes D, Kerner R, Mrsny RJ, Madara JL. Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation. *Am J Physiol* 1997;273:1378-1385.

210. Turner JR. Intestinal mucosa barrier function in health and disease. *Immunology* 2009;9:799-807.

211. Ueda S, Nishio K, Minamino N. Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Am J Resp Crit Care Med* 1999;160:132-136.

212. Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 1951;23:110-127.

213. Valeva A, Walev I, Pinkernell M, Walker B, Bayley H, Palmer M, Bhakdi S. Transmembrane beta-barrel of staphylococcal alpha-toxin forms in sensitive but not in resistent cells. *Proc natl Acad Sci* USA 1997;94:11607-11611.

214. Walmrath D, Scharmann M, Konig R, Pilch J, Grimminger F, Seeger W. Staphylococcal alpha-toxin induced ventilation-perfusion mismatch in isolated blood-free perfused rabbit lungs. *J Appl Physiol* 1993;74:1972-1980.

215. Wang P, Zhou M, Ba ZF, Cijoffi WG, Chaudry IH. Up-regulation of the novel potent vasodilatory peptide adrenomedullin during polymicrobial sepsis. *Shock* 1998;10:118-122.

216. Wang P. Adrenomedullin in sepsis and septic shock. *Shock* 1998;10:383-384.

217. Wang P. Adrenomedullin and cardiovascular responses in sepsis. *Peptides* 2001;22:1835-1840.

218. Washimine H, Asada Y, Kitamura K, Ichiki Y, Hara S, Yamamoto Y, Kangawa K, Sumiyoshi A, Eto T. Immunhistochemical identification of adrenomedullin in human, rat and porcine tissue. *Histochem Cell Biol* 1995;103:251-254.

219. Watson AJ, Askew JN, Sandle GI. Characterization of oxidant injury to an intestinal cell line (HT-29) by hydrogen peroxide. *Gut* 1994;35:1575-1581.

220. Wei Y, Yang J, Wang J, Yang Y, Huang J, Gong H, Cui H, Chen D. Successful treatment with fecal microbiota transplantation in patients with multiple organ dysfunction syndrome and diarrhea following severe sepsis. *Crit Care* 2016;20:332.

221. Westphal M, Sander J, Van Aken H, Ertmer C, Stubbe HD, Booke M. Role of adrenomedullin in the poathogenesis and treatment of cardiovascular dysfunctions and sepsis. *Anaesthesist* 2006;55:171-178.

222. White MM, Samson WK. A possible relationship between brain-derived adrenomedullin and oxytocin in the regulation of sodium balance. *J Endocrinol* 2009;203:253-262.

223. Wilke GA, Bubeck Wardenburg J. Role of a desintegrin and metalloprotease 10 in staphylococcus aureus alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:13473-13478.

224. Wilson G, Hassan I, Dix C. Transport and permeability properties of human CaCo-2 cells: an in vitro model of the intestinal epithelial cell barrier. *J Control Release* 1990;11:25-40.

225. Wu SS, Jacamo RO, Vong SK, Rozengurt E. Differential regulation of Pyk2 phosphorylation at Tyr-402 and Tyr-580 in intestinal epithelial cells: roles of calcium, Src, Rho kinase, and the cytoskeleton. *Cell Signal* 2006;18:1932-1940.

226. Yang R, Harada T, Li J, Uchiyama T, Han Y, Englert JA, Fink MP. Bile modulates intetinal epithelial barrier function via an extracellular signal related kinase 1/2 dependent mechanism*. Intensive Care Med* 2005;31:709-717.

227. Yang S, Zhou M, Chaudry IH, Wang P. The role of lipopolysaccharide in stimulating adrenomedullin production during polymicrobial sepsis. *Biochem Biophys Acta* 2001;1537:167-174.

228. Yang S, Zhou M, Fowler DE, Wang P. Mechanisms of the beneficial effect of adrenomedullin and adrenomedullin-binding protein-1 in sepsis: down-regulation of proinflammatory cytokines. *Crit Care Med* 2002;30:2729-2735 (a).

229. Yang S, Zhou M, Chaudry IH, Wang P. Novel approach to prevent the transition from the hyperdynamic phase to the hypodynamic phase of sepsis: role of adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1 in sepsis. *Ann Surg* 2002;236:625-633 (b).

230. Ye J, Tsukamoto T, Sun A. A role for intracellular calcium in tight junction reassembly after ATP-depletion-repletion. *Am J Physiol* 1999;277:524-532.

231. Zhas A, Bird MD, Ramirez L. Inhibition of long myosin light chain kinase activation alleviates intestinal damage after binge ethanol exposure and burn injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;303:705-712.

232. Zheng B, Cantley LC. Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:819-822.

233. Zhou M, Chaudry IH, Wang P. The small intestine is an important source of adrenomedullin release during polymicrobial sepsis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;281:654-660.

9 Danksagung

Bei Prof. Norbert Suttorp bedanke ich mich für die Möglichkeit, auf diesem interessanten Gebiet in der Medizinischen Klinik mit dem Schwerpunkt Infektiologie/Pneumologie promovieren zu können, und für die hervorragenden Arbeitsbedingungen im medizinischen Labor der Klinik.

Bei Prof. Stefan Hippenstiel bedanke ich mich für die Überlassung des Themas. Besonderer Dank gilt Prof. Stefan Hippenstiel auch für die hilfreiche Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit, sowie für seine Geduld und guten Ratschläge.

Frau Dr. Bettina Temmesfeld-Wollbrück danke ich für die fachliche Betreuung während der Versuchsdurchführungen.

Bei Herrn Dr. Bernhard Brell bedanke ich mich ganz besonders für die Betreuung während der gesamten praktischen Arbeit im Labor und für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft.

Prof. Holger Martens danke ich für die Unterstützung bei den Versuchsreihen an der Ussing-Kammer.

Ich danke den Mitarbeitern des Forschungslabors für die vertrauensvolle Zusammenarbeit.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich sowohl im Studium, als auch während der Arbeit im Labor stets moralisch und finanziell unterstützt haben.

Ich danke meinem Mann, der mich immer wieder dazu ermuntert hat, diese Arbeit fertigzustellen. Und meinen drei Kindern.

10 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Corinna von Carlowitz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Die Wirkung von Adrenomedullin auf die epitheliale Permeabilität des Darms *in vivo* und *in vitro*, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -*www.**icmje**.org*) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Corinna von Carlowitz, geb. zu Dohna hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1: Temmesfeld-Wollbrück B, Brell B, **zu Dohna C**, Dorenberg M, Hocke AC, Martens H, Klar J, Suttorp N, Hippenstiel S. Adrenomedullin reduces intestinal epithelial permeability in vivo and in vitro. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2009; 297:G43-51.

Beitrag im Einzelnen:

Bestimmung intestinale Barrierefunktion Ganztier, Permeabilität von CaCo2-Zellen, Untersuchungen zur Rolle von Adrenomedullin (AM) darauf, AM induzierte Bildung von cAMP und Bedeutung von Phosphodiesterasen, Kinaseuntersuchungen mittels Hemmstoffen, Auswertung der Primärdaten, statistische Untersuchung.

Unterschrift des der Doktorandin

11 Lebenslauf: Corinna von Carlowitz

Anmerkung: *Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.*

12 Publikation Originalarbeit

Temmesfeld-Wollbrück B, Brell B, **zu Dohna C***, Dorenberg M, Hocke AC, Martens H, Klar J, Suttorp N, Hippenstiel S. Adrenomedullin reduces intestinal epithelial permeability in vivo and in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297(1):43-51.

**Bemerkung: zu Dohna ist mein Mädchenname*