

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

DISSERTATION

***Integritätsstörung endothelialer Junctionsproteine durch
Staphylococcus aureus alpha-Toxin
-Stabilisierung durch Adrenomedullin***

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Katharina Judith Berger
aus Kelheim

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. St. Hippenstiel
2. Priv. Doz. Dr. med. W. Weichert
3. Prof. Dr. W. Kummer

Datum der Promotion: 03.09.2010

Meiner Familie und Adam Chalk

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	6-7
2	Einleitung	8-25
2.1	Sepsis	8
2.2	<i>Staphylococcus aureus</i> α -Toxin.....	12
2.3	Endotheliale Permeabilität	13
2.4	Signalwege der parazellulären Permeabilität.....	14
2.4.1	Rolle des Aktin-Myosinskeletts	14
2.4.2	Kleine GTPasen: RhoA, Rac und Cdc42	15
2.4.3	Intrazelluläre Kalziumerhöhung	17
2.4.4	Zyklische Mononukleotide.....	17
2.5	Funktion von Junctionsproteinen	18
2.5.1	VE-Cadherin	19
2.5.2	Occludin.....	20
2.6	Adrenomedullin	23
2.7	Fragestellungen der Arbeit.....	25
3	Material und Methoden	26-35
3.1	Materialien	26
3.1.1	Versuchsmaterialien	26
3.1.2	Mikroskopie.....	27
3.2	Methoden.....	27
3.2.1	Präparation des isolierten Rattendarms.....	27
3.2.2	Konfokale Immunhistologie	29
3.2.3	Mikroskopische Evaluierung und Bilddokumentation der Immunhistologie.....	30
3.2.4	Messung des trans-endothelialen elektrischen Widerstands	30
3.2.5	Isolation und Kultur von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene ...	32
3.2.6	Konfokale Immunfluoreszenz.....	33
3.2.7	Mikroskopische Evaluierung und Bilddokumentation der Immunfluoreszenz.....	34
3.2.8	G-LISA für Rho-Aktivierung in HUVECs	34
3.2.9	Statistische Analyse.....	35

4	Ergebnisse	36-47
4.1	VE-Cadherin im isoliert perfundierten Rattendarm.....	36
4.1.1	Darstellung der regelrechten interendothelialen VE-Cadherin-Expression	36
4.1.2	Darstellung der VE-Cadherin-Expression nach α -Toxinstimulation	37
4.2	Trans-endothelialer elektrischer Widerstandsverlust nach α -Toxinstimulation ...	39
4.3	Subzelluläre Expression von Junctionsproteinen in mit α -Toxin stimulierten Endothelzellen	40
4.4	Einfluss der intrazellulären cAMP-Erhöhung auf die Junctionsprotein-expression	42
4.5	Einfluss der Myosinleichtkettenkinase auf den α -toxininduzierten Verlust an Junctionsproteinen.....	44
4.6	Rolle der Rho-Kinase auf die Junctionsintegrität nach α -Toxinstimulation	45
4.7	RhoA-Aktivität nach α -Toxin- bzw. Thrombinstimulation.....	46
5	Diskussion und Zusammenfassung.....	48-59
5.1	Diskussion	48
5.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i> α -toxininduzierte endotheliale Permeabilität	48
5.1.2	Thrombininduzierte endotheliale Permeabilität	49
5.1.3	Interventionsmöglichkeiten	50
5.1.4	Morphologische Veränderungen nach α -Toxin und Thrombin	53
5.1.5	Betrachtete Signalwege der endothelialen Permeabilität	55
5.2	Zusammenfassung und Ausblick	58
6	Literaturverzeichnis.....	60-73
7	Danksagung	74
8	Erklärung	75
9	Lebenslauf.....	76
10	Publikationsliste	77

1 Abkürzungsverzeichnis

ADM	Adrenomedullin
AJ	Adherens Junction
α -Toxin	<i>Staphylococcus aureus</i> alpha-Toxin
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺ _[i]	Intrazelluläres Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
ECIS	Elektrische Zell-Substrat Impedanz Sensing Technik
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPAC	Exchange Protein Activated by Cyclic AMP
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DIC	Differenzieller Interferenzkontrast
GFP	Green Fluorescent Protein
GJ	Gap Junction
G-Protein	Guaninnucleotid bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HUVEC	Humane umbilikalvenöse Endothelzellen
IEJ	Interendotheliale Junktion
IF	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP ₃	Inositoltriphosphat
LPS	Lipopolysaccharid
MLC	Myosinleichtkette

MLCK	Myosinleichtkettenkinase
MRSA	Methicillin resistente <i>S. aureus</i> Stämme
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PAR-1	Proteinase-activated receptor-1
pAK	Primärantikörper
PBS	Phosphat Buffered Saline
PDE	Phosphodiesterase
PIK	Permanente inhibitorische Kinase für MLCK
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PML	Polymorphkernige Lymphozyten
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
RAMP	Rezeptoraktivität-modifizierendes Protein
ROCK	Rho-Kinase
sAK	Sekundärantikörper
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SMA	Arteria mesenterica superior
SMV	Vena mesenterica superior
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
TER	Trans-endothelialer elektrischer Widerstand
TJ	Tight Junction
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
VE-Cadherin	Vaskuläres endotheliales Cadherin
ZO	Zonula Occludens

2 Einleitung

2.1 Sepsis

Sepsis und die sich daraus ergebenden schweren Schädigungen des Organismus führen nach wie vor zu zahlreichen Todesfällen. Die Arbeitsgruppe von Vincent zeigte eine steigende Inzidenz der Sepsisfälle in den letzten Jahren, wobei bis zu 30 Prozent der Fälle das Bild einer schweren Sepsis, in Abhängigkeit der jeweiligen Krankenhäuser beziehungsweise Intensivstationen aufwiesen (1). Trotz hochwirksamer Antibiotika und großer Fortschritte in der Intensivtherapie ist die Sepsis nach wie vor ein problematisches Krankheitsbild mit hoher Inzidenz und Sterblichkeit. So zeigte eine neuere Studie zur Epidemiologie der Sepsis in den USA, trotz fallender relativer Mortalitätsrate, eine Verdreifachung der absoluten Todesfälle durch einen Anstieg der Inzidenz von Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock (2).

Auf Intensivstationen in Deutschland (1997-2002) sind zunehmend grampositive Bakterien, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) sowie *Enterokokken* die führenden Pathogene der Sepsis. Dabei stellte *S. aureus* mit sechzehn Prozent den häufigsten Erreger nosokomialer Infektionen dar (3;4).

Jedoch können auch gramnegative Bakterien, wie *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Enterobakter* sowie Pilze und andere Mikroorganismen eine Sepsis auslösen. Dabei ist die Art des Erregers von äußeren Faktoren, zum Beispiel durch die Länge und Art des Krankenhausaufenthalts, des Lebensalters und der Eintrittspforten (besonders Wundinfektionen oder intravasale Katheter) abhängig. Bei nosokomialen Infektionen oder bei immunsupprimierten Patienten können auch fakultativ pathogene Erreger, wie zum Beispiel *Serratia* und *Candida albicans* Auslöser einer septischen Erkrankung sein. Als Diagnosekriterien der Sepsis werden der Nachweis oder ein bestehender Verdacht einer systemischen Infektion mit Bakterien oder Pilzen sowie die Erfüllung zweier oder mehrerer „Systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) Kriterien herangezogen. SIRS stellt eine systemische Folgereaktion des Körpers auf schwerwiegende Ereignisse, wie zum Beispiel Operationen, schwere Traumata oder Verbrennungen, dar. Sie ist charakterisiert durch mindestens zwei der folgenden Kriterien (5;6), siehe dazu Tabelle 1.

Tab. 1: SIRS Kriterien	
Körpertemperatur	> 38 oder < 36 °C
Herzfrequenz	> 90/Minute
Atemfrequenz	> 20/Minute
arterieller Kohlendioxidpartialdruck	> 32 mmHg oder < 32 mmHg
Leukozyten	> 12/ μ l oder < 4/ μ l
unreife neutrophile Granulozyten	> 10 %

Ein wichtiges Symptom der Sepsis ist der Blutdruckabfall, der durch die erhöhte Gefäßpermeabilität und den Tonusverlust der Gefäßmuskulatur ausgelöst wird (7). Ist dieser trotz adäquater Flüssigkeitszufuhr nicht kontrollierbar, handelt es sich um das Bild eines septischen Schocks. Kommt es neben den oben genannten SIRS-Kriterien und der Hypotonie zu Organfunktions- oder Perfusionsstörungen spricht man von einer schweren Sepsis. Die dabei auftretende Störung des Gerinnungssystems, einhergehend mit disseminierter intravasaler Gerinnung und Verbrauchskoagulopathie, führt zu Mikrozirkulationsstörungen der Organe (6). Dabei können die Organe so sehr geschädigt werden, dass es zum Erliegen ihrer Funktion kommt, wie zum Beispiel bei der akuten Niereninsuffizienz oder der Atonie des Darms (8). Der Darm spielt eine zentrale Rolle im septischen Geschehen. Bei Beeinträchtigung der mukosalen und vaskulären Integrität kann es zur Translokation von Bakterien und ihren Produkten vom Darmlumen in den Blutkreislauf kommen, wodurch das septische Geschehen aggraviert wird. Der Gastrointestinaltrakt wird deshalb auch als "Motor des Multiorganversagens" bezeichnet. Ein Versagen mehrerer Organe stellt einen lebensbedrohenden Zustand dar und ist mit ursächlich für die hohe Mortalität des Krankheitsbildes (6).

Ein zentraler Pathogenitätsmechanismus in dem Prozess des Organversagens spielt zudem die Veränderung der endothelialen Barrierefunktion (9;10). Daneben spielen zahlreiche Faktoren (endogener Mediatoren, wie Zytokine, Stickstoffmonoxid und Koagulationsfaktoren) der Abwehrreaktion des Organismus bei der Organschädigung eine Rolle (11).

Im Rahmen der lokalen oder systemischen Entzündung kommt es zu einem direkten Kontakt von Endothel und zirkulierenden Pathogenen, deren freigesetzten Virulenzfaktoren und Faktoren der zellulären sowie humoralen Abwehr (12;13).

Ein komplexes Wechselspiel zwischen Oberflächenstrukturen von Bakterien und

Endothelzellen ermöglicht das Adhären von Bakterien und die Aktivierung der Endothelzelle. So kann sich *S. aureus* über Fibronektin und andere Matrixproteine wie Vitronektin oder Elastin an Endothelzellen anheften (14;15). *Listeria monocytogenes* infizieren mononukleäre Phagozyten. Nach Adhärenz befallener Monozyten können sich die Listerien im Endothel ausbreiten, jedoch können sie auch direkt über das Protein Internalin in die Endothelzelle eindringen (16). Ferner setzen Bakterien Exotoxine frei, die mit der endothelialen Membran interagieren und eine erhöhte Permeabilität induzieren können, wie zum Beispiel *E. coli* durch Hämolyisin oder *S. aureus* durch α -Toxin (17-20). Hämolyisin führt *in vitro* zu einem Zusammenbruch der endothelialen Barriere (20) und in isolierten Kaninchenlungen zu einer Ödembildung (21). Ebenfalls interessant ist eine aktuelle Beobachtung von Chavakis et al., bei der bakterielle Adhäsionsmoleküle die Rekrutierung von Entzündungszellen zum Ort der Inflammation hemmen können. So inhibierte das von *S. aureus* freigesetzte „extracellular adherence molecule“ die β_2 -Integrin vermittelte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, indem es direkt mit den Adhäsionsmolekülen (interzelluläres Adhäsionsmolekül 1, Fibrinogen und Vitronektin) interagierte (22).

Die Invasion von Mikroorganismen und die damit verbundene Einschwemmung von Endo- und Exotoxinen in den Blutkreislauf setzen hochkomplexe immunologische Antwortmechanismen des Organismus in Gang, welche ebenfalls die endotheliale Zellfunktion betreffen. Strukturelle Bausteine und Virulenzfaktoren wie Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglykane oder Lipoteichonsäuren werden von immunkompetenten Zellen des angeborenen und unspezifischen Immunsystems erkannt und eine Entzündungsreaktion ausgelöst (23-26). Dabei spielen transmembrane Toll-like Rezeptoren (TLR) sowie zytosolische NOD-like Rezeptoren eine zentrale Rolle, da sie die Erkennung mikrobieller Strukturen in zelluläre Signale übersetzen, die ihrerseits die nachfolgende Aktivierung von humoraler und zellulärer Immunantwort steuern (13). Bisher sind zehn verschiedene humane Toll-like Rezeptoren bekannt, wobei TLR-4 als Rezeptor für LPS gramnegativer Bakterien (*Bacteroides fragilis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*), aber auch zur Erkennung von Pneumolysin des *S. pneumoniae* dient (27). Über TLR-2 werden Proteinbestandteile, wie zum Beispiel Lipopeptide und Lipoteichonsäure grampositiver Bakterien (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Enterokokken*), erkannt (28). Daneben konnte Faure et al. zeigen, dass die Expression von TLR-4/-2 auch durch endogene pro-

inflammatorische Mediatoren, wie Interferon gamma und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), reguliert wird (23). Akira et al. wiesen nach, dass TLR-4 defiziente Mäuse nicht auf gereinigtes LPS reagierten (29). Über die Aktivierung von TLR-4/-2 wird über verschiedene Untereinheiten eine Signalkaskade aktiviert, welche über TNF-Receptor-Associated-Factor-6 in den Mitogen-activated-Proteinkinasen-Signalweg und/oder in der Aktivierung von Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B)-Transkriptionsfaktoren münden kann (29). Diese Aktivierung endothelialer Transkriptionsfaktoren führt zur Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren, die durch Interaktion mit zirkulierenden Zellen die zelluläre Immunantwort in Gang setzen (12;30). Im Rahmen der Sepsis kommt es zunächst zu einer überschießenden Immunreaktion. Dabei führt die frühe Phase (hyperdynamische Phase) der pro-inflammatorischen Reaktion (TNF- α , Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, C5a) zu einer Zellaktivierung und Zellproliferation sowie zu einer Leukozyteninfiltration in die betroffenen Gewebe. Als Gegengewicht produziert der Körper nachfolgend anti-inflammatorische Mediatoren (IL-10, TNFR, IL-1Ra, TGF- β). Bei einem protrahierten septischen Krankheitsverlauf verursachen diese anti-inflammatorischen Mediatoren eine Immunsuppression (hypodynamische Phase), die durch eine Monozytendeaktivierung (HLA-DR-Abfall, eingeschränkte TNF-Produktion) in einer Immunparalyse resultieren kann. Der genaue zeitliche Ablauf dieser Phasen ist bei zahlreichen unterschiedlichen Verläufen unklar (31). Die Aktivierung des humoralen Immunsystems kann also als bipolare Störung betrachtet werden, bestehend aus einer Phase der unkontrollierten Hyperinflammation mit systemischer Entzündungsreaktion und Organversagen sowie einer Phase der Immunparalyse, welche die systemische Pathogenexpansion begünstigt und zum Multiorganversagen führen kann (31). Dies veranlasste D.C. Morrison im Jahre 1978 zu der Aussage: „Die eigentliche Bedrohung einer bakteriellen Infektion stellt nicht nur das Bakterium an sich, sondern auch die Abwehrreaktion des Organismus dar (32).“

In Deutschland stellt die Sepsis die siebthäufigste Krankenhausentlassungsdiagnose unter den lebensbedrohlichen Erkrankungen, mit einer 90-Tage Sterblichkeit von 54 Prozent für die schwere Sepsis, dar. Mit circa 60.000 Todesfällen (2003-2004) sind septische Erkrankungen die dritthäufigste Todesursache nach koronarer Herzkrankheit und akutem Myokardinfarkt (33).

2.2 *Staphylococcus aureus* α -Toxin

S. aureus ist einer der häufigsten Erreger eitriger Wundinfektionen, nosokomial erworbenen Pneumonien und der Sepsis. Es besitzt zahlreiche Pathogenitätsfaktoren, die zur Ausbildung krankhafter Prozesse beitragen. So ist der Erreger in der Lage eine Reihe von extrazellulären Enzymen zu synthetisieren, die Gewebe (Hyaluronidase), Nukleinsäuren (Desoxyribonuclease) oder Proteine (Proteasen) zersetzen können (34). Daneben produziert *S. aureus* zahlreiche Exotoxine (α -, β -, γ - und δ -Lysin), welche die Zellmembran durchlässig machen können. *S. aureus* besitzt demnach hämolytische, zytotoxische und dermonekrotische Eigenschaften. Das Exotoxin α -Toxin stellt einen wichtigen Pathogenitätsfaktor des Bakteriums dar. So hatten Mäuse, die mit α -Toxin defizienten Stämmen infiziert wurden, eine höhere Überlebenschance als die mit einer Wildtyp-Infektion (35). Daneben führte α -Toxin zu einer pro-inflammatorischen endothelialen Zellaktivierung (17). Krüll et al. konnte zeigen, dass es zu einer verstärkten Adhäsion polymorphkerniger Leukozyten an den α -toxinaktivierten Endothelzellen kam, welches ein wichtiger Schritt in der Entzündungsreaktion ist (19;36;37).

Seine Wirkungen vermittelt α -Toxin in Kaninchenerythrozyten auf zwei verschiedenen Wegen (38). In geringen Konzentrationen (1-2 nM) bindet α -Toxin an einen bisher nicht identifizierten Rezeptor und in höheren Konzentrationen (≥ 200 nM) bilden α -Toxinmoleküle nach Andocken an die zelluläre Doppellipidschicht amphiphile ringförmige Hexamere, die in die Zellwand eingebettet werden und flüssigkeitsdurchlässige transmembranäre Poren formen (39;40). Dabei spielt bei niedrigen Konzentrationen die Oligomerisation eine Voraussetzung für die Porenbildung. Diese sehr kleinen Poren erlauben den selektiven Durchtritt von einwertig geladenen Ionen, jedoch keinen schnellen Einstrom von Kalzium. In höheren Konzentrationen kann α -Toxin kalziumdurchlässige Poren bilden (40) und so den intrazellulären Kalziumgehalt in Endothelzellen erhöhen, was die endotheliale Hyperpermeabilität begünstigen kann (19;41). Die Stimulation kalziumabhängiger Signalwege zum Beispiel durch Thrombin resultiert in der Aktivierung des endothelialen Kontraktionsapparates und dem Abbau von Junctionsproteinen, wodurch ein erhöhter parazellulärer Flüssigkeitsaustausch ermöglicht wird (17;42).

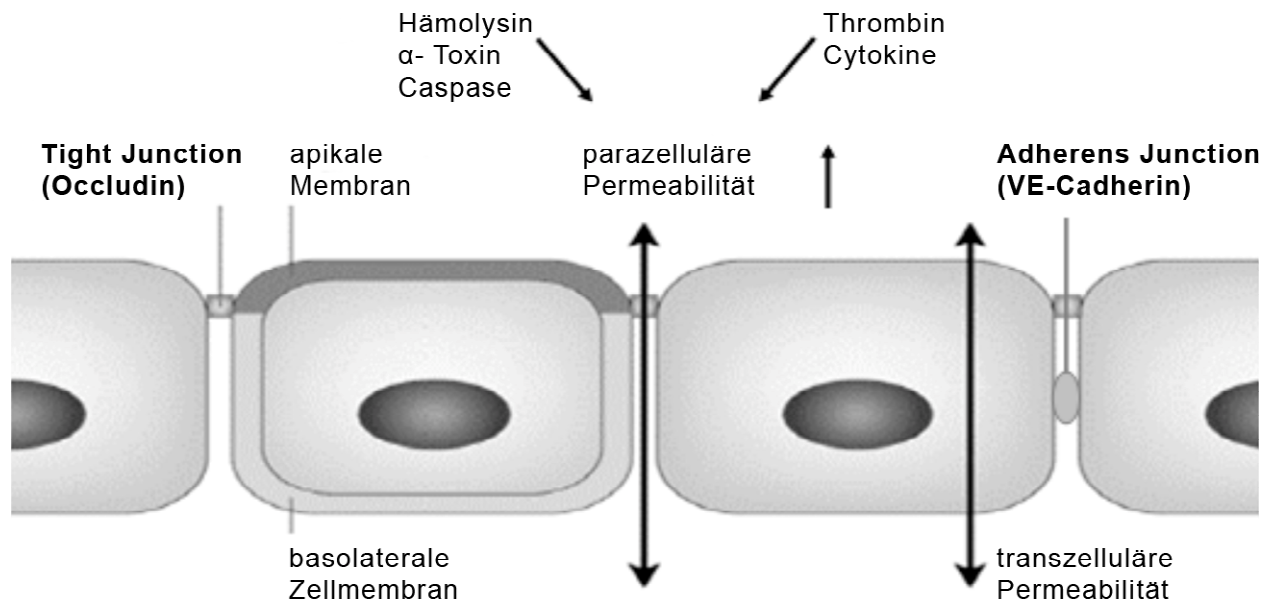
Die parazelluläre Schrankenstörung scheint vor allem in dem Mechanismus der Organschädigung durch α -Toxin von Bedeutung zu sein. Zahlreiche Arbeiten konnten

eine schwere endotheliale Barriervedysfunktion sowohl *in vitro* (43) als auch *in vivo* (44;45) durch *S. aureus* α -Toxin zeigen. Suttorp et al. stellte bereits 1988 an Kulturen aus endothelialen Zellen der Arteria pulmonalis von Schweinen eine erhöhte parazelluläre Durchlässigkeit für Wasser und Albumin nach α -Toxinapplikation fest. Diese Beobachtungen gingen einher mit Zellkontraktion und der Ausbildung großer Lücken zwischen den Endothelzellen (43). Die erhöhte parazelluläre Permeabilität α -Toxin ist bedeutend für die Ausbildung von Organschädigung, wie die Untersuchungen von Seeger et al. anhand eines isoliert perfundierten Mauslungenmodells zeigten. Sie konnten eine Permeabilitätserhöhung und die Entwicklung eines Lungenödems nach α -Toxingabe nachweisen (45). Darüber hinaus zeigten Untersuchungen von Brell et al. im isolierten Rattenileum eine Störung der Mikrozirkulation durch verminderte Perfusion sowie eine verminderte Hämoglobinoxygenierung der Mukosa (44). Die Arbeitsgruppe zeigte ebenfalls eine Minderperfusion mit Sauerstoffversorgung der Mukosa in isolierten Rattenileum nach α -Toxin, die durch Adrenomedullin (ADM) verhindert werden konnte (46). Die venöse Infusion von α -Toxin führte in Ratten zu einer massiven vaskulären Hyperpermeabilität und zu einem hämodynamischen Schock (47). Sibelius et al. konnte in perfundierten Rattenherzen eine koronare Vasokonstriktion und einen Verlust der myokardialen Kontraktilität nachweisen (48).

Obwohl α -Toxin eine starke endotheliale Hyperpermeabilität induziert, ist noch sehr wenig über den zugrunde liegenden zellulären Mechanismus sowie potentielle therapeutische Ansätze bekannt.

2.3 Endotheliale Permeabilität

Die Funktion des Endothels als semipermeable Barriere ist wesentlich für die Kontrolle des Flüssigkeits- und Makromolekülaustausches zwischen Blut und Interstitium. Generell erfolgt der Protein- und Flüssigkeitstransport bei intaktem unfenestriertem Endothel auf transzellulären und parazellulären Wegen (Abb.1).

**Abb. 1**

Schematisch dargestellter Verbund von Endothelzellen. Physiologisch findet ein parazellulärer und transzellulärer Durchtritt von Flüssigkeiten und Molekülen statt (schwarze beidseitige Pfeile). Verschiedene endogene Mediatoren (Thrombin, Zytokine), aber auch exogene Pathogene (α -Toxin, Hämolyisin, Caspase) können den engen Verbund durch Störung interendothelialer Junctions Tight Junctions (Occludin) sowie Adherens Junctions (VE-Cadherin) beeinträchtigen und so die parazelluläre Permeabilität begünstigen. Die Störung dieses Verbundes kann zu relevanten Flüssigkeitsverschiebungen und Organschädigungen führen.

Für die Pathogenese der Sepsis scheint die parazelluläre Permeabilität von wesentlicher Bedeutung zu sein (12). Auf die Mechanismen der transzellulären Permeabilität wird hier nicht näher eingegangen. Für die parazelluläre Permeabilität spielen interendotheliale Junctionsproteine eine wichtige Rolle, da sie eine Lückenbildung zwischen benachbarten Zellen verhindern. Ihre funktionelle Expression wird durch zahlreiche Regulationsmechanismen kontrolliert (49).

Es sind wesentliche molekulare Mechanismen beschrieben worden, wie zum Beispiel das Aktin-Myosinskelett, kleine GTPasen, intrazelluläres Kalzium sowie zyklische Monophosphate, die in diesen Prozess regulatorisch eingreifen und in den nächsten Kapiteln weiter ausgeführt werden sollen.

2.4 Signalwege der parazellulären Permeabilität

2.4.1 Rolle des Aktin-Myosinskeletts

Einen der ersten konkreten Hinweise für eine Kontraktion der Endothelzelle als Antwort auf permeabilitätserhöhende Stimuli mit Verlusten an Zell-Zell-Kontakten lieferten die

ultrastrukturellen Untersuchungen von Majno et al. (50) sowie neuere isometrische Kraftmessungen an Endothelzellkulturen (51;52). Dabei führte die Stimulation mit Thrombin zu einer Verdopplung der kontraktilen Kraft (51) und verringerte den trans-endothelialen elektrischen Widerstand (TER), was als ein indirektes Zeichen für die Störung der interendothelialen Junctionen interpretiert wird (53). Nach Stimulation mit Thrombin bilden sich Stressfasern, welche aus polymerisierten Aktin-Myosinbündeln zusammengesetzt sind und in Endothelzellen zu einer Zellkontraktion führen (54). In intakten isolierten postkapillären Venulen kommt es als Antwort auf Thrombin zu einer Regulierung der Permeabilität durch Phosphorylierung der Myosinleichtkette (MLC), die über die Myosinleichtkettenkinase (MLCK) gesteuert wird (55). Diese Komponenten stellen den kontraktilen Apparat der Endothelzelle dar (56). Obwohl die genaue Beziehung zwischen der MLC-Phosphorylierung und dem Verlust an interendothelialen Junctionen in endothelialen Monolayern noch nicht vollständig untersucht wurde, ist sie für das Verständnis der parazellulären Permeabilität und für die Identifikation neuer Therapieansätze in der Sepsis von entscheidender Bedeutung.

Das Aktin-Mikrofilamentsystem ist fokal an multiple membranadhäsive Proteine, wie das vaskuläre endotheliale (VE)-Cadherin und interzelluläre Proteine der Zonula Occludens (ZO), wie Occludin, geknüpft. Interendotheliale Lückenbildung nach Thrombin führt zu einem Verlust an VE-Cadherin und Occludin und nur wenige adhäsive Junctionen bleiben mit dem Aktinzytoskelett verbunden (57;58). Dies legt einen Zusammenhang zwischen der Zellkontraktion, MLC-Phosphorylierung, der Ausbildung von Lücken zwischen den Endothelzellen und somit der Permeabilitätserhöhung nahe. Die Kontraktion des Aktin-Mikrofilamentsystems wird unter anderem durch kleine GTPasen reguliert.

2.4.2 Kleine GTPasen: RhoA, Rac und Cdc42

Kleine GTPasen sind membranassoziierte Proteine, die wichtige Regulatoren der endothelialen Signaltransduktion darstellen. Sie leiten Signale ausgehend von den Rezeptoren zu den Effektoren weiter und beeinflussen so verschiedenste Zellfunktionen. Sie lassen sich aufgrund ihrer Strukturelemente in bisher fünf bekannte Unterfamilien (Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf, Ran) unterteilen.

Die Entstehung und Wiederverschließung interendothelialer Lücken erfordert eine dynamische Reorganisation des Aktinskeletts, welche vorrangig durch Rho-GTPasen

gesteuert wird (58-60). Rho-GTPasen können ebenfalls Untergruppen zugewiesen werden, wobei hier RhoA, Rac und Cdc42 betrachtet werden. Für RhoA konnte eine vermehrte Stressfaserbildung gezeigt werden, während Rac eine Aktinpolymerisation in der Zellperipherie und die Ausbildung von Lamellipodia hervorrief (59). Cdc42 steigert die Aktinpolymerisation und die Ausbildung von Mikrospeikes und Filopodien (59). Ridley et al. und ihre Arbeitsgruppe setzten humane umbilikalvenöse Endothelzellen (HUVEC) Scherkräften aus und konnten eine frühe Aktivierung von Rho, Rac und Cdc42 nachweisen (61). Hippenstiel et al. zeigte an Endothelzellen durch Inaktivierung der Rho-Proteine einen Zusammenhang zwischen Rho-Proteinen und der endothelialen Barrierefunktion unter inflammatorischen Bedingungen. Die Endothelzellen mit den inaktiven Rho-Proteinen wurden *Clostridium difficile* Toxin B ausgesetzt, wobei es zu einem Permeabilitätsanstieg und einer F-Aktin-Fragmentierung kam (62). Die durch GTPasen übertragenen Signale regulieren also das intrazelluläre Aktinzytoskelett sowie Transkriptionsfaktoren (z.B. NF- κ B), welche die Genexpression von pro-inflammatorischen Mediatoren (IL-8, TNF α , IL-1 β) regulieren (59;63). Dabei entfalten sie ihre Wirkung vor allem durch die Rho-Kinase (ROCK) (64), welche die Ausbildung von Stressfasern über die Phosphorylierung der MLC induziert (65-67) (siehe Abb.2). Dies geschieht über zwei mögliche derzeit bekannte Mechanismen: direkt durch eine Phosphorylierung der MLC an Serin, Threonin oder indirekt über die Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit der myosinspezifischen Phosphatase und so deren Aktivität vermindert (56;65). Die verminderte Aktivität der myosinspezifischen Phosphatase resultiert in der Hemmung der Dephosphorylierung der MLC. Endothelzellen mit einer Überexpression an aktiver ROCK bilden vermehrt Stressfasern aus (68).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der ROCK mit Hilfe des spezifischen Rho-Kinase-Inhibitors (Y-27632) die thrombininduzierte Stressfaserbildung hemmt (69). Ferner zeigt sich durch Thrombin eine über Guaninnucleotid bindende (G)-Proteine gesteuerte Aktivierung der kleinen GTPase RhoA. Diese Aktivierung geschieht unter anderem über eine nachgeschaltete Proteinkinase C (PKC). Die Rho-Aktivierung führt zu einer direkten Phosphorylierung oder Dephosphorylierung des VE-Cadherins, deren Bedeutung unter 2.4 näher beschrieben wird (70;71). Interessant ist der Einfluss dieser kleinen GTPasen, wie Rho, Rac und Cdc42, auf die Reassoziaton der endothelialen Junctionen nach thrombininduzierten Barriereverlust. Durch die thrombininduzierte

Trennung der endothelialen Zellverbindungen wird RhoA aktiviert, während Rac inaktiviert wird. Dagegen ging der Wiederaufbau der Junctionen mit einer Cdc42- und Rac-Aktivierung und einer Rho-Inhibition einher (72).

2.4.3 Intrazelluläre Kalziumerhöhung

Die Erhöhung des intrazellulären Kalziums ($Ca^{2+}_{[i]}$) wird als wichtiges Signal für die Reorganisation des Zytoskeletts und für die Eröffnung von Junctionen angesehen (41). Toxine wie *S. pneumoniae* Pneumolysin (73) und *S. aureus* α -Toxin, aber auch endogene Stimuli wie zum Beispiel Thrombin können das $Ca^{2+}_{[i]}$ erhöhen (19;37;41). Bakterielle Toxine können dies über membranäre Porenbildung auslösen, während Thrombin seine Wirkung über den Proteinase-activated receptor-1 (PAR-1) und die Koppelung an multiple heterotrimerische G-Proteine, G_q , $G_{12/13}$ und $G_{i/o}$, entfaltet (74-77). Die Bindung an G-Proteine führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C, welche die Produktion von Inositoltriphosphat (IP_3) durch Abspaltung von Diazylglyzerol von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate katalysiert (78). IP_3 führt seinerseits zu einer Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol. Dies setzt verschiedene Signalwege in Gang, wie die Aktivierung der kalziumabhängigen MLCK (41;56;79). Die MLCK-Aktivierung führt zu einer Kontraktion des Aktin-Myosinskeletts (siehe Abb. 2) (54). Daneben kommt es zu einer Aktivierung der PKC, die ebenfalls zur Zellkontraktion und dem Verlust an VE-Cadherin beiträgt. Es zeigte sich, dass die Inhibition der PKC-Aktivierung den Verlust an VE-Cadherin in HUVECs verhindert (56;80).

2.4.4 Zyklische Mononukleotide

Systemisch freigesetzte Mediatoren der Entzündungsreaktion können über die Bindung an G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren die Endothelzellen aktivieren. Die intrazelluläre Signalkaskade wird hierbei über Konzentrationsänderungen sekundärer Botenstoffe, wie beispielsweise das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) oder das zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP), moduliert. Dabei lassen sich hinsichtlich der endothelialen Barrierefunktion unterschiedliche Wirkungen nachweisen.

Es ist bekannt, dass eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung die endotheliale Barrierefunktion *in vivo* und *in vitro* stärkt (77;81-83), wohingegen die cGMP-Wirkung kontrovers diskutiert wird, da einerseits Verbesserungen der mikrozirkulären

Dysfunktion, jedoch auch permeabilitätserhöhende Wirkungen gezeigt wurden (84;85). An isolierten Lungen und endothelialen Zellkulturen führten cAMP-erhöhende Substanzen zu einer Verminderung der endothelialen Permeabilität (86;87). cAMP entfaltet seine Wirkung vor allem durch die direkte Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), welche die Bindung von RhoA an ROCK vermindert (88). Die pharmakologische Hemmung der PKA verhindert jedoch die stabilisierende Wirkung von cAMP an Endothelzellen nicht immer, was auf PKA-unabhängige Signalwege hindeutet. (77;85;87;89). Neuere Forschungsergebnisse weisen auf PKA-unabhängige Signalwege mit Hilfe von cAMP-Rezeptormolekülen hin, wie das „Exchange Protein Activated by Cyclic AMP“ (Epac) (90). Über Epac wird Rap1, eine GTPase der Rho-Familie, aktiviert und so die endothelialen Zell-Zell-Kontakte, die zelluläre Adhäsion und zelluläre Aktivierung beeinflusst (91). Epac verminderte die Permeabilität in Zellkulturen jedoch nur in Endothelzellen, die VE-Cadherin exprimieren, was darauf hindeutet, dass Rap1 für seine Aktivität VE-Cadherin benötigt (92). Daher scheint es möglich, dass VE-Cadherin und Rap1 sich gegenseitig in Bezug auf die Stabilisierung der endothelialen Barriere beeinflussen.

Erhöhte cAMP-Konzentrationen scheinen in der Regulation der Junctionsproteine einzugreifen, da sich sowohl Umverteilungen von Junctionsproteinen (90) als auch eine verstärkte VE-Cadherin-Bindung nachweisen ließen (92;93). Da auch die thrombininduzierte Permeabilität stark reduziert und die endotheliale Barriere wiederhergestellt werden konnten, ist eine Untersuchung der Auswirkungen von cAMP auf die Junctionsproteine von hohem wissenschaftlichen und klinischen Interesse (82;87).

2.5 Funktion von Junctionsproteinen

Endothelzellen sind untereinander durch junctionale Strukturen, bestehend aus transmembranen adhäsiven Proteinen, verbunden. Diese führen zur Ausbildung von Junctionsformen verschiedener Funktion: Gap Junctions (GJ), Tight Junctions (TJ) und Adherens Junctions (AJ). GJs bilden transmembrane Kanäle zwischen benachbarten Zellen, die den interzellulären Austausch von Ionen sowie kleiner Moleküle erlauben und so der Kommunikation zwischen den Zellen dienen (94). TJs unterstützen die Funktionalität des Endothels, indem sie die parazelluläre Permeabilität regulieren und die Zellpolarität erhalten. Daneben spielen AJs eine wichtige Rolle in Bezug auf das

endotheliale Wachstum sowie die parazelluläre Permeabilität (49). Dabei schaffen TJs und AJs durch ihre Adhäsion eine perizelluläre reißverschlussähnliche Struktur entlang der Zellgrenzen und sorgen so für den Zusammenhalt benachbarter Endothelzellen (49). Die Verteilung der junctionalen Proteine ist abhängig von organspezifischen Anforderungen. So finden sich beispielsweise an der Blut-Hirnschranke, wo eine strikte Kontrolle der Permeabilität gewährleistet werden muss, mehr TJs als in post-kapillaren Venulen des Organismus, wo ein Durchtritt von Plasmaproteinen und Zellen möglich ist (95). Die adhäsiven Proteine stehen in einem dynamischen Gleichgewicht und werden zwischen Zellmembran und intrazellulären Kompartimenten recycelt (49). Bakterien sowie deren Pathogene können zum Verlust der Junctionalproteine beitragen. So erhöhte LPS durch einen durch Caspasen getriggerten Abbau von Junctionalproteinen die parazelluläre Permeabilität (96).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei zentrale Proteine als Indikatoren der parazellulären Permeabilität betrachtet- das AJ-Protein VE-Cadherin und das TJ-Protein Occludin.

2.5.1 VE-Cadherin

AJs haben eine fundamentale Bedeutung in der Regulation der endothelialen Barriere (49). Endotheliale AJs enthalten VE-Cadherin als Hauptstrukturprotein, das die homophile Bindung und Adhäsion angrenzender Zellen vermittelt. Der extrazelluläre Anteil von VE-Cadherin besteht aus fünf Cadherin ähnlichen Teilen, die *cis*- und *trans*-Oligomere zwischen benachbarten Zellen bilden (49;97-99). Der zytoplasmatische Teil klassischer Cadherine, so auch von VE-Cadherin, besteht aus zwei Domänen, wobei das Carboxylende mit β -Catenin oder Plakoglobin interagiert. β -Catenin interagiert mit α -Catenin, worüber VE-Cadherin mit dem Aktinzytoskelett verknüpft wird und so die AJ beeinflusst werden können (siehe Abb. 2) (49). Die juxtamembranäre Domäne bindet an p120-Catenin, von dem angenommen wird, dass es den kontraktilen Apparat der Endothelzelle durch Aktivierung von Rho-GTPasen hemmt (100-102). VE-Cadherin wird durch Lysosome und Proteasome abgebaut. Xiao et al. zeigten, dass Proteasominhibitoren die endotheliale Lückenbildung hemmten und die Expression von VE-Cadherin stabilisierten (103). Daneben führte Histamin zu einer vermehrten Tyrosinphosphorylierung an VE-Cadherin, welches eine Lösung vom Aktinzytoskelett bewirkte (104). Es zeigte sich, dass der Regenerationsphase der AJs eine Cdc42

Aktivierung und dessen Translokation aus dem Zytosol an die Membran vorausgingen (58). Ferner verzögerte die Expression von dominant negativen Cdc42-Mutanten die VE-Cadherin-Erneuerung und die Wiederherstellung der Endothelbarriere erheblich *in vitro* und *in vivo* (58). Diese verzögerte Aktivierung von Cdc42, lässt auf einen negativen Rückkoppelungsmechanismus schließen, der den AJ-Wiederaufbau nach endothelialer Hyperpermeabilität durch inflammatorische Mediatoren wie Thrombin reguliert (58).

Die genannten Regulationsmechanismen stellen wahrscheinlich nur einen geringen Anteil möglicher Einflussmöglichkeiten des Organismus auf die endotheliale Permeabilität dar. In den letzten Jahrzehnten standen der Aufbau und die Struktur endothelialer Junctionen im Fokus der Forschung, jedoch sind für die Entwicklung erfolgreicher kausaler Therapien im septischen Krankheitsbild die umfangreichen zellulären Regulationsvorgänge noch nicht ausreichend verstanden (103;105).

2.5.2 Occludin

Occludin war eines der ersten an TJ lokalisierten identifizierten integralen Membranproteine. Es besitzt vier transmembrane Domänen mit zwei extrazellulären Schlingen, die zum TJ-Aufbau beitragen, und ist intrazellulär mit den ZO-Proteinen 1 bis 3 assoziiert (106). Anfängliche Studien an Epithelzellen deuteten bereits auf seine bedeutende Rolle in der Regulierung der parazellulären Permeabilität hin (107-109). Neuere molekulare Arbeiten ergaben, dass seine Carboxyldomäne an ZO-1 bindet. Die ZO-1 Domäne verbindet ihrerseits Occludin mit α -Catenin (110) und so mit dem Aktinzytoskelett (111). Die Transfektion und Kultivierung der Nagetier-Endothelzelllinie (RLE) mit Occludin führte im Vergleich zu Occludin-defizienten Zellen zur Ausbildung eines peripheren Aktinbands, was darauf schließen lässt, dass Occludin in die Regulierung des Aktinzytoskeletts eingreift (112). In LLC-PK₁ Zellen wurde der Phosphorylierungsstatus von Occludinaminosäuren nach Aktivierung der PKC durch Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA) untersucht und es zeigte sich, dass die zeitabhängige Abnahme der Tyrosinphosphorylierung zu einer Abnahme des TERs führte (113). Obwohl die Phosphorylierung der Hauptmechanismus für die biologische Funktionsregulierung für Occludin zu sein scheint, bestehen zahlreiche weitere Signalwege, die dessen Struktur und Funktion regulieren. Jou et al. konnte an Epithelzellen eine Beteiligung der Ras-verwandten kleinen GTP-bindenden Proteine

RhoA und Rac1 in der Occludinregulation zeigen (114). Die Interaktion zwischen Occludin und den anderen AJ- bzw. TJ-Proteinen untereinander ist noch nicht im Detail verstanden. Bekannt ist, dass in der endothelialen Signaltransduktion von Occludin ebenfalls kleine Rho-GTPasen eine Rolle zu spielen scheinen (115).

Hinsichtlich der parazellulären Permeabilitätsregulierung liegt eine Beteiligung von Occludin nahe. Kim et al. zeigte dass der opportunistische Erreger *Burkholderia cenocepacia* die epitheliale Barriere im Respirationstrakt durch die Dephosphorylierung und Loslösung von Occludin durchdringt und so eine Sepsis auslösen kann (116). Die Arbeitsgruppe von Hirase et al. konnte diesen Zusammenhang ebenfalls herstellen, da die Dichte der Occludinexpression in Endothelzellen innerhalb der Gefäße mit die Permeabilität in verschiedenen Segmenten des Gefäßstammes korrelierten (115). Daneben beeinflusst die Integrität des Junctionsproteins die intestinale Permeabilität. So zeigte sich bei einer Studie von Ying-Jie Sun et al. an isolierten Rattendärmen nach kardiopulmonalen Bypass ein Verlust an Occludin und ZO-1 in der intestinalen Mukosa (117). Dies ging mit einer erhöhten Darmpermeabilität einher, was zu einer Translokation von Bakterien führen kann und in der Sepsis einen wichtigen Pathomechanismus des Multiorganversagens darstellt.

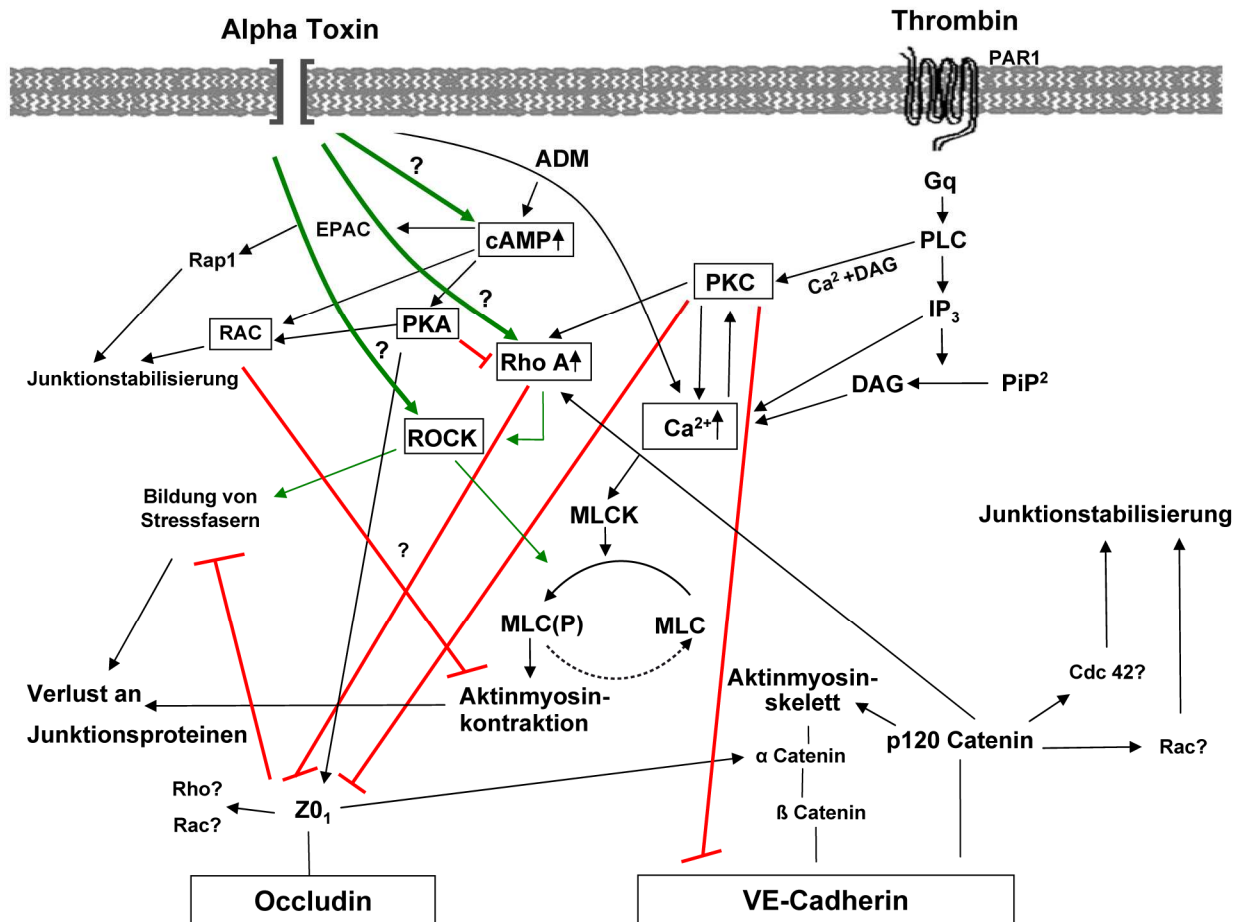


Abb. 2

Signalmechanismen zur Regulation der endothelialen Permeabilität. Die bisher unvollständig verstandenen Signalwege in Bezug auf α -Toxin, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind, sind **grün** dargestellt. Bekannte Regulationswege die zu einer Zellkontraktion und zu einem Verlust an Junctionalproteinen führen, sind **rot** markiert.

Thrombin und α -Toxin erhöhen das $Ca^{2+}_{[i]}$. $Ca^{2+}_{[i]}$ steigert die Aktivität von MLCK, welche MLC zu MLC-P phosphoryliert. Daneben kommt es zu einer Aktivierung der PKC, die über RhoA zu einer ROCK-Aktivierung und so zu einer Steigerung der Stressfaserbildung führt. Über die ROCK-gesteuerte Inhibierung der MLC-Phosphatase kommt es zu einem Verlust an VE-Cadherin und Occludin sowie zur Zellkontraktion.

VE-Cadherin ist über β -Catenin und α -Catenin, Occludin über ZO-1 und α -Catenin, mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Ferner bestehen wechselseitige Interaktionen zwischen p120-Catenin, welches zu einer RhoA-Aktivierung führen kann, aber auch die Barrierefunktion durch mögliche Aktivierung von Rac und Cdc42 stabilisiert. Inwiefern ZO-1 mit Rho/Rac interagiert ist noch unklar.

Das endogene Peptid Adrenomedullin erhöht intrazelluläres cAMP. cAMP hemmt über PKA die RhoA-Aktivität und kann über Epac das periphere Aktinband stabilisieren. Durch Aktivierung von Rac wird die Zellkontraktion gehemmt.

Ob durch die Einwirkung von α -Toxin eine direkte oder indirekte cAMP-, RhoA- oder ROCK-Aktivierung ausgelöst wird ist unklar (grün).

2.6 Adrenomedullin

Adrenomedullin (ADM) ist ein endogenes Peptid, das 1993 von einer japanischen Arbeitsgruppe entdeckt wurde (118). Kitamura et al. isolierten das Peptid aus humanen Phäochromozytomen, einem katecholaminbildenden Tumor des Nebennierenmarks. Bestehend aus 52 Aminosäuren (AS) wird es wegen seiner Ähnlichkeit mit dem Calcitonin-genverwandten Peptid (CGRP) zur Calcitonin-genverwandten Proteinfamilie gezählt (119). Weitere Moleküle dieser Proteinfamilie sind neben CGRP und ADM Amylin das pro-ADM N-Terminal 20 Peptid (PAMP) und das kürzlich entdeckte Intermedin, auch ADM-2 genannt (120). Die Kodierung erfolgt durch das humane ADM-Gen, welches auf dem Chromosom 11 lokalisiert ist (121). Das ADM-Gen besitzt zahlreiche Bindungsstellen für das Aktivatorprotein-2, cAMP-regulierte „Enhancer“ sowie NF- κ B-Bindungsstellen auf der Promotorregion (121). Durch die posttranslationale Modifikation des Vorläufermoleküls bestehend aus 185 AS entstehen zahlreiche Spaltprodukte, darunter das inaktive ADM (53 AS) sowie aktive Formen wie PAMP und ADM (119;122;123). Für seine biologische Aktivität ist die enzymatische Amidbildung durch die α -amidbildende Peptidylglyzin-Monooxygenase (PAM) ausschlaggebend (124;125).

ADM vermittelt seine Wirkung über die Bindung an zwei spezifische Rezeptoren bestehend aus Calcitonin-Rezeptor-ähnliche Rezeptoren (CRLR) kombiniert mit den Rezeptoraktivität-modifizierenden Proteinen (RAMP)-2 oder -3 (126;127). Diese werden als ADM₁- und ADM₂-Rezeptoren bezeichnet. Daneben weist ADM eine Affinität zu dem CGRP₁-Rezeptor bestehend aus CRLR und RAMP-1 auf. Der ADM₁-Rezeptor ist hoch selektiv für ADM während der ADM₂-Rezeptor eine hohe Affinität für CGRP besitzt und ADM eher unselektiv bindet (128). Daneben konnte die Existenz von weiteren ADM-Rezeptoren in Ratten durch die Bindung von ¹²⁵I-ADM an Zellen der glatten Gefäßmuskulatur (VSMC) gezeigt werden (129). Diese Bindung stand in Konkurrenz mit ADM und CGRP, wies jedoch eine 23-fache höhere Affinität für ADM gegenüber CGRP auf, was keinem CGRP-Rezeptor entsprach. Dies deutet auf die Existenz von weiteren ADM-Rezeptoren hin, welche jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht molekular identifiziert sind.

Die Rezeptoren leiten die Signale über G-Proteine an intrazelluläre Botenstoffe weiter. Der dabei bedeutendste bekannte signaltransduktorische Effekt einer Stimulierung von Zellen mit ADM scheint die cAMP-erhöhende Wirkung zu sein (130). Die cAMP-

Aktivierung führte nachfolgend zu einer Aktivierung der PKA, welche RhoA phosphoryliert, und somit deren Bindung an ROCK vermindert und damit die Phosphorylierung der MLC blockiert (88). Dadurch unterbleibt in Endothelzellen die aktin-myosin gesteuerte Zellkontraktion. Dies trug effektiv zu einer Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion *in vitro* und in isoliert perfundierten Organen durch ADM bei (44;131-133). Die Expression des ADM-Gens ist höher in Endothelzellen als im Nebennierenmark, was dazu führte, ADM als sekretorisches Protein des Gefäßendothels, ähnlich wie Stickstoffmonoxid oder Endothelin, zu betrachten (134).

ADM kommt ubiquitär im menschlichen Organismus vor und wird von zahlreichen Zelltypen synthetisiert (Endothelzellen, glatte Muskelzellen, endokrine Zellen). Dabei nimmt es Einfluss auf wichtige Vitalfunktionen des Organismus, zum Beispiel das zelluläre Wachstum, das kardiovaskuläre System, das zentrale Nervensystem und das endokrine System (135).

Die Frage, ob ADM wie zahlreiche andere regulatorische Peptide intrazellulär gespeichert wird, ist noch unklar. Es gibt Hinweise, dass ADM in sekretorischen Bläschen des Pankreas gespeichert wird, jedoch stehen elektronenmikroskopische Untersuchungen von weiteren Geweben aus. In Zellkulturen fand sich bisher kein Hinweis auf die intrazelluläre Speicherung des Proteins (136). Daher wird angenommen, dass ADM fortlaufend ausgeschüttet wird (137) und eine Plasmahalbwertszeit von $22 \pm 1,6$ Minuten besitzt (138).

Im Rahmen systemischer Entzündungen (SIRS, Sepsis) führten zentrale pro-inflammatorische Zytokine, wie $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$, zu einer Stimulation der endothelialen ADM-Produktion (139;140), so dass sowohl tierexperimentell als auch klinisch erhöhte Plasmaspiegel an ADM nachgewiesen werden konnten (140-143). ADM spielt eine wichtige Rolle in der mikrozirkulären Regulation unter Sepsis und im septischen Schock (144-148). Inwiefern die erhöhten ADM-Serumspiegel bei Patienten mit systemischer Inflammation und Sepsis als anti-inflammatorische Gegenregulation zu werten sind, bleibt zu klären. Yang et al. konnten zeigen, dass die Applikation von ADM in septischen Ratten die Konzentration an pro-inflammatorischen Zytokinen ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6) reduzierte und den Übergang von der hyperdynamischen Phase in die hypoaktive Phase der Sepsis hinauszögerte oder sogar verhindern konnte (147;148). Shindo et al. verhinderte durch eine ADM-Überexpression im Gefäßsystem in transgenen Mäusen das Auftreten eines septischen Schocks (146). In Ratten wurde ferner mit Hilfe von α -

Toxin eine Sepsis induziert, die eine massive Hyperpermeabilität und Herz-Kreislaufversagen bei 53 Prozent der Versuchstiere auslöste. Die Behandlung dieser Ratten mit ADM konnte die Mortalitätsrate in dem Beobachtungszeitraum von sechs Stunden von 53 auf 7 Prozent senken (47). Diese Daten weisen darauf hin, dass die Reduktion der endothelialen Hyperpermeabilität durch ADM einen wichtigen Mechanismus für die verbesserte Überlebenschance darstellt.

Weitere Studien an Patienten mit Sepsis/schwerer Sepsis müssen zeigen, inwiefern ADM therapeutisch in diesem Krankheitsbild eingesetzt werden und zu einer Senkung der Mortalitätsrate beitragen kann.

Die Vielzahl der oben erwähnten zellulären Signal- und Regulationsmechanismen zeigt die Komplexität der endothelialen Hyperpermeabilität. Viele Fragestellungen in Bezug auf die Bedeutung der Junctionsproteine im septischen Krankheitsbild und der möglichen Anwendung von ADM in der Therapie sind hierbei noch offen und die Zusammenhänge unverstanden. Für die Entwicklung zukünftiger Interventionen ist das Verständnis der endothelialen Barriereregulation jedoch unverzichtbar.

2.7 Fragestellungen der Arbeit

Es wurde die Auswirkung von α -Toxin, welches einen bedeutenden Virulenzfaktor für die Entstehung der Hyperpermeabilität in der *S. aureus*-induzierten Sepsis darstellt, auf die Integrität von Junctionsproteinen in Endothelzellen untersucht. Ferner wurde geprüft, ob das endogene Peptid Adrenomedullin α -toxinassoziierten Barrierestörungen entgegenwirken kann. Folgende Fragen wurden bearbeitet:

1. Führt α -Toxin zu einer kapillar endothelialen Lückenbildung *ex vivo* und ist diese durch ADM blockierbar?
2. Führt α -Toxin zu einer Störung der interendothelialen Expression der Junctionsproteine VE-Cadherin beziehungsweise Occludin und konsekutiver interendothelialer Lückenbildung *in vitro*?
3. Kann ADM die α -toxininduzierte interendotheliale Lückenbildung *in vitro* verhindern?
4. Welche molekularen Signalwege partizipieren an der α -toxininduzierten Hyperpermeabilität?

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Versuchsmaterialien

In der Immunhistologie wurden für VE-Cadherin die aus der Ziege gewonnenen monoklonalen gegen das Immunglobulin (Ig) der Ratte gerichteten Antikörper (AK) der Firma Santa Cruz Biotech (Hamburg, Deutschland) sowie der F(ab)₂ Peroxidase konjugierte AK von Rockland (Pennsylvania, USA) verwendet.

Zur Darstellung in der Immunfluoreszenz kamen als human bindende Primärantikörper der monoklonale, aus der Maus stammende, VE-Cadherin-AK und der polyklonale, aus dem Kaninchen stammende, Occludin-AK zum Einsatz. Die aus der Ziege stammenden Sekundärantikörper (sAK), je nach Primärantikörper (pAK) gegen Maus-IgG oder Kaninchen-IgG gerichtete AK, F(ab)₂ Alexa 488 und Phalloidin Alexa 546 wurden von der Firma Molecular Probes (Leiden, Niederlande) bezogen, siehe dazu Tabelle 2.

Tab. 2: Verwendete Antikörper		
Bezeichnung	Charakterisierung	Hersteller
pAK VE-Cadherin	monoklonales Maus-IgG spezifisch für die VE-Cadherin-Variante der Ratte	Santa Cruz Biotech
pAK VE-Cadherin	monoklonales Maus-IgG spezifisch für die humane VE-Cadherin-Variante	Chemicon
pAK Occludin	monoklonales Kaninchen-IgG spezifisch für die humane Occludin-Variante	Zymed
sAK Alexa Fluor A 488	polyklonales Ziegen-IgG spezifisch für Maus-IgG	Molecular Probes
sAK Alexa Fluor A 488	polyklonales Ziegen-IgG spezifisch für Kaninchen-IgG	Molecular Probes

Das bovine Serumalbumin (BSA), Triton X-100, Tween-20, normales Ziegen- und Kaninchenserum sowie Methylgrün wurden von der Firma Sigma Chemical hergestellt.

Für die Kultur der Endothelzellen wurde das Endotheliale Basal Medium und die phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) von der Firma PAA (Cölbe, Deutschland) bezogen. Das fetale Kälberserum, der endotheliale Wachstumsfaktor, Hanks-Puffer, die

Trypsin-EDTA-Lösung und die Antibiotika wurden von der Firma Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland) geliefert. Die Kollagenase stammte von der Worthington Biochemical Corp (Freehold, N.Y.). Gelatine und Paraformaldehyd kamen von der Firma Sigma Chemical (München, Deutschland). Das verwendete α -Toxin entstammte dem Bakterium *S. aureus*, Stamm Wood 46 (149), und wurde wie Zardaverin, Forskolin und Thrombin ebenfalls von der Firma Sigma Chemical bezogen. Das humane Adrenomedullin lieferte Calbiochem (Hamburg, Deutschland). Der Rho-Kinase-Inhibitor (Y-27632) wurde von der Firma Yamanoshi (Kyoto, Japan) bezogen. Die spezifische permanente inhibitorische Kinase (PIK) für MLCK wurde von Jerrold R. Turner, Universität von Chicago, zur Verfügung gestellt (150). Die Messung des trans-endothelialen elektrischen Widerstandes erfolgte mittels eines Systems zur Messung der elektrischen Impedanz der Firma Applied BioPhysics Troy (New York, USA). Der RhoA-Aktivitäts-G-LISA stammte von der Firma Cytoskeleton (Denver, USA).

3.1.2 Mikroskopie

Die Thermanoxplättchen wurden von der Firma Nunc (Wiesbaden, Deutschland) und das Permafluor-Eindeckmedium von der Firma Beckman Coulter (Marseille, Frankreich) hergestellt. Die Deckgläser und Objektträger produzierte die Firma Plano (Wetzlar, Deutschland). Bei dem Mikroskop (LSM5 Pascal) und den zugehörigen optischen Komponenten handelte es sich um Anfertigungen der Firma Zeiss (Jena, Deutschland). Ebenfalls aus dem Hause Zeiss kamen die Dokumentationskamera, eine gekühlte Graustufenkamera Typ MRm sowie die zugehörige Software Axio Vision 4.4. Die digitalen Bilder wurden durch Image Pro Plus 4.5 der Firma Media Cybernetics (Silver Springs, USA) erstellt.

3.2 Methoden

3.2.1 Präparation des isolierten Rattendarms

Die Präparation des isolierten Ileums der Ratte wurde nach dem Protokoll für Kaninchen abgewandelt (151). Es wurden erwachsene männliche Sprague-Dawley Ratten (Harlan-Winkelmann GmbH, Borchon) mit einem durchschnittlichen Gewicht von 350 bis 400 g verwendet. Nach einer Nahrungskarenz von 12 Stunden wurde das Narkotikum verabreicht und die Tiere mit Heparin antikoaguliert. Als Flüssigkeitssubstitution erhielten sie eine Kochsalzlösung. Die Tiere wurden

tracheotomiert und mit Raumluft beatmet. Danach wurde das distale Ileum isoliert und zwei Silikonröhren in das Darmlumen eingeführt. Die Arteria mesenterica superior (SMA) und die Vena mesenterica superior (SMV) wurden freigelegt und alle kollateralen Äste abgetrennt. Die SMA wurde kanüliert und mit vier Grad kaltem modifiziertem Krebs-Henseleit Puffer perfundiert. Nach Beendigung einer 15-minütigen Waschphase wurde die SMV ebenfalls kanüliert und anschließend die Tiere mittels Anästhetika- und Kaliuminfusion getötet.

Der isolierte Darm wurde gewogen und in einem warmen Bad aus Krebs-Henseleit Puffer platziert. Der Durchfluss wurde auf einen Durchschnittswert von $79,6 \pm 2,3$ ml/100 g Gewebe/Minute erhöht und die Temperatur des Perfusates auf 37 Grad angehoben. Das Perfusat wurde ersetzt durch einen modifizierten Krebs-Henseleit Puffer, der gereinigte Rindererythrozyten (Hämoglobingehalt [Hb] $9,1 \pm 0,1$ g/L) und 80 g/L Hydroxyethylstärke Lösung enthält. Um die Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, wurde ein Plattenoxygenator benutzt. Während des gesamten Versuchs wurden die Darmsegmente nur in einer Fließrichtung perfundiert, um einen Rückfluss des Toxins oder vom Darm selbst abgegebener Mediatoren zu verhindern.

Den insgesamt vier Gruppen, bestehend aus jeweils drei Versuchstieren, wurde über die A. mesenterica superior die jeweiligen Substanzen und Stimuli injiziert. Die isolierten Darmteile der ersten und zweiten Gruppe dienten als Kontrollgruppen und wurden mit modifiziertem Krebs-Henseleit Puffer bzw. $0,1 \mu\text{M}$ ADM für 30 Minuten gespült, bevor das Gewebe prozessiert wurde. Die Därme der dritten Gruppe erhielten einen Bolus mit $1 \mu\text{g}$ α -Toxin und wurden ebenfalls nach 30 Minuten weiterverarbeitet. Die vierte Gruppe erhielt einen Bolus mit $1 \mu\text{g}$ α -Toxin, wobei fünf Minuten vor Toxingabe die $0,1 \mu\text{M}$ ADM-Infusion gestartet und für 30 Minuten fortgesetzt wurde. Alle Präparate wurden direkt nach Versuchsende nach 30 Minuten entnommen und der mikroskopischen Aufarbeitung zugeführt. Die Übersicht der verschiedenen Versuchsgruppen wird in Tabelle 3 dargestellt:

Tab. 3: Versuchsgruppen der isoliert perfundierten Rattendärme			
Stimulus	Versuchsablauf	Konzentration	Anzahl (n)
Kontrolle	30 Minuten kontinuierlich	modifizierter Krebs-Henseleit Puffer	3
ADM	-5 bis 30 Minuten kontinuierlich	0,1 μ M	3
α -Toxin	Bolus zum Zeitpunkt 0 und Verarbeitung nach 30 Minuten	1 μ g	3
ADM + α -Toxin	-5 bis 30 Minuten kontinuierliche ADM-Infusion; α -Toxinbolus bei Zeitpunkt 0; Verarbeitung nach 30 Minuten	0,1 μ M ADM 1 μ g α -Toxin	3

Alle Tiertötungen und Organversuche wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales, Referat C, Postfach 31 0929, 10639 Berlin am 26. April 2001 genehmigt (Tierversuchsantragsnummer: T 0050/01) und streng nach den Richtlinien zur Umsetzung des Tierschutzgesetzes an der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

3.2.2 Konfokale Immunhistologie

Die Aufarbeitung des Darmgewebes erfolgte unmittelbar nach dem operativen Eingriff. Die Resektate wurden auf flüssigem Stickstoff in O.C.T Tissue-Tek eingefroren und bei -80 Grad gelagert. Sämtliche Präparate wurden in einem Kryostaten der Firma Microm (HM 560) bei -20 Grad auf 10 μ m geschnitten und auf Poly-L-Lysin beschichtete Glasobjektträger aufgezogen. Nach zwei Stunden Trocknungszeit in einer staubfreien Kammer wurden die Schnitte bis zur immunhistologischen Bearbeitung bei -80 °C in Kryoboxen archiviert.

Es wurden drei bis fünf repräsentative Schnitte aus den vier Versuchsgruppen (Kontrolle, ADM, α -Toxin, ADM und α -Toxin) von jeweils drei Tieren pro Gruppe, ausgewählt und gefärbt. Nach einer 5-minütigen Fixierung in 3 % Paraformaldehyd bei pH 7,6 wurden die Schnitte „3x5“ Minuten in 0,01 M PBS ausgewaschen. Dann erfolgte die Permeabilisierung mit 1 % TritonX-100 in 0,01 M PBS für 15 Minuten. Für die 30-minütige Blockade wurde das Blockademedium bestehend aus 0,05 % Tween, 20,1 % BSA sowie 5 % Wirtsserum des sAK und 0,01 M PBS verwendet. Die Inkubation

mit dem pAK spezifisch für die VE-Cadherin-Variante der Ratte (1:100) in 1 % BSA, 0.05 % Tween 20 und 0,01 M PBS erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur.

Die Immunreaktion für VE-Cadherin wurde durch die Grünfluoreszenz Alexa 488 dargestellt. Dafür wurden die Schnitte nach Waschung in PBS mit dem korrespondierenden sAK-Alexa 488 (1:6.000) erneut über Nacht bei vier Grad inkubiert und abschließend dreimal mit PBS für fünf Minuten gereinigt. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) der Firma Sigma zur Darstellung der Gewebestruktur. Die Kontrollfärbung wurde ohne den pAK und den Austausch durch unspezifisches Serum bei gleicher Verdünnung durchgeführt. Anschließend wurden die Präparate mit Permafluor-Eindeckmedium eingedeckelt, mit einer Lackschicht versiegelt und der konfokalen Mikroskopie zugeführt.

3.2.3 Mikroskopische Evaluierung und Bilddokumentation der Immunhistologie

Die Auswertung der immunhistologischen Präparate erfolgte ebenfalls mittels Konfokalmikroskopie. Es wurden aus den vier Versuchsgruppen jeweils fünf unabhängige Experimente durchgeführt und drei repräsentative Abschnitte des Ileums pro Versuchsreihe mikroskopisch evaluiert, woraus drei bis sechs repräsentative Bereiche photographiert wurden. Um die volle morphologische Ausprägung des kapillären VE-Cadherins beurteilen zu können, wurden Z-Stapelbilder der 10 µm Gewebstiefe angefertigt und jeweils zu einem Bild zusammengefügt. Für Fluoreszenzmikroskopie wurden das Axioskop 2 mot, das Objektiv PlanNeoFluar 63 x mit Filtern für FITC, DAPI sowie der differenzielle Interferenzkontrast (DIC) verwendet.

3.2.4 Messung des trans-endothelialen elektrischen Widerstands

Die Messungen des trans-endothelialen elektrischen Widerstandes erfolgten mit Hilfe der Elektrischen Zell-Substrat Impedanz Sensing-Technik (ECIS) (Applied BioPhysics Inc, Troy, New York, USA). Dieses elektrochemische Verfahren beruht auf der Messung des Wechselstromwiderstandes einer mit Zellen bedeckten Goldelektrode. Es ermöglicht die biophysikalische Charakterisierung von adhärennten Zellmonolayern hinsichtlich des Zustandes der Zellform, ihrer parazellulären Barrierefunktion sowie der elektrischen Kapazität der Plasmamembranen mit hoher zeitlicher Auflösung (58;152). Zur Durchführung der ECIS-Messungen wurden die Endothelzellen auf Goldelektroden-Arrays der Firma Applied BioPhysics Inc. (Troy, USA) kultiviert, die aus Kulturschalen

mit acht Vertiefungen (wells) bestehen. Jede der Kammern enthält eine Gold-Mikroelektrode (Oberfläche 10^{-3} cm^2) und eine große Gold-Gegenelektrode (1 cm^2), die mit einem phasensensitiven „lock-in“-Verstärker verbunden sind (58;153). Die Gegenelektrode wurde im Vergleich zur Arbeitselektrode 300-fach größer gewählt, damit deren Impedanzbeiträge im Vergleich zur Arbeitselektrode vernachlässigt werden können. Das gesamte Array ist mit einer Polymerschicht überzogen. Nur die Arbeitselektroden, Gegenelektrode und Kontaktpunkte wurden mittels Photolithographie von der Polymerschicht befreit. Die Messkammern wurden während des gesamten Experiments in einem Brutschrank bei 37 Grad und 5 % Kohlendioxid in wasserdampfgesättigter Atmosphäre aufbewahrt.

Es wurde eine Wechselspannung mit 4000 Hz und einer Spannung von 10 mV in Reihe mit einem 1 M Ω Widerstand angelegt. Dadurch konnte eine nahezu konstante Stromquelle ($\sim 1 \text{ }\mu\text{A}$) erzielt werden. Die gleichphasigen und gegenphasigen Spannungen zwischen den Elektroden wurden in Echtzeit mit dem eingeschlossenen Verstärker gemessen und anschließend in Widerstände umgewandelt, um somit skalare Messwerte der trans-endothelialen Impedanz zu erhalten.

Für die Messungen wurden nach 15-minütiger Erfassung des Ausgangswiderstandes („steady state“) die jeweiligen Stimulationen durchgeführt. Die Endothelzellen wurden jeweils mit 1 μM ADM, 2 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin bzw. 1 U/ml Thrombin für 45 Minuten stimuliert. Die Vorinkubation mit 1 μM ADM erfolgte 15 Minuten vor der 2 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin- bzw. 1 U/ml Thrombingabe und die Messung wurde danach für 45 Minuten fortgeführt. Die Widerstandsänderungen wurden insgesamt über einen Zeitraum von 75 Minuten erfasst. Dabei wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuchsreihen durchgeführt. Dies wird in der Tabelle 4 zusammengefasst.

Tab. 4: Messung des trans-endothelialen elektrischen Widerstands			
Stimulus	Versuchsdauer	Konzentration	Anzahl (n)
ADM	Bolus nach 15 Minuten „steady state“ und Messung für weitere 60 Minuten	1 μM	3
α -Toxin	Bolus nach 30 Minuten „steady state“ und Messung für weitere 45 Minuten	2 $\mu\text{g/ml}$	3
ADM + α -Toxin	ADM-Bolus nach 15 Minuten „steady state“ und nach weiteren 15 Minuten	1 μM ADM + 2 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin	3

	Zugabe von α -Toxin und Messung für weitere 45 Minuten		
Thrombin	Bolus nach 30 Minuten „steady state“ und Messung für weitere 45 Minuten	1 U/ml	3
ADM + Thrombin	ADM-Bolus nach 15 Minuten „steady state“ und nach weiteren 15 Minuten Zugabe von Thrombin und Messung für weitere 45 Minuten	1 μ M ADM + 1 U/ml Thrombin	3

3.2.5 Isolation und Kultur von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene

Die Nabelschnüre stellte freundlicherweise die Geburtshilfe-Abteilung des Vivantes Humboldt-Klinikums in Berlin zur Verfügung. Aus diesen wurden die HUVECs nach einem modifizierten Protokoll des Jaffé-Verfahrens isoliert (154). Die Nabelschnüre wurden kanüliert (Braunule R, 18 G, Braun Melsungen), mit sterilem Hanks-Puffer gespült und für 20 Minuten mit 0,025 % Kollagenase Typ II gefüllt. Durch Massieren ließen sich die Zellen lösen und wurden mit Medium 199 ausgespült. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 350 g wurde die Primärkultur in MCDB 131 mit 10 % hitzeinaktivierten fetalen Kälberserum im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) angelegt.

Die konfluenten Zellen wurden (nach vier bis fünf Tagen) auf 24-Well-Platten gesplittet, die für eine Stunde in 0,5 %-iger Gelatinelösung vorbehandelt wurden. Dafür wurden die Endothelzellen mit sterilem PBS -/- gewaschen, mit 0,5 % Trypsin-EDTA abgelöst, und in 70 % MCDB 131 mit 30 % Endothelial Cell Growth Medium gegeben. Nach drei bis vier Tagen wuchsen die Endothelzellen zu einer zusammenhängenden Zellschicht zusammen.

Die konfluenten Monolayer wurden für die jeweiligen Versuchsreihen verwendet, wobei jeweils mindestens drei bis maximal fünf unabhängige Experimente mit Duplikaten pro Stimulus durchgeführt wurden. Die Stimulation mit 2 μ g/ml α -Toxin bzw. 0,75 U/ml Thrombin erfolgte für 15 Minuten. Daneben wurden in weiteren Versuchsreihen verschiedene Stimulantien vor der α -Toxin- bzw. Thrombingabe appliziert und über unterschiedliche Zeiträume inkubiert:

Die Vorinkubation der Zellen mit 1 μ M ADM erfolgte 15 Minuten vor der α -Toxin- bzw. Thrombingabe. In weiteren Versuchen wurden 10 μ M Zardaverin und 1 μ M Forskolin 20 Minuten und 5 Minuten vorher zugegeben. Außerdem wurden 10 μ M des Rho-

Kinase-Inhibitor Y-27632 für 30 Minuten und 300 μM von PIK über 1 Stunde eingesetzt. Danach wurden alle Präparate sofort für die Immunfluoreszenzfärbung weiterprozessiert (Tab.5).

Tab. 5: Stimulationsabläufe der Endothelzellen			
Stimulus	Versuchsablauf	Konzentration	Anzahl (n)
Kontrolle	Angepasst an die Versuchsdauer der Einzelexperimente	Zellmedium	3 - 5
α -Toxin	15 Minuten	2 $\mu\text{g/ml}$	3 – 5
Thrombin	15 Minuten	0,75 U/ml	3 – 5
ADM	15 Minuten	1 μM	5
Zardaverin/Forskolin	20 Minuten/5 Minuten	10 μM /1 μM	3
MLCK-Inhibitor PIK	60 Minuten	300 μM	3
Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632	30 Minuten	10 μM	3
ADM + α -Toxin	15 Minuten ADM, danach α -Toxin für 15 Minuten	1 μM ADM 2 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin	5
Zardaverin/Forskolin + α -Toxin	20/5 Minuten Zardaverin/Forskolin, danach α -Toxin für 15 Minuten	10 μM /1 μM Zardaverin/Forskolin 2 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin	3
MLCK-Inhibitor PIK + α -Toxin	60 Minuten PIK, danach α -Toxin für 15 Minuten	300 μM PIK 2 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin	3
Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 + α -Toxin	30 Minuten Y-27632, danach α -Toxin für 15 Minuten	10 μM Y-27632 2 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin	3

3.2.6 Konfokale Immunfluoreszenz

Die humanen Endothelzellen wurden nach einem zuvor für die jeweiligen Antikörper-Antigen-Reaktionen erarbeiteten Protokoll gefärbt. Beachtung fanden hier die pAK und sAK sowie die Notwendigkeit der Permeabilisierung der Zellmembran. Die Fixierung in 3 % Paraformaldehyd bei pH 7,6 für 20 Minuten gewährleistete die Haltbarkeit der Endothelzellen während der Immunfluoreszenzfärbung. Das Fixans wurde durch eine

dreimalige Spülung mit 0,01 M PBS ausgewaschen. Anschließend wurde mit 1 % TritonX-100 in 0,01 M PBS für 15 Minuten permeabilisiert. Zur Blockade falsch-positiver Antikörperbindungen wurden die Zellen danach für 30 Minuten mit Blockademedium, bestehend aus 0,05 % Tween 20, 1 % BSA und 5 % Wirtsserum des sAK, inkubiert. Ohne das Wirtsserum wurde dieses Medium auch für die Verdünnung des pAKs und des Phalloidins verwendet. Nach drei weiteren Waschungen der Zellen in Spülpuffer (0,01 M PBS pH 7,6) wurden sie über Nacht bei vier Grad mit dem pAK für die humane VE-Cadherin-Variante (1:100) bzw. humane Occludin-Variante (1:100) inkubiert. Nach einer erneuten dreimaligen Waschung mit dem oben genannten Spülpuffer, wurde die Färbung mit dem sAK, je nach pAK, entweder mit Ziegen-IgG-AK für Maus-IgG Alexa 488 (1:6.000) oder Ziegen-IgG-AK für Kaninchen-IgG Alexa 488 (1:8.000) anschließend in gleicher Weise durchgeführt. Danach erfolgte eine 3-malige PBS-Waschung. Für die Darstellung von F-Aktin mit Phalloidin Alexa 546 (1:200) wurden die Zellen 30 Minuten bei vier Grad inkubiert. Die Kontrollfärbung wurde ohne den pAK im Austausch durch unspezifisches Serum bei gleicher Verdünnung durchgeführt. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gereinigt und die Thermanoxplättchen auf Objektträger mit der Zellschicht nach oben verteilt. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurde ein Tropfen Thermofluor zwischen die Zellen und die Deckgläser gegeben und anschließend die Ränder mit einer Schicht Nagellack versiegelt.

3.2.7 Mikroskopische Evaluierung und Bilddokumentation der Immunfluoreszenz

An die immunfluoreszente Färbung schlossen sich die konfokalmikroskopische Auswertung und Bilddokumentation an. Alle Werte (Kontrollen und Stimulationen) wurden als Dubletten angefertigt, die mit jeweils mindestens drei repräsentativen Bildern dokumentiert wurden. Die Lasereinstellung richtete sich nach den verwendeten jeweiligen sAK-Alexa 488 für VE-Cadherin und Occludin sowie sAK-Alexa 546 für die F-Aktin-Färbung.

3.2.8 G-LISA für RhoA-Aktivierung in HUVECs

Die RhoA-Aktivierung wurde mittels spezifischen G-LISA in HUVEC-Monolayern analysiert. HUVECs wurden in 6-Well-Platten gezüchtet und mit 2 µg/ml α -Toxin für 5, 10, 15 und 20 Minuten stimuliert. Thrombin wurde mit einer Konzentration von 2 U/ml für zwei Minuten eingesetzt. Ferner erfolgten Kontrollen mit Spülpuffer und einem

RhoA-Standardprotein. Die Proteinkonzentrationen wurden abgeglichen und die Pufferkontrollwerte von den tatsächlichen Werten abgezogen. Das kitinterne aktive RhoA-Standardprotein wurde für jedes Experiment auf 100 % gesetzt und die drei Gruppen in Relation zu dieser internen Kontrolle betrachtet. Vier unabhängige Versuche wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt, wobei für die α -Toxinstimulation nur drei Messungen verwertet werden konnten.

3.2.9 Statistische Analyse

Die Ergebnisse der letzten vier bzw. drei (für α -Toxin) unabhängigen Versuche des RhoA-Aktivierungsassays werden mit dem arithmetischen Mittel \pm SEM gezeigt. Für den Paarvergleich von Thrombin zur Kontrolle wurde der Rangsummentest Mann-Whitney U-Test benutzt. Dabei wurde $p < 0,05$ als signifikant betrachtet und durch einen Stern markiert.

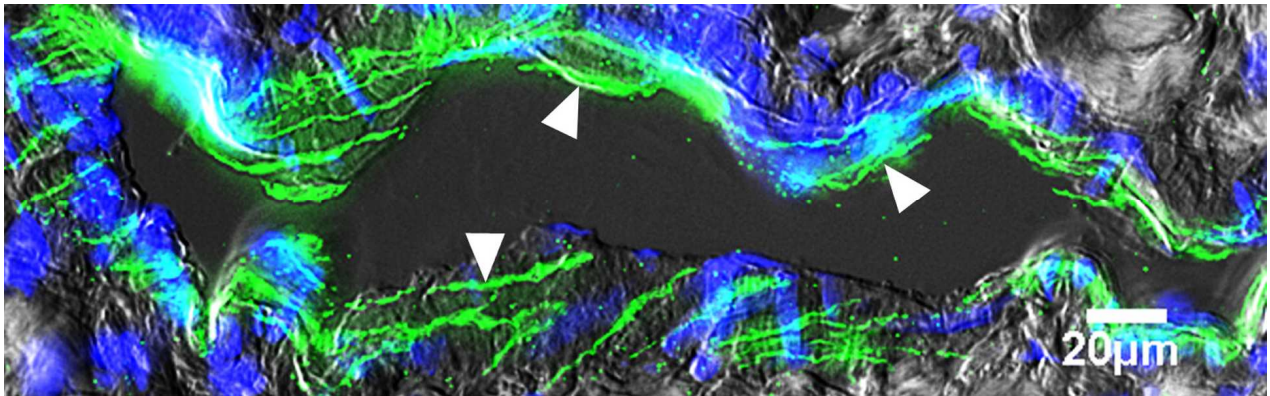
4 Ergebnisse

4.1 VE-Cadherin im isoliert perfundierten Rattendarm

4.1.1 Darstellung der regelrechten interendothelialen VE-Cadherin-Expression

In einer vorausgegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte am Modell des isoliert perfundierten Rattenileum gezeigt werden, dass *S. aureus* α -Toxin zu einer massiven endothelialen Hyperpermeabilität und zu einem erhöhten Perfusionsdruck, einhergehend mit einem Abfall der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins in der Darmschleimhaut führte (44). Die Vorinkubation von HUVECs mit ADM konnte konzentrationsabhängig die durch α -Toxin gesteigerte Flüssigkeitsdurchlässigkeit der endothelialen Zellkultur blockieren. Ferner hob ADM die durch α -Toxin verursachten Störungen der Mikrozirkulation auf (44). Da die Störung der endothelialen Barriere zur Hyperpermeabilität des Endothels führte, wurde angenommen, dass es nach Perfusion mit α -Toxin zu morphologischen Veränderungen an den interendothelialen Junctionen kommt und diese durch die Vorinkubation mit ADM verhindert werden könnten.

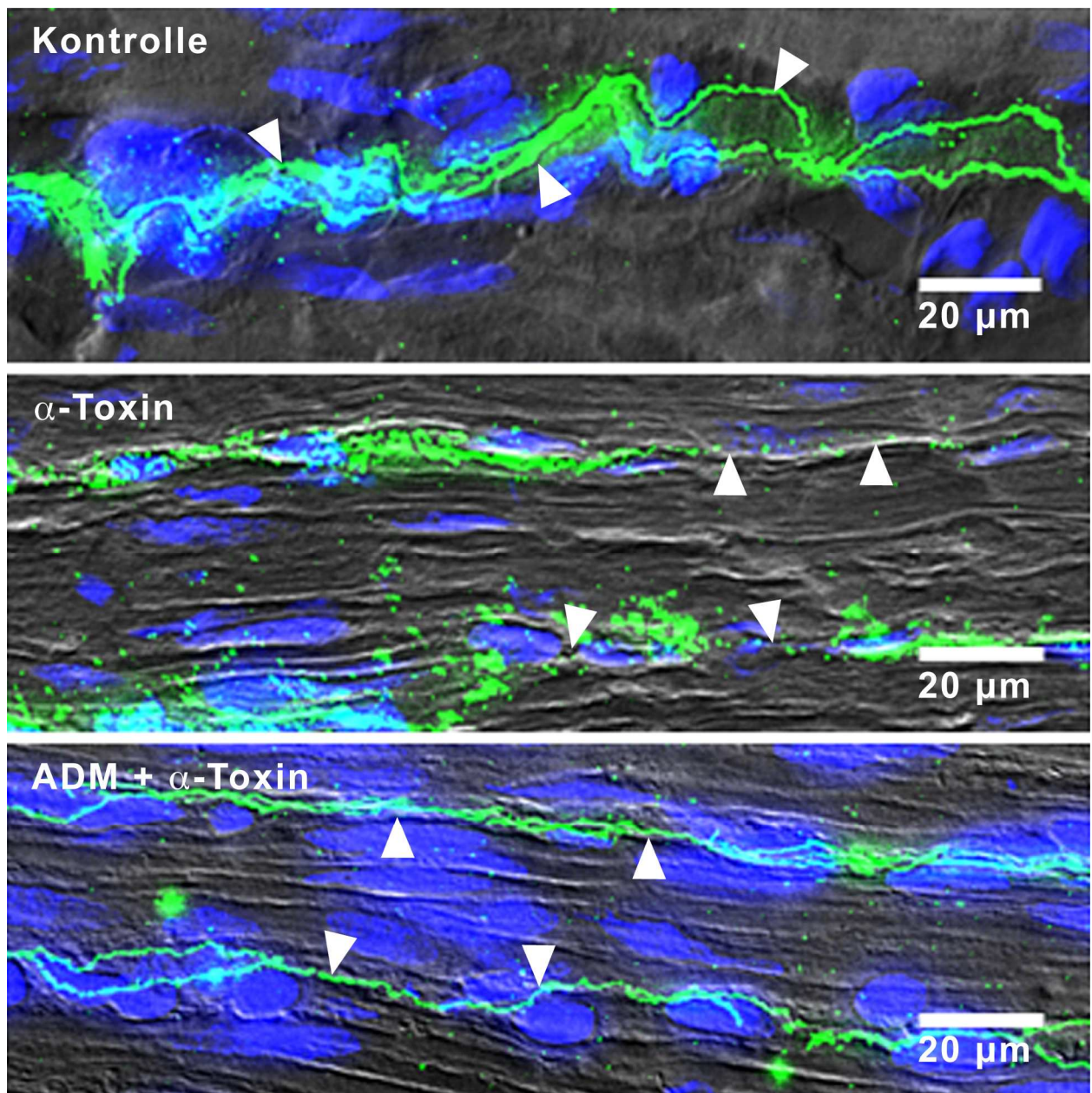
Für den *in situ* Nachweis der junctionalen Struktur wurde das endothelspezifische AJ-Protein VE-Cadherin ausgewählt. Die methodische Etablierung wurde zunächst durch den mikroskopischen Nachweis des Expressionsmusters von interzellulärem VE-Cadherin in Gefäßen der Tunica submucosa in Rattendärmen unter physiologischen Bedingungen getestet. Wie in Abbildung 3 dargestellt, demonstriert der konfokale mikroskopische Nachweis von VE-Cadherin in Längsrichtung der Gefäße den intakten Zustand des interendothelialen Kontaktes in drei voneinander unabhängigen Versuchen unter physiologischer Pufferlösung für 30 Minuten. Da in Kapillaren jedoch lediglich ein bis zwei Endothelzellen die innere Auskleidung eines Querschnitts bilden, ist bei deren Visualisierung mit einer entsprechend geringeren Anzahl von VE-Cadherinbändern in Längsrichtung zu rechnen.

**Abb. 3**

Regelrechte Anordnung von gefärbten VE-Cadherin entlang der endothelialen Verbindungen in einem kleinen Gefäß der Submukosa des Rattenileums. Die Kontrolldärme wurden für 30 Minuten mit Puffer gespült. VE-Cadherin ist grün (Alexa 488) gefärbt, die Zellkerne stellen sich blau (DAPI) dar und das umliegende Gewebe ist grau (DIC). Es zeigt sich eine kontinuierliche Verteilung an VE-Cadherin (Pfeilspitzen). Repräsentative Ausschnitte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen werden gezeigt.

4.1.2 Darstellung der VE-Cadherin-Expression nach α -Toxinstimulation

Für den konfokalmikroskopischen Nachweis des kapillaren VE-Cadherins wurden Bereiche der intestinalen Tunica muscularis betrachtet (Abb. 4). Die Vorbehandlung der Därme erfolgte für die Kontrollpräparate mit Kontrollpuffer beziehungsweise $0,1 \mu\text{M}$ ADM für 30 Minuten. Zur Untersuchung des Einflusses von α -Toxin auf die junctionale Expression von VE-Cadherin wurden die Därme mit $1 \mu\text{g}$ Toxin, $0,1 \mu\text{M}$ ADM sowie in Kombination perfundiert und auf Veränderungen des interzellulären VE-Cadherin mikroskopisch evaluiert. In den Kontrollpräparaten zeigte die immunhistologische Färbung des VE-Cadherins eine reguläre junctionale Organisation der Endothelzellen in den intestinalen Kapillaren (Abb. 4, Kontrolle, ADM wird nicht gezeigt, da identisch). Dreißig Minuten nach einer Bolusgabe von $1 \mu\text{g}$ α -Toxin zeigte sich in der VE-Cadherin-Färbung eine Unterbrechung und Auflösung des längsgerichteten VE-Cadherinbandes, wodurch die Bildung interendothelialer Lücken indiziert wird (Abb. 4, α -Toxin). Die 5-minütige Vorinkubation der Därme mit ADM vor α -Toxingabe und Fortführung der Infusion über 30 Minuten zeigte jedoch, dass die α -toxininduzierte Auflösung und somit eine interendotheliale Lückenbildung des VE-Cadherinbandes erfolgreich verhindert werden konnte (Abb. 4, ADM + α -Toxin). Dies lässt auf eine Stabilisierung des junctionalen VE-Cadherins und somit auf eine Prävention einer α -toxininduzierten Hyperpermeabilität durch ADM im Kapillarbett von Rattendärmen schließen.

**Abb. 4**

ADM reduzierte den Verlust von VE-Cadherin in α -toxinbehandelten isolierten Rattendärmen. VE-Cadherin ist grün (Alexa 488) gefärbt, die Zellkerne stellen sich blau (DAPI) dar und das umliegende Gewebe ist grau (DIC). Mit Kontrollpuffer (**Kontrolle, oberes Bild**) sowie mit 0,1 μ M ADM (hier nicht gezeigt, da identisch mit Kontrolle) für 30 Minuten behandelten Darmteile zeigen eine kontinuierliche Verteilung an VE-Cadherin (Pfeilspitzen) in den Kapillaren der Tunica muscularis. Dreißig Minuten nach der Applikation eines Bolus von 1 μ g *S. aureus* α -Toxin in die A. mesenterica superior wurde das Gewebe prozessiert und die VE-Cadherin-Färbung angeschlossen (**α -Toxin, mittleres Bild**). Die unterbrochene Darstellung an VE-Cadherin (Pfeilspitzen) lässt auf einen Verlust und eine Auflösung der endothelialen Zell-Zellkontakte schließen. Wird die ADM-Infusion fünf Minuten vor der α -Toxingabe (**ADM und α -Toxin, unteres Bild**) begonnen und für 30 Minuten fortgeführt, kann der durch α -toxininduzierte Verlust an interendothelialem VE-Cadherin verhindert werden. VE-Cadherin stellt sich wieder als kontinuierliches Band dar (Pfeilspitzen). Repräsentative Ausschnitte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen werden gezeigt.

4.2 Trans-endothelialer elektrischer Widerstandsverlust nach α -Toxinstimulation

Der trans-endotheliale elektrische Widerstand (TER) wurde zur Messung der Störung der endothelialen Barrierefunktion verwendet. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt wobei nur ein repräsentativer TER-Verlauf in Abbildung 5 dargestellt wird. Der elektrische Widerstand der HUVEC-Zellkultur erhöhte sich durch die Behandlung mit 1 μ M ADM in Abb. 5A im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen um circa den Faktor 1,5 und in Abb. 5B auf ungefähr den Faktor 1,3. Dagegen führte die 45-minütige Stimulation mit 2 μ g/ml α -Toxin (Abb. 5A) beziehungsweise 1 U/mL Thrombin (Abb. 5B) zu einem schnellen Abfall des elektrischen Widerstands, welcher als Erhöhung der endothelialen Permeabilität zu werten ist. In Bezug auf α -Toxin konnte die 15-minütige Vorinkubation mit ADM den elektrischen Widerstand für circa 15 Minuten stabilisieren, jedoch im Vergleich mit Thrombin das Widerstandsniveau nicht dauerhaft halten. Der thrombininduzierte Abfall konnte reduziert und das Widerstandsausgangsniveau wieder hergestellt werden. Durch diese Versuche konnten die Zeitfenster der anschließenden Untersuchungen für die Signaltransduktion festgelegt werden.

Die ADM induzierte Erhöhung des TER und somit eine Stabilisierung der interendothelialen Junktionsintegrität konnten die *ex vivo* Versuche bestätigen (Abb. 4, unteres Bild).

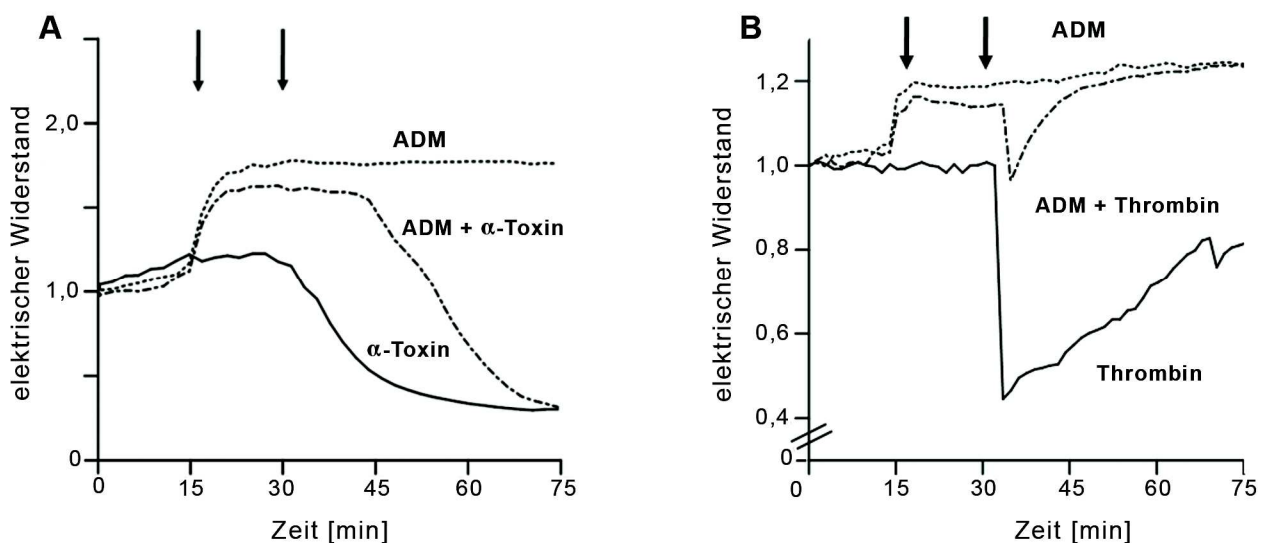


Abb. 5

ADM konnte den α -toxininduzierten Widerstandsverlust in HUVEC-Monolayern stabilisieren und nach Thrombin den Ausgangswiderstand völlig wiederherstellen. Nach einer 15-minütigen Erfassung des Ausgangswiderstandes („steady state“) wurden die jeweiligen Stimulationen durchgeführt.

A Die alleinige Behandlung mit 1 μM ADM für 60 Minuten zeigt eine anhaltende Erhöhung des elektrischen Widerstandes über das Ausgangsniveau. Unter der 45-minütigen Stimulation mit 2 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin fällt der elektrische Widerstand schnell ab, während die 15-minütige Vorinkubation der Zellen mit ADM vor der α -Toxingabe den elektrischen Widerstand steigert und den Abfall des elektrischen Widerstandes um über 15 Minuten hinauszögert. Den Abfall des elektrischen Widerstandes kann dies jedoch mittelfristig nicht verhindern. Es wird ein repräsentativer Verlauf aus mindestens drei Versuchen gezeigt.

B Die Stimulation der HUVECs mit 1 μM ADM für 60 Minuten führt ebenfalls zu einer Erhöhung des elektrischen Widerstands. Bei einer 45-minütigen Behandlung mit 1 U/mL Thrombin, zeigt sich ein schneller Abfall des elektrischen Widerstands, der sich im Verlauf erholt und wieder ansteigt, jedoch das Ausgangsniveau nicht vollständig erreicht. Die 15-minütige Vorinkubation mit ADM vor Stimulation mit Thrombin reduziert den zu Beginn starken Abfall des Widerstandes und stellt den Ausgangswiderstand nach circa 15 Minuten vollständig wieder her. Es wird ein repräsentativer Verlauf aus mindestens drei Versuchen gezeigt.

4.3 Subzelluläre Expression von Junctionsproteinen in mit α -Toxin stimulierten Endothelzellen

Um die molekularen Mechanismen von α -Toxin und ADM auf junctionale Proteine, hier VE-Cadherin (Abb. 6) und Occludin (Abb.7), besser zu verstehen, wurden die *in vivo* und die aus der trans-endothelialen Widerstandsmessung gewonnenen Ergebnisse durch weiterführende Versuche an HUVECs ergänzt. Dabei wurde die Proteinlokalisierung mittels Konfokalmikroskopie analysiert und im Vergleich zur thrombininduzierten endothelialen Permeabilität betrachtet. In den unbehandelten Kontrollen wurde eine kontinuierliche interendotheliale Expression von VE-Cadherin (Abb. 6A) und Occludin (Abb. 7A) gefunden, ohne dass interzelluläre Lücken detektiert werden konnten.

Neben der regelrechten kortikalen Expression der Junctionsproteine fand sich das periphere F-Aktin Band (rot) ebenfalls an den Zellgrenzen. Durch die Kolo-kalisation mit VE-Cadherin (grün) kommt es zu einer Überlappung der Farben von VE-Cadherin und F-Aktin (gelb).

Die 15-minütige Behandlung mit 1 μM ADM führte zu einer Verdichtung und zusätzlicher Linearisierung des kortikalen VE-Cadherins bei gleichzeitiger (Abb. 6B) Reduktion der Anzahl intrazellulärer F-Aktin-Fasern. In identischer Weise zeigte sich die kortikale Expression von Occludin in ADM behandelten HUVECs (Abb. 7B). Die 15-minütige Inkubation von HUVECs mit 2 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin, (VE-Cadherin Abb. 6C und Occludin Abb. 7C) bzw. mit 0,75 U/ml Thrombin (VE-Cadherin Abb. 6E und Occludin 7E) führte zu einer sternförmigen Zellstruktur, die durch eine reaktive F-Aktin-Stressfaserbildung (markiert durch leere Pfeilspitzen in Abb. 6E) und konsekutive Zellkontraktion begleitet wurde. Durch die Applikation permeabilisierender Stimuli kam es zu einer ausgeprägten Lückenbildung zwischen den Zellen (Pfeilspitzen in Abb. 6C),

welche durch den kortikalen Verlust der junctionalen Proteine zum Ausdruck kam. Die 15-minütige Vorbehandlung der HUVECs mit ADM verhinderte die durch α -Toxin und Thrombin ausgelöste Bildung von interendothelialen Lücken in den VE-Cadherin (Abb. 6D und 6F) sowie Occludin (Abb. 7D, 7F) gefärbten HUVECs. Jedoch fiel auf, dass ADM die thrombininduzierte Stressfaserbildung nicht reduzieren konnte (leere Pfeilspitzen in Abb. F).

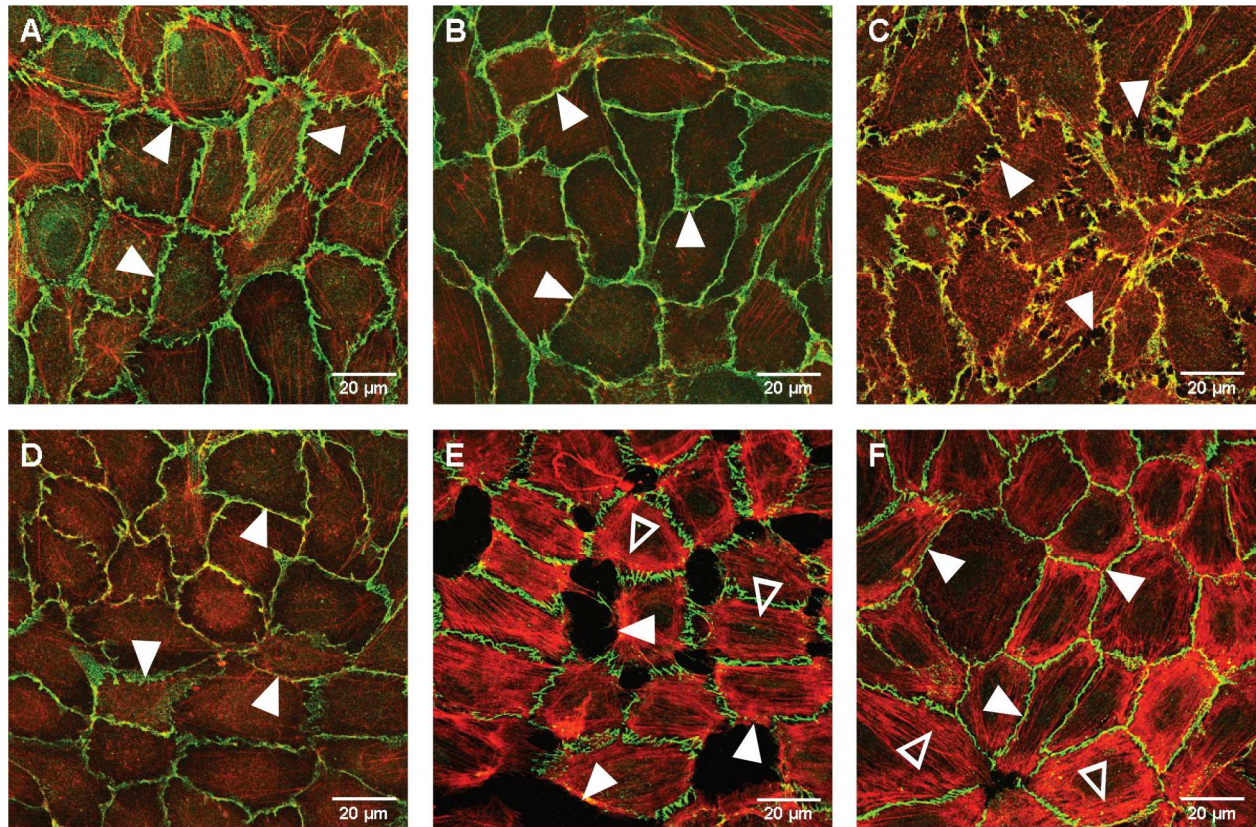
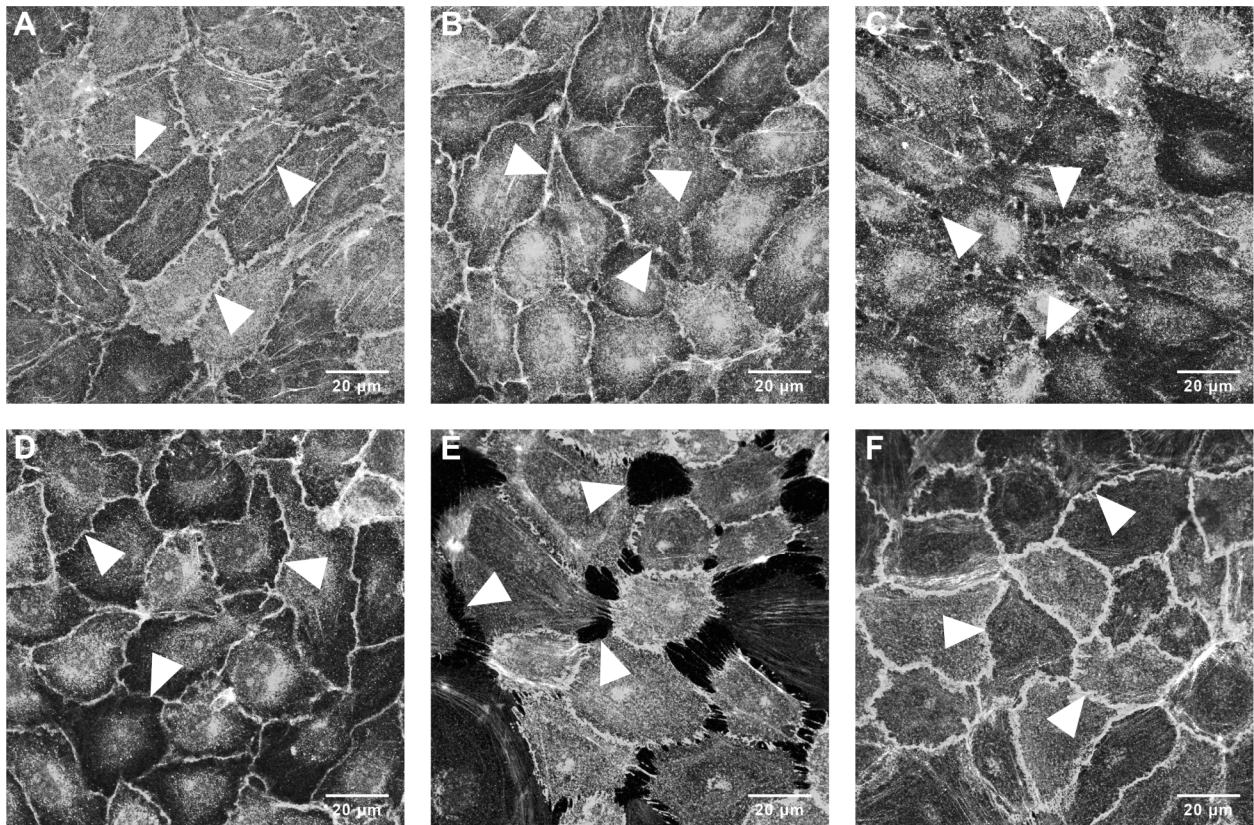


Abb. 6

ADM stabilisierte VE-Cadherin und verhinderte die Lückenbildung von den mit α -Toxin bzw. Thrombin stimulierten HUVECs. VE-Cadherin ist grün (Alexa 488), F-Aktin rot (Alexa 546) gefärbt. **A** Die für 30 Minuten mit Zellmedium behandelten Kontrollen zeigen einen intakten Monolayer, der kaum intrazelluläre Stressfasern aufweist und das periphere Aktinband sich klar aufzeichnet (Pfeilspitzen). Durch die Kolokalisation von VE-Cadherin (grün) und F-Aktin (rot) an den Zellgrenzen kommt es zu einer farblichen Überlagerung (gelb). **B** Die Exposition der Endothelzellen mit 1 μ M ADM über 15 Minuten, führt zu einer verstärkten Linearisierung des VE-Cadherin Bandes (Pfeilspitzen) sowie zu einer Reduzierung der F-Aktin Fasern. **C** Der Verlust an VE-Cadherin und die Ausbildung von Lücken (Pfeilspitzen) zwischen den Endothelzellen, treten nach einer 15-minütigen Stimulation mit 2 μ g/ml *S. aureus* α -Toxin auf. **D** Die 15-minütige Vorinkubation mit ADM vermindert den α -toxininduzierten Verlust an VE-Cadherin und die Lückenbildung (Pfeilspitzen). Es zeigen sich kaum Stressfasern. **E** Unter der Stimulation mit 0,75 U/ml Thrombin für 15 Minuten kommt es zu einem ausgeprägten Verlust an VE-Cadherin und großen interzellulären Lücken (gefüllte Pfeilspitzen). Dies ist begleitet von starker Stressfaserproduktion (leere Pfeilspitzen). **F** Die 15-minütige Vorinkubation mit ADM verhindert den durch Thrombin ausgelösten Verlust an VE-Cadherin und die Lückenbildung zwischen den Zellen (gefüllte Pfeilspitzen), jedoch nicht die thrombininduzierte Stressfaserbildung (leere Pfeilspitzen). Es wurden repräsentative Felder aus HUVEC-Monolayern aus mindestens fünf separaten Experimenten ausgewählt

**Abb. 7**

ADM stabilisierte Occludin und verhinderte die Lückenbildung der mit α -Toxin bzw. Thrombin stimulierten HUVECs. Die Schwarzweißdarstellung zeigt Occludin (hellgrau). **A** In den für 30 Minuten mit Kontrollmedium behandelten ruhenden HUVECs, stellt sich Occludin an den Zellgrenzen linear dar (Pfeilspitzen). **B** Die Exposition der Endothelzellen mit 1 μ M ADM für 15 Minuten zeigt keine morphologischen Unterschiede verglichen zu den Kontrollen. Occludin ist an den Zellgrenzen deutlich sichtbar (Pfeilspitzen). **C** Nach 15-minütiger Stimulation mit 2 μ g/ml *S. aureus* α -Toxin zeigt sich ein Verlust des Junctionsproteins (Pfeilspitzen) und es entstehen Lücken zwischen den Endothelzellen. **D** Die Vorinkubation mit 1 μ M ADM für 15 Minuten vermindert den α -toxininduzierten Verlust an Occludin sowie die Lückenbildung (Pfeilspitzen). **E** Unter 15-minütiger Stimulation mit 0,75 U/ml Thrombin kommt es zu einem ausgeprägten Verlust an Occludin und interzellulären Lücken (Pfeilspitzen). **F** Eine 15-minütige Vorinkubation mit ADM verhindert den durch Thrombin ausgelösten Verlust an Occludin (Pfeilspitzen) und die Lückenbildung zwischen den Zellen. Es wurden repräsentative Felder aus HUVEC-Monolayern aus mindestens fünf separaten Experimenten ausgewählt.

4.4. Einfluss der intrazellulären cAMP-Erhöhung auf die Junctionsprotein-expression

cAMP ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff für die Signaltransduktion in der Endothelzelle. Eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung wurde durch die Stimulierung der Adenylylzyklase, die cAMP aus ATP katalysiert, erzielt (18;131). Dies wurde mit Hilfe von 10 μ M Zardaverin und 1 μ M Forskolin erreicht (Abb.8).

Die mit Kontrollmedium behandelten Monolayer wiesen eine reguläre Anordnung der Junctionsproteine VE-Cadherin (Abb. 8A) und Occludin (Abb. 8E) sowie wenige

intrazelluläre F-Aktin-Fasern auf. Die Kombination beider Substanzen veränderte die Integrität der Monolayer im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen nicht, die Anzahl intrazellulärer F-Aktin-Fasern blieb gering (Abb. 8B, 8F). In Anwesenheit von Zardaverin/Forskolin kam es nach Stimulation mit 2 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin weder zu einem Verlust von VE-Cadherin noch traten interzelluläre Lücken auf (Abb. 8C). Die Anzahl der F-Aktin-Fasern blieb gering. In den Occludin gefärbten HUVECs zeigte sich ebenfalls eine regelrechte Anordnung des Junctionsproteins an den Zellgrenzen und es kam zu keiner Stressfaserinduktion (Abb. 8G). Im Gegensatz dazu reduzierte die Vorinkubation der HUVECs mit Zardaverin/Forskolin zwar den thrombininduzierten Verlust an Junctionsproteinen VE-Cadherin (Abb. 8D) beziehungsweise Occludin (Abb. 8H) sowie die interendotheliale Lückenbildung, konnte jedoch die Ausbildung von intrazellulären F-Aktin-Stressfasern nicht verhindern (nicht dargestellt).

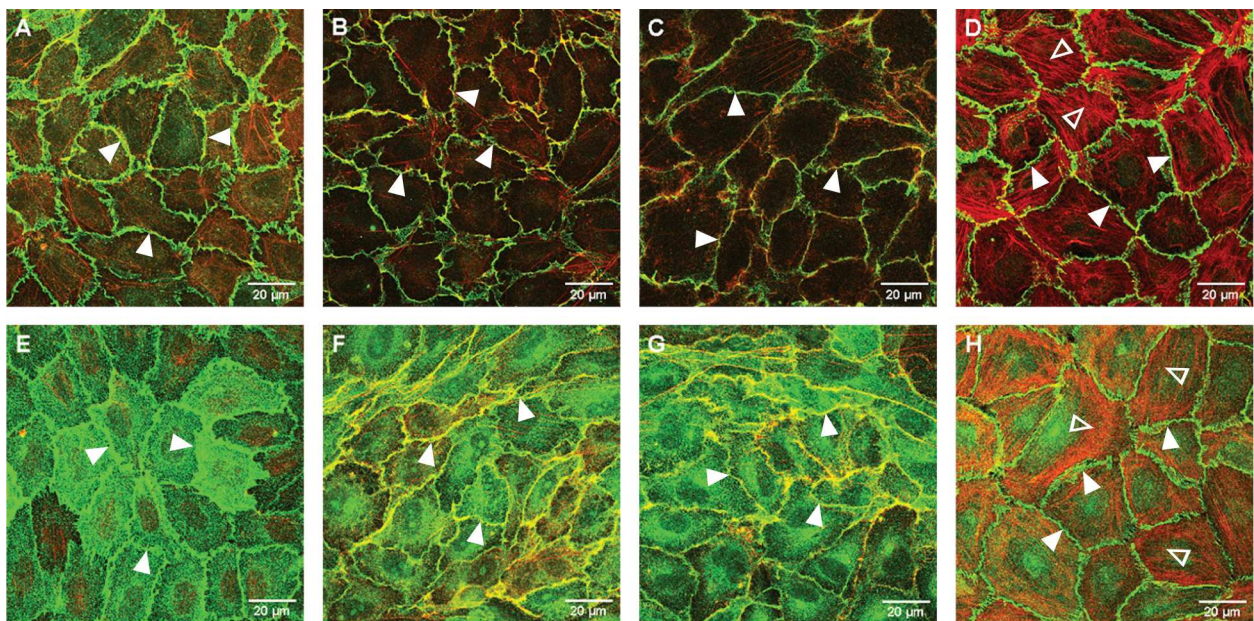


Abb. 8

Die cAMP-Erhöhung blockierte den α -toxin- und thrombininduzierten Verlust an VE-Cadherin und Occludin sowie die Zellkontraktion in HUVECs. VE-Cadherin (Abb. 8 **A-D**) bzw. Occludin (Abb. 8 **E-H**) sind jeweils grün (Alexa 488) und F-Aktin rot (Alexa 546) gefärbt. **A, E** Die für 35 Minuten mit Kontrollmedium behandelten Zellen zeigen einen regulären Junctionsaufbau (Pfeilspitzen). **B, F** Die Behandlung mit Zardaverin (10 μM , 20 Minuten Vorinkubation) und Forskolin (1 μM , 5 Minuten Vorinkubation) zeigt keine morphologischen Unterschiede der Monolayer im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Pfeilspitzen). **C, G** Die Vorinkubation mit Zardaverin/Forskolin vor der 15-minütigen 2 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxinstimulation, blockiert sowohl den Verlust an VE-Cadherin und Occludin als auch die interzelluläre Lückenbildung (Pfeilspitzen). Es zeigen sich kaum Stressfasern. **D, H** Die Vorinkubation mit Zardaverin/Forskolin reduziert die 15-minütige 0,75 U/ml thrombininduzierte Lückenbildung und den Verlust an Junctionsproteinen (gefüllte Pfeilspitzen), jedoch nicht die Ausbildung von Stressfasern (leere Pfeilspitzen). Es wurden repräsentative Ausschnitte von HUVEC-Monolayern aus jeweils mindestens drei separaten Experimenten ausgewählt.

4.5 Einfluss der Myosinleichtkettenkinase auf den α -toxininduzierten Verlust an Junctionalproteinen

Die MLCK trägt zur Aufrechterhaltung der endothelialen Barriere bei (150). Um den Einfluss der MLCK in Bezug auf die α -toxin- und thrombininduzierte interendotheliale Lückenbildung zu untersuchen, wurde der MLCK-Inhibitor PIK eingesetzt. Die HUVECs wurden mit PIK in der Dosierung von 300 μ M für 60 Minuten vor Zellstimulation inkubiert und so die MLCK effektiv gehemmt (Abb. 9) (155). Die Behandlung mit PIK (Abb. 9B) veränderte die Zellmorphologie im Vergleich zu den mit Kontrollmedium behandelten HUVEC dabei nicht (Abb. 9A). Die Vorinkubation mit PIK (Abb. 9C) reduzierte den α -toxininduzierten Verlust an VE-Cadherin und verminderte die interendotheliale Lückenbildung, obgleich die Integrität der interendothelialen Junctionen im Vergleich zur Behandlung mit ADM nicht vollständig wiederhergestellt werden konnte (Abb. 6D). Ferner zeigte sich, dass durch die Vorinkubation mit PIK die Thrombinwirkung auf VE-Cadherin gehemmt wurde (Abb. 9D), jedoch die Ausbildung intrazellulärer Stressfasern und interendothelialer Lücken nicht vollständig verhindert werden konnte.

Die gleichen Ergebnisse konnten durch die Darstellung von Occludin erreicht werden. Hier kam es ebenso zu einem verminderten Verlust an junctionalem Occludin sowie zu einer geringeren Lückenbildung zwischen den Endothelzellen (Abbildung nicht gezeigt).

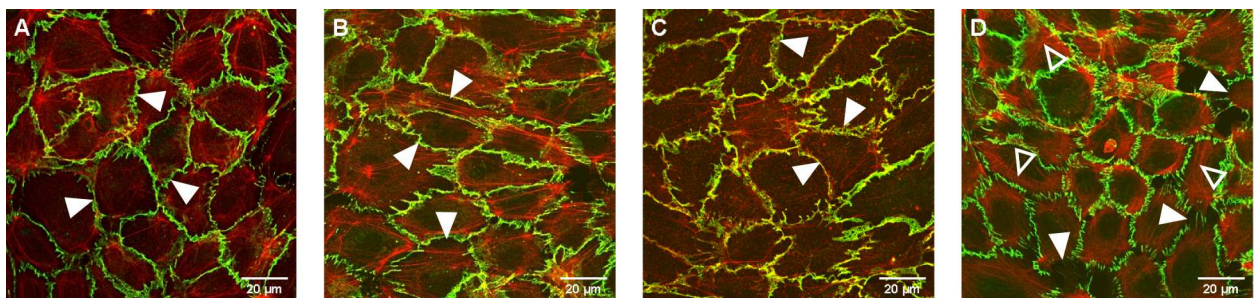


Abb. 9

Der MLCK-Inhibitor (PIK) reduzierte den Verlust an VE-Cadherin und die Ausbildung interendothelialer Lücken in thrombin- bzw. α -toxinstimulierten HUVECs. VE-Cadherin ist grün (Alexa 488) und F-Aktin rot (Alexa 546) gefärbt. **A** Die 75-minütige Behandlung mit Kontrollmedium zeigt intakte Monolayer mit einer regelrechten Verteilung an VE-Cadherin (Pfeilspitzen). **B** 60-minütige Inkubation mit 300 μ M PIK führt zu keinen Veränderungen in Bezug auf VE-Cadherin (Pfeilspitzen) und die Zellmorphologie. **C** Die 60-minütige Vorinkubation mit PIK verhindert teilweise den α -toxininduzierten Verlust an VE-Cadherin für 15 Minuten (Pfeilspitzen). **D** Der Verlust an VE-Cadherin und die Lückenausbildung unter 15-minütiger Thrombinstimulation, wird durch die 60-minütige Vorinkubation mit PIK teilweise verhindert (gefüllte Pfeilspitzen) jedoch nicht die Ausbildung von Stressfasern (leere Pfeilspitzen). Es wurden repräsentative Ausschnitte aus HUVEC-Monolayern aus mindestens drei separaten Experimenten ausgewählt.

4.6 Rolle der Rho-Kinase auf die Junctionsintegrität nach α -Toxinstimulation

Die Aktivierung der ROCK und damit die Auslösung einer aktin-myosin-getriggerten Zellkontraktion gilt als kritischer Schritt in Bezug auf die durch verschiedene pro-inflammatorische Stimuli ausgelöste Hyperpermeabilität (69;156). Als potentieller Einflussfaktor für den Verlust an endothelialen Junctionsproteinen wurde ROCK auf den α -toxininduzierten junctionalen Abbau untersucht (Abb. 10).

Die mit Kontrollmedium (Abb. 10A, 10E) beziehungsweise mit dem für ROCK-Inhibitor Y-27632 (10 μ M für 30 Minuten) behandelten Zellen, zeigten ein regelhaftes junctionales Auftreten von VE-Cadherin und Occludin (Abb. 10B bzw. 10F). Die Anzahl der F-Aktin-Fasern nahm unter Y-27632 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen drastisch ab (Abb. 10B, 10F). Die Vorinkubation der Zellen mit Y-27632 für 30 Minuten vor der 15-minütigen α -Toxingabe verhinderte den Verlust an VE-Cadherin (Abb. 10C) und Occludin (Abb. 10G) sowie die Ausbildung von Lücken zwischen den Zellen. Unter der Thrombinstimulation kam es zu vergleichbaren Ergebnissen, auch hier wurden der Abbau von VE-Cadherin (Abb. 10D) und von Occludin (Abb. 10H) sowie die Ausbildung von Lücken durch die Vorinkubation mit Y-27632 verhindert. Allerdings zeigten sich hier die Zellgrenzen im Vergleich zu einer Behandlung mit ADM (Abb. 6B, 6D, 6F, 7F, 7G, 7H) oder Zardaverin/Forskolin (Abb. 8B, 8C, 8D, 8F, 8G, 8H) weniger geradlinig verlaufend (Abb. 10B, 10C, 10D, 10F, 10G, 10H). Dies kann mit den ROCK-induzierten Verlust der F-Aktin-Fasern in Zusammenhang stehen

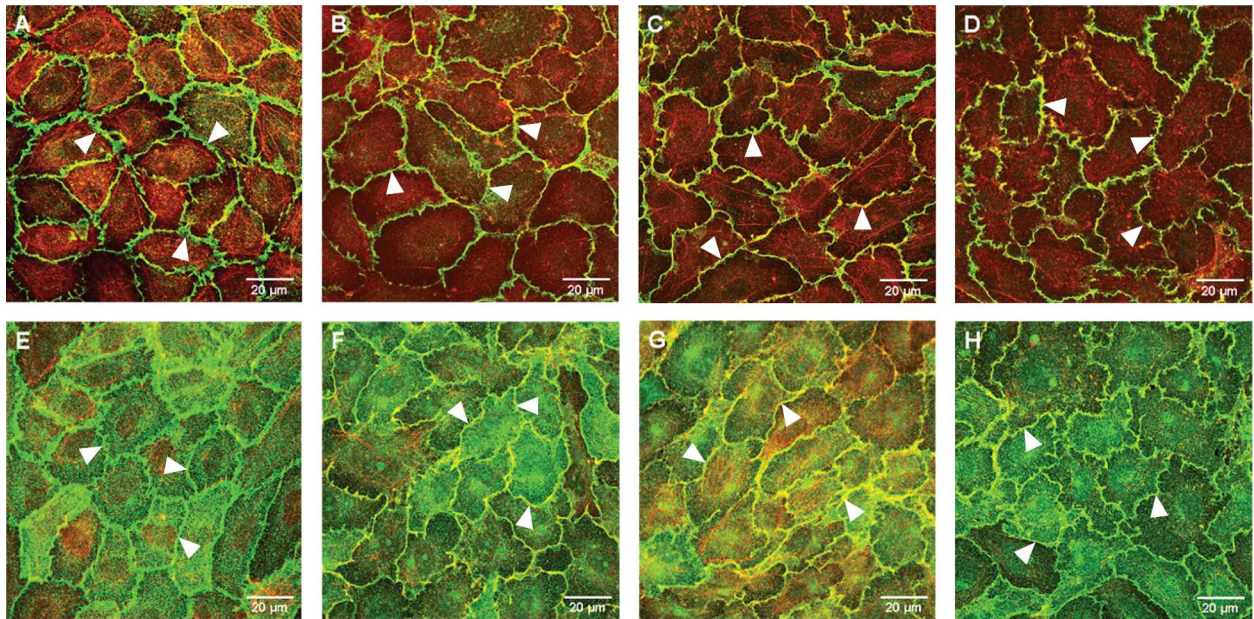


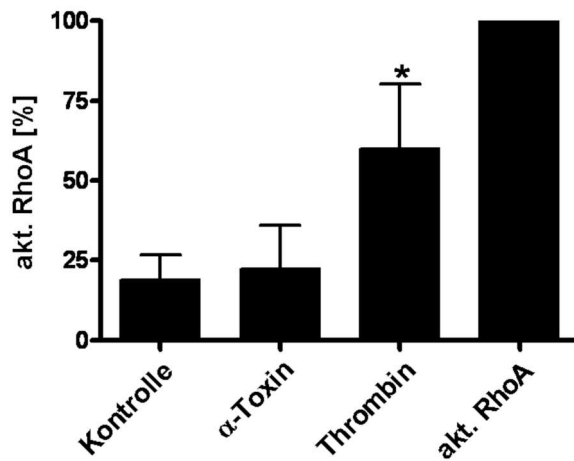
Abb. 10

Der Rho-Kinase-Inhibitor (Y-27632) blockierte den α -toxin- und thrombininduzierten Verlust an VE-Cadherin (Abb. **A-D**) bzw. Occludin (Abb. **E-H**), sowie die Zellkontraktion in HUVECs. **A, E** Kontrolle, für 45 Minuten mit Zellmedium behandelte intakte Monolayer, dargestellt durch VE-Cadherin und Occludin in grün (Alexa 488), F-Aktin in rot (Alexa 546). **B, F** Die mit 10 μ M Y-27632 für 30 Minuten behandelten HUVECs zeigen unveränderte Junctionen im Vergleich zu den Kontrollen (Pfeilspitzen). Weder die 15-minütige Stimulation mit α -Toxin (**C, G**) noch die 15-minütige Stimulation mit Thrombin (**D, H**) führt zu einem Verlust an VE-Cadherin bzw. Occludin (Pfeilspitzen), die Lückenbildung in für 30 Minuten mit Y-27632 vorbehandelten Zellen bleibt aus. Es zeigen sich auch kaum Stressfasern.

Es wurden repräsentative Ausschnitte aus HUVEC-Monolayern aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten ausgewählt.

4.7 RhoA-Aktivität nach α -Toxin- bzw. Thrombinstimulation

RhoA stellt ein wichtiges Signalprotein für die Aktivierung der Endothelzelle dar. Um festzustellen, ob die Ausbildung der interendothelialen Lücken mit einer möglichen RhoA-Aktivierung in Zusammenhang steht, wurden vier voneinander unabhängige G-LISA an HUVEC-Lysaten direkt nach der Stimulation mit α -Toxin (2 μ g/ml für 5, 10, 15, 20 Minuten) beziehungsweise Thrombin (2 U/ml für zwei Minuten) durchgeführt. Im Gegensatz zur Stimulation mit Thrombin (n=4), kam es weder in der Kontrolle (n=4) noch unter Stimulation mit α -Toxin (n=3, eine Probe nicht verwertbar) zu einer signifikanten RhoA-Aktivierung (Abb. 11).

**Abb. 11**

Im RhoA-Aktivierungsassay zeigte sich unter α -Toxin im Gegensatz zu Thrombin keine RhoA-Aktivierung. Die fünfminütige Einwirkzeit von 2 μ g/ml α -Toxin führt augenscheinlich zu keiner RhoA-Aktivierung im Vergleich zur Kontrolle (10-, 15- und 20-minütige Stimulation nicht gezeigt, da identisch). Unter zweiminütiger Stimulation mit 2 U/ml Thrombin kommt es zu einem starken Anstieg an RhoA. Im Paarvergleich Thrombin zur Kontrolle zeigt sich eine signifikante Stimulation ($p=0.0286$, einseitig im Mann-Whitney U-Test). Der kitinterne RhoA-Aktivierungsstandard wurde für alle Experimente auf 100 % gesetzt (*= $p<0,05$).

5 Diskussion und Zusammenfassung

5.1 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *S. aureus* α -Toxin den Verlust von endothelialen Junctionsproteinen induziert. Nach α -Toxin Exposition kam es zu einem Verlust an VE-Cadherin und Occludin *in vitro* und zu einer Auflösung von interendotheliale VE-Cadherin in kleinen intestinalen Gefäßen des Rattenileums. Der Verlust an Junctionsproteinen in Gefäßen des Ileums und in kultivierten Endothelzellen konnte durch die Vorinkubation mit dem endogenen Peptid ADM sowie durch eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung verhindert werden. Die Stimulation von HUVECs mit Thrombin führte zu einer RhoA-Aktivierung. Die Stimulation mit α -Toxin hingegen vermochte keine RhoA-Aktivierung zu induzieren. Die Inhibierung der Rho-Kinase und der MLCK blockierte beziehungsweise reduzierte den Verlust an Junctionsproteinen und die Ausbildung interendothelialer Lücken nach Stimulation mit α -Toxin. Diese Ergebnisse deuten zusammengefasst auf eine Reduktion der α -toxininduzierten endothelialen Permeabilität durch ADM *in vivo* und *in vitro* hin, welche durch Einbeziehung nicht-kanonischer Signalkaskaden reguliert zu sein scheint.

5.1.1 *Staphylococcus aureus* α -toxininduzierte endotheliale Permeabilität

S. aureus ist einer der häufigsten Erreger systemischer Infektionen und α -Toxin ist das bedeutendste Zytotoxin dieses Bakteriums (39). Wie bedeutsam α -Toxin *in vivo* ist, konnte an Mäusen demonstriert werden, die mit Staphylokokkenstämmen ohne α -Toxin infiziert wurden und eine höhere Überlebenschance als solche, die mit α -toxinproduzierenden Stämmen infiziert wurden, aufwiesen (35). Gereinigtes α -Toxin verursacht eine koronare Vasokonstriktion und einen Verlust an myokardialer Kontraktilität in *ex vivo*-Organpräparationen, was für das kardiovaskuläre Versagen in Fällen mit schwerer Sepsis eine Rolle spielt (48). Ein zentraler pathophysiologischer Mechanismus der α -Toxinwirkung stellt die endotheliale Hyperpermeabilität dar, was in zahlreichen Studien gezeigt wurde. In Zellkulturen kam es nach α -Toxinexposition zu einem erhöhten parazellulären Durchtritt von Wasser und Albumin (43). Ferner zeigte sich in isolierten Kaninchenlungen eine pulmonale Ödembildung durch die erhöhte endotheliale Permeabilität nach α -Toxinexposition (45). Die venöse Infusion von α -Toxin führte in Ratten zu einer massiven vaskulären Permeabilität und zu einem

Schock (48). Dies ging einher mit einer Minderperfusion sowie einer reduzierten Sauerstoffversorgung der Mukosa (46).

Neben der permeabilitätsinduzierenden Wirkung konnte eine pro-inflammatorische Aktivierung von Endothelzellen durch α -Toxin *in vitro* nachgewiesen werden (36;37). Diese Studien weisen auf die fundamentale Bedeutung von α -Toxin für die pathophysiologischen Veränderungen in einer *S.aureus*-induzierten Sepsis, einschließlich der Induktion endothelialer Hyperpermeabilität hin. In Bezug auf α -Toxin ist bekannt, dass es über eine intrazelluläre Kalziumerhöhung zu einer Aktivierung des Aktinmyosinapparates kommt (19). Dabei scheinen unterschiedliche Signalkaskaden der Zellkontraktion an der α -toxininduzierten Umverteilung der Junctionsproteine beteiligt zu sein. Gegenwärtig ist jedoch über die zugrunde liegenden zellulären Mechanismen und die sich daraus ergebenden Interventionsmöglichkeiten noch wenig bekannt. Daher wurde in dieser Arbeit die α -Toxinwirkung auf subzellulärer Ebene im Vergleich zu der bereits relativ gut beschriebenen Proteinase Thrombin betrachtet.

5.1.2 Thrombininduzierte endotheliale Permeabilität

Für Thrombin ist bekannt, dass es seine Wirkung vor allem über den PAR-1-Rezeptor vermittelt (75;76). Über die Koppelung an G-Proteine wird die Produktion von Inositoltriphosphat gesteigert, was zu einer Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol führt (78). Thrombin initiiert komplexe Signalkaskaden von Rho-Proteinen und die Aktivierung der ROCK (66;156;157) über die PKC (71;158) sowie die Aktivierung der MLCK (158;159). An der Rho-bindenden Domäne bindet die aktivierte Rho-GTP, welche die katalytische Wirkung der Kinase in Gang setzt (160). Dabei steuert die ROCK die Kontraktion des Aktin-Myosinskeletts sowie die Ausbildung von Stressfasern einerseits über die Phosphorylierung der myosinbindenden Untereinheit der Myosinphosphatase, was zu deren Inaktivierung führt, und andererseits über eine direkte Phosphorylierung der MLC (54;65).

Die so ausgelösten Veränderungen des Zytoskeletts scheinen die Lückenbildung zwischen benachbarten endothelialen Zellen und somit die endotheliale Permeabilität zu begünstigen (156).

5.1.3 Interventionsmöglichkeiten

Es existieren erste Hinweise auf mögliche Therapieansätze zur Stabilisierung der endothelialen Barriere nach α -Toxinexposition. Klinisch isolierte Staphylokokken exprimierten ein α -toxinkodierendes Gen (*hla*) *in vitro* und *in vivo*, welches möglicherweise genutzt werden könnte, um die Produktion des Toxins zu vermindern (161). Eine neuere Studie von Tamber et al. konnte ein zusätzliches Regulatorgen (*SarZ*) identifizieren, welches ebenfalls für die α -Toxinexpression relevant sein könnte (162). Die Arbeitsgruppe von Sibelius et al. konnte mittels Simvastatin die α -toxininduzierte Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel hemmen und so eine verstärkte Adhärenz dieser Abwehrzellen in kleinen Gefäßen verhindern (163). Durch die Hemmung der Leukozytenaktivierung konnte die Perfusion der Organe verbessert werden und eine Organschädigung reduziert werden (163).

Ein potentiell Agens zur Stabilisierung der endothelialen Permeabilität stellt ADM dar. In zahlreichen Studien konnte belegt werden, dass ADM die endotheliale Barrierefunktion stabilisiert und die Mikrozirkulation während einer Entzündung aufrecht erhält (44;47;132;133). Ebenso konnte der Austritt von Albumin und Plasma aus den Gefäßen in das umliegende Gewebe reduziert werden (47). Daneben wurden durch ADM-Applikation die schädlichen Folgewirkungen von α -Toxin, wie der Abfall der Gewebsoxygenierung, abgewendet (46). Für den therapeutischen Einsatz ist ADM von besonderem Interesse, da es ein von Menschen produziertes endogenes Peptid darstellt, welches zentral in die Permeabilitätsregulation eingreift (145;164;165). Klinische Studien an Patienten mit schwerer Sepsis zeigen zudem eine erhöhte ADM-Expression (140;143) sowie eine gesteigerte ADM-Produktion der Endothelzellen als Antwort auf pro-inflammatorische Zytokine unter der Kontrolle von Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B (139). In Untersuchungen von Yang et al. konnte die Behandlung mit ADM die hämodynamische Situation in Ratten mit α -toxininduzierter Sepsis stabilisieren und die Zytokinfreisetzung reduzieren, was auf einen möglichen therapeutischen Einsatz von ADM in Sepsisfällen hinweist (147;148). Ferner konnte die *in vivo*-Behandlung von septischen (induziert durch α -Toxin) Ratten mit ADM die Mortalitätsrate in einem Beobachtungszeitraum von sechs Stunden von 53 auf 7 Prozent senken (47).

Die Vorinkubation mit ADM in den isolierten Rattendärmen der vorliegenden Arbeit vermochte die α -toxininduzierte Auflösung und somit die interendotheliale

Lückenbildung des VE-Cadherinbandes erfolgreich zu verhindern. Dies lässt auf eine Stabilisierung des junctionalen VE-Cadherins und somit auf eine Prävention einer α -toxininduzierten Hyperpermeabilität durch ADM im Kapillarnett von Rattendärmen schließen.

Die *in vitro*-Inkubation von Endothelzellen mit ADM führte in der vorliegenden Arbeit zu einer anhaltenden Erhöhung des trans-endothelialen elektrischen Widerstands und somit zu einer Verbesserung der basalen endothelialen Schrankenfunktion. In Bezug auf α -Toxin konnte die Vorinkubation mit ADM den elektrischen Widerstand für circa 15 Minuten stabilisieren. Dies verhinderte jedoch nicht dauerhaft den Abfall des endothelialen Widerstandsniveaus. Dies zeigt, dass ADM in *ex vivo*-Versuchen eine deutlich längere Wirkung besitzt als in *in vitro*-stimulierten Endothelzellen und der barriestabilisierende Effekt von ADM *ex vivo* wesentlich stärker ausgeprägt ist. Die nachfolgenden *in vitro*-Endothelzellversuche der Signaltransduktion wurden daher an dieses Zeitfenster adaptiert.

Der thrombininduzierte schnelle Abfall des trans-endothelialen elektrischen Widerstands konnte dagegen durch ADM auf Höhe des Ausgangsniveaus gehalten werden und stabilisierte sich auf dem erhöhten Niveau von ADM. Diese unterschiedlichen Kinetiken weisen darauf hin, dass sowohl verschiedene als auch sich überlappende Effekte unterschiedlich starker Ausprägung zugrunde liegen könnten. *In vitro* könnte es durch Bolusgabe zu einem schnellen Verbrauch an ADM kommen, jedoch spricht dagegen, dass in ADM behandelten HUVECs im Vergleich zur Kontrolle ein erhöhtes Widerstandsniveau über mehr als 60 Minuten aufrechterhalten werden kann. Dies könnte auf eine dauerhafte Wirkung am Rezeptor hindeuten. *In vivo* ist jedoch eine Halbwertszeit für ADM von circa 22 Minuten bekannt (138). Es ist möglich, dass die Endothelzellen auch nach Abbau des ADMs aktiviert und auf einem hohen Widerstandsniveau bleiben. Diese Einflüsse könnten dazu beitragen, dass ADM nur kurzzeitig die α -Toxinwirkung verhindert, jedoch keine anhaltende Protektion bietet.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Anwendung von ADM *ex vivo* kontinuierlich (46) und in den *in vitro*-Versuchen als einmalige Bolusgabe in einem zeitlichen Beobachtungsrahmen von maximal 30 Minuten. Um diese Argumente gegeneinander zu prüfen, müssten mit Hilfe von Versuchen einer ADM-Bolusapplikation *in vivo* mit einer solchen *in vitro* verglichen werden. Zusammengenommen unterstützen diese Ergebnisse jedoch die These einer unterschiedlichen Signaltransduktion des jeweiligen

Stimulus.

Darüber hinaus konnte in weiteren Studien der Arbeitsgruppe ein therapeutischer Effekt von ADM nach α -Toxinapplikation gezeigt werden. In isoliert perfundierten Rattendärmen zeigten sich nach α -Toxingabe Zirkulationsstörungen sowie eine verminderte Sauerstoffversorgung. Durch die kontinuierliche Gabe von ADM konnten diese Effekte aufgehoben werden und die Sauerstoffversorgung wiederhergestellt als auch die Zirkulationsstörungen reduziert werden (46). Die kürzlich veröffentlichten Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zum therapeutischen Einsatz von ADM über einen Zeitraum von drei Stunden nach einstündiger α -Toxingabe zeigten eine anhaltende Stabilisierung der intestinalen Permeabilität (166).

Für den therapeutischen Einsatz von ADM ist auch das Verständnis der zellulären Mechanismen eine wichtige Grundlage. Daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die α -toxininduzierten interendothelialen Veränderungen und deren Prävention unter ADM-Einfluss auf Endothelzellen auf subzellulärer Ebene zu thematisieren.

ADM blockierte in unseren Untersuchungen sowohl die Phosphorylierung der Myosinleichtkette (131) als auch den Verlust an Junctionsproteinen im isoliert perfundierten Organ sowie *in vitro* nach α -Toxinstimulation (132). Die verschiedenen Einflüsse von ADM auf die Signalkaskade können möglicherweise die starke stabilisierende Wirkung auf die Endothelbarriere erklären. VE-Cadherin und Occludin konnten durch die Vorbehandlung mit ADM auch unter Thrombineinwirkung *in vitro* stabilisiert werden. Besonders ist zu bemerken, dass die Junctionen trotz fortbestehender Stressfaserbildung, vor allem im thrombinstimulierten Endothel, intakt waren. Das lässt darauf schließen, dass der schützende Effekt von ADM auf die endotheliale Barrierefunktion *in vitro* und *ex vivo* zumindest teilweise auf die Stabilisierung der Junctionsproteine zurückzuführen ist und nicht allein von der Ausbildung von Aktin-Stressfasern abhängt. Eine neuere Arbeit von Kis et al. untersuchte den Effekt einer dauerhaften ADM-Behandlung auf die Expression von VE-Cadherin und Occludin. Dabei wurde eine Stabilisierung der Barrierefunktion jedoch ohne Steigerung der Expression an Junctionsproteinen beobachtet (167). In dieser Arbeit war die Proteinlokalisierung allerdings nicht Ziel der Fragestellung und die ADM-Behandlung war zeitlich anders strukturiert. Es erscheint möglich, dass die protektiven Wirkungen von ADM auf die Barrierefunktion durch die Wirkung auf die Proteinlokalisierung und deren verminderten Abbau bedingt sind, und nicht über eine

gesteigerte Produktion der Proteine gesteuert werden.

5.1.4 Morphologische Veränderungen nach α -Toxin und Thrombin

Die Integrität der zellulären Junctionen stellt eine wesentliche Voraussetzung für den Erhalt der endothelialen Barrierefunktion dar und ist mitverantwortlich für die parazelluläre Permeabilität (10;77;103;159;168). Wenige Studien haben bisher Daten zu der α -Toxinwirkung auf Ebene der endothelialen Junctionen *in vivo* erhoben (45;169). Aus Kaninchen gewonnene renale Arterien reagierten nach α -Toxingabe nur eingeschränkt auf Acetylcholin mit Vasodilatation (169). In einer Studie an Kaninchenlungen wurde im Elektronenmikroskop eine Verdichtung des Zytoplasmas mit anschließender Loslösung der Endothelzellen von der Basallamina dargestellt (45). Diese Arbeiten befassten sich jedoch nicht mit den Veränderungen im junctionalen Aufbau der Endothelien. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Daten über den α -toxininduzierten Verlust an VE-Cadherin und Occludin und die Ausbildung von interendothelialen Lücken erhoben. Ferner wurden permeabilitätsregulierende Signalwege in diesem Zusammenhang untersucht.

Zunächst wurde die VE-Cadherin-Expression in isoliert perfundierten Rattendärmen adressiert. Es zeigte sich in den Kontrollpräparaten eine regelrechte Anordnung des VE-Cadherinbands entlang der endothelialen Verbindungen in den kleinen Gefäßen der Submukosa des Rattenileums. Eine einmalige Toxininjektion in die Arteria mesenterica superior war jedoch ausreichend, um eine deutliche Zerstörung der junctionalem VE-Cadherin Kontinuität zu induzieren. Dabei wurde das längsgerichtete VE-Cadherinband unterbrochen, welches die Bildung interendothelialer Lücken indiziert. Diese morphologischen Beobachtungen korrelierten mit einer Steigerung der gemessenen Schrankenstörung in diesem Modell (46). Die Daten zeigen erstmalig, dass die durch α -toxinverursachte Permeabilität mit dem Verlust von junctionalem VE-Cadherin einhergeht. Dies ist ein Hinweis darauf, dass der durch α -toxininduzierte Verlust an junctionalen Proteinen mit der gleichzeitig gemessenen Hyperpermeabilität in Zusammenhang steht.

Anschließend wurden weiterführende *in vitro*-Experimente hinsichtlich der α -Toxinwirkung auf Junctionsproteine durchgeführt. Aus der Literatur ist bekannt, dass α -Toxin seine Wirkung konzentrationsabhängig über zwei derzeit bekannte Mechanismen vermittelt. Dabei scheinen in niedrigen Konzentrationen (1-2 nM) die Oligomerisation

und bei hohen Konzentrationen (≥ 200 nM) die Ausbildung von Hexameren die Voraussetzung für die Porenbildung zu sein, welche für die Lyse von humanen Erythrozyten und die Schädigung von Lysosomen verantwortlich ist (38;39). In den vorliegenden Untersuchungen wurde α -Toxin mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ (30 nM) bei den isolierten Rattendärmen und 2 $\mu\text{g/ml}$ (60 nM) bei den *in vitro*-Versuchen eingesetzt, so dass von einer Porenbildung ausgegangen werden kann.

Die erfolgreiche Dosisanpassung wurde mittels trans-endothelialer elektrischer Widerstandsmessungen zur Erfassung der α -toxininduzierten Störung der endothelialen Barrierefunktion bestätigt. Interessanterweise zeigten sich nach α -Toxin- und Thrombinstimulation unterschiedliche Widerstandverläufe. Initial führte die Stimulation mit α -Toxin beziehungsweise Thrombin zu einem schnellen Abfall des elektrischen Widerstands, welcher als Erhöhung der endothelialen Permeabilität zu werten ist. Unter α -Toxin blieb der Widerstand auf niedrigem Niveau. Dagegen zeigte sich unter Thrombinstimulation eine Wiederherstellung des Ausgangswiderstands.

Eine mögliche Erklärung könnten unterschiedliche Wirkzeiten der Stimulantien darstellen. Die physiologisch geschätzte Inaktivierung von Thrombin erfolgt im menschlichen Körper innerhalb von Sekunden (170). Dagegen lassen sich die α -toxininduzierten Poren elektronenmikroskopisch über einen längeren Zeitraum nachweisen (39;171) und die auftretenden Elektrolyt- und Flüssigkeitsverschiebungen stellen andauernde bzw. irreversible Effekte dar (172). Durch die α -toxininduzierte Porenbildung kann sich der intrazelluläre Kalziumgehalt in den Endothelzellen nachhaltig erhöhen (40) und über kalziumabhängige Signalwege eine Zellkontraktion sowie den Abbau von Junctionsproteinen induzieren. Dies ermöglicht einen anhaltenden erhöhten parazellulären Flüssigkeitsübertritt und könnte den anhaltenden Widerstandsabfall des elektrischen Widerstandes durch α -Toxin erklären.

Die voneinander abweichenden Verläufe der Widerstandsmessungen weisen auf potentiell unterschiedliche zelluläre Wirkmechanismen der in der vorliegenden Arbeit verglichenen Stimulantien hin.

Die Messungen des TER dienten ferner zur Festlegung der Zeiträume für die Signaltransduktionsversuche in der konfokalen Lasermikroskopie, da sich die Zellen im Gegensatz zu α -Toxin unter Thrombin im zeitlichen Verlauf wieder erholten und die interendothelialen Lücken wieder verschlossen wurden (Bestätigung der Hypothese durch life cell imaging Untersuchungen der Arbeitsgruppe, hier nicht gezeigt).

Anschließende morphologische Untersuchungen mittels konfokaler Lasermikroskopie zeigten einen Verlust an VE-Cadherin und Occludin nach Exposition von Endothelzellen gegenüber α -Toxin und Thrombin.

Es konnte eine geringe Zunahme an F-Aktin-Fasern, begleitet von der Ausbildung kleiner interzellulärer Lücken, in den mit α -Toxin behandelten HUVECs nachgewiesen werden. Diese Veränderungen wurden im Vergleich zu den morphologischen Veränderungen durch Thrombinexposition betrachtet (26;158). Im Gegensatz zu α -Toxin konnte unter Thrombin eine starke Ausbildung von F-Aktin-Fasern und große interendotheliale Lücken gezeigt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die entscheidende Rolle von VE-Cadherin und Occludin in der α -toxininduzierten endothelialen Permeabilität. Inwiefern der Verlust der Junktionsproteine einen streng geregelten funktionalen Prozess der Endothelzelle darstellt oder ob es mechanisch durch eine Veränderung der Zellstruktur zu einem Abbau der Junktionsproteine kommt, ist größtenteils unklar. Zur Beurteilung möglicher Regulationsprozesse wurden daher die molekularen Signalwege, die hinsichtlich der α -toxininduzierten Hyperpermeabilität eine Rolle spielen könnten, *in vitro* untersucht. In der vorliegenden Arbeit liegt der Schwerpunkt dabei auf der Regulation über cAMP, Rho-Kinase und MLCK, da diese Signalwege für die Junktionsstabilität und die Zellmorphologie von wichtiger Bedeutung sind (54;59;88;89;93;173-175).

5.1.5 Betrachtete Signalwege der endothelialen Permeabilität

Für die intrazelluläre Signaltransduktion der endothelialen Regulation spielen sekundäre Botenstoffe eine wichtige Rolle. In mehreren *in vitro*-Versuchen (18;77;85) sowie in isoliert perfundierten Organen (131;176) konnte die Erhöhung des Botenstoffs cAMP wirksam zur Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion beitragen. In der vorliegenden Arbeit konnte die Stabilisierung der interendothelialen Junktionsproteine VE-Cadherin und Occludin durch das cAMP-erhöhende Peptid ADM in HUVECs gezeigt werden. Eine frühere Arbeit von Suttorp et al. an pulmonalen Endothelzellen des Schweins zeigte nach PDE-Inhibitoren (wie Zardaverin und Forskolin), welche ebenfalls zu einer cAMP-Erhöhung führen, eine Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion. Jedoch stand die Lokalisation der Junktionsproteine nicht im Fokus der Untersucher (18).

Um die Bedeutung von cAMP auf Junktionsebene zu verifizieren, wurde intrazelluläres

cAMP pharmakologisch mit Hilfe von Zardaverin und Forskolin erhöht. Es zeigte sich, dass die Vorinkubation mit Zardaverin/Forskolin zu einem Erhalt der Junctionsproteine VE-Cadherin und Occludin nach α -Toxin- und Thrombingabe führte und die interzelluläre Lückenbildung verhindert wurde. Dabei fand unter α -Toxin nur eine leichte Umstrukturierung beziehungsweise Reduktion der intrazellulären F-Aktin-Fasern statt. Der Verlust an interendothelialen Junctionsproteinen konnte auch unter Thrombin verhindert werden, die intrazellulären Stressfasern bestanden jedoch ebenfalls fort. Diese Ergebnisse stimmen somit mit den morphologischen Beobachtungen in ADM behandelten HUVECs überein. So scheint bei ADM die intrazelluläre cAMP-Erhöhung für die permeabilitätsreduzierende Wirkung von Bedeutung, jedoch müssen auch weitere Möglichkeiten in Betracht gezogen werden. Es wären die Induktion weiterer cAMP-unabhängiger Signalsysteme (177) sowie noch unbekannte Mechanismen denkbar.

Mit dem Einsatz des MLCK-Inhibitors PIK sollte die Beteiligung der MLCK gezeigt werden. Über den Einsatz von PIK, der die MLCK effektiv hemmt (155), gibt es erste Daten der Arbeitsgruppe von J.R. Tuner, Zolotavesky et al., wobei PIK den transendothelialen Widerstandsverlust durch *E. coli* verhindern konnte (150). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Vorbehandlung mit PIK *in vitro* den α -toxininduzierten Verlust an Junctionsproteinen und die interendotheliale Lückenbildung nur geringfügig reduziert. Die Wirkung von Thrombin konnte ebenfalls nur teilweise vermindert werden. Es kam zu einem geringen Verlust an VE-Cadherin und Occludin und zu einer interendothelialen Lückenbildung, die intrazellulären Stressfasern bestanden fort.

Ferner greift die Rho-Kinase entscheidend in die Zellkontraktion ein. Obwohl die ROCK die Myosinphosphatase inaktiviert, hatte dies in den Versuchen der Arbeitsgruppe von Amanos et al. keinen direkten Effekt auf die Kontraktion (64). Dagegen zeigten Somlyo et al., dass der Rho/ROCK-Signalweg ein prädominanter Faktor für die kalziumabhängige Sensitivierung der Kontraktion der glatten Muskelzelle, bei konstant gehaltenem Kalzium, ist (178). Die Ermittlung des jeweiligen Anteils der Kalzium/Calmodulin-abhängigen MLCK beziehungsweise der kalziumunabhängigen ROCK-Signalwege in Bezug auf die Myosinaktivierung und -Kontraktion gestaltete sich wegen möglicher Kreuzaktivierungen jedoch schwierig.

Emmert et al. konnte an Embryofibroblasten von Ratten, die keine nachweisbare MLCK aufwiesen, eine ROCK-induzierte kalziumunabhängige Kontraktion der Zellen zeigen

(160). Dies lässt auf einen möglichen Zusammenhang der Aktivierung des kontraktilen Apparates durch die α -toxininduzierte Aktivierung der Endothelzelle schließen.

In der vorliegenden Arbeit zeigte die Inkubation von HUVECs mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 eine junktionale Anordnung von VE-Cadherin und Occludin, wobei die intrazellulären F-Aktin-Fasern im Vergleich zu den Kontrollen reduziert waren. Der Einsatz des ROCK-Inhibitors verhinderte sowohl den α -toxin- als auch den thrombininduzierten Verlust an Occludin und VE-Cadherin. Es bildeten sich keine interzellulären Lücken aus. Interessanterweise konnte im Gegensatz zu den Stimulationen mit ADM beziehungsweise Zardaverin/Forskolin auch die Ausbildung von Stressfasern nach Thrombin durch den ROCK-Inhibitor verhindert werden.

Die zentrale Bedeutung der ROCK-gesteuerten Aktivierung des kontraktilen Apparates der Endothelzelle durch Thrombin wird dadurch bestätigt. Gleichzeitig weist es darauf hin, dass der Verlust an Junctionsproteinen unabhängig von der Ausbildung von Stressfasern und Zellkontraktion zu sein scheint. Dagegen stellt der Verlust an Junctionsproteinen bei beiden Stimuli einen ROCK-abhängigen Prozess dar.

Die MLCK-Blockierung konnte im Gegensatz zur Hemmung der ROCK die Junctionen nicht vollständig stabilisieren, was auf den ersten Blick widersprüchlich erscheint. Es weist jedoch darauf hin, dass verschiedene zelluläre Signalwege in die Regulation der Junctionsproteine VE-Cadherin und Occludin eingreifen.

Unter Thrombineinwirkung zeigte sich in HUVECs eine RhoA-Aktivierung, wie sie bereits mehrfach beschrieben wurde (156;157). Für die Einwirkung von α -Toxin dagegen konnte keine direkte RhoA-Aktivierung nachgewiesen werden, was ebenfalls auf eine differentielle Signaltransduktion hinsichtlich der Induktion von Hyperpermeabilität im Vergleich zu Thrombin hinweist. Diese Ergebnisse liefern eine erste Erklärung für die verminderte Stressfaserbildung unter α -Toxin im Vergleich zu Thrombin. Interessanterweise blockierte der ROCK-Inhibitor sowohl den α -toxin- als auch den thrombininduzierten Verlust an Occludin und VE-Cadherin. Er konnte jedoch nicht die thrombininduzierte Stressfaserbildung reduzieren. Bei der α -toxininduzierten Umverteilung der Junctionsproteine scheinen dagegen RhoA unabhängige Signalwege beteiligt zu sein.

Möglich wären wechselseitiger Regulationsmöglichkeiten zwischen RhoA, Rac, Cdc42 und p120-Catenin (97;100;102). VE-Cadherin ist über α -Catenin mit dem Aktinzytoskelett verknüpft und bindet über eine juxtamembrane Domäne an p120-

Catenin (49). Catenin p120 scheint zahlreiche regulatorische Eigenschaften zu besitzen, so wiesen mit p120 ctn-transfizierte Epithelzellen eine verminderte Kontraktilität und verstärkte Migration auf, die durch die Aktivierung von Rho-GTPasen vermittelt wurden (100-102). Vor kurzem konnte nachgewiesen werden, dass die zytoplasmatische Domäne von VE-Cadherin sowohl Cdc42 (179) als auch Rac (180) aktivierte. Occludin ist ebenfalls mit dem Aktinzytoskelett und α -Catenin assoziiert (111) und Interaktionen zwischen Rho, Rac oder Cdc42 erscheinen daher wahrscheinlich, jedoch stehen Untersuchungen hierzu aus.

Die Wirkungen dieser regulatorischen Moleküle sind noch nicht vollständig verstanden, jedoch könnten sie eine bedeutende Rolle in der Junctions stabilität spielen. Diese wechselseitigen Regulationswege wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, sind jedoch für weiterführende Studien zum Verständnis der Signaltransduktion interessant. Die Vielzahl der Interaktionsmöglichkeiten verdeutlicht die Komplexität der Signalwege und Regulationsmechanismen und deutet darauf hin, dass dem Verlust an Junctionsproteinen ein komplexer Regelkreis zugrunde liegt.

5.2 Zusammenfassung und Ausblick

Das Verständnis der Pathomechanismen der Sepsis und die Verbesserung der aktuellen Therapiekonzepte für dieses schwere Krankheitsbild sind weiterhin ein zentrales Thema zahlreicher Forschungsprojekte und klinischer Untersuchungen. Auch in Zukunft werden bakterielle Infektionen im klinischen Alltag eine wichtige Rolle spielen. Mit zunehmender Resistenzbildung der Bakterien gegenüber Antibiotika und eingeschränkter Therapieoptionen wird deren Bedeutung noch gewinnen. So liegt die Prävalenz an methicillinresistenten *S. aureus*-Stämmen (MRSA) in Deutschland inzwischen bei circa zwanzig Prozent, was einer Verdoppelung innerhalb von zehn Jahren entspricht. Zudem weisen MRSA-Bakteriämien im Vergleich zu methicillinempfindlichen *S. aureus*-Bakteriämien eine deutlich schlechtere Prognose auf (Kern et al., *Internist*, 2009).

Klinisch tritt bei Patienten mit Sepsis eine verstärkte vaskuläre Permeabilität auf, die zu den Organschädigungen beitragen kann. Dieser Prozess wird durch die erhöhte parazelluläre endotheliale Permeabilität, ausgelöst durch bakterielle Virulenzfaktoren, wie *S. aureus* α -Toxin, aber auch endogene pro-inflammatorische Mediatoren wie Thrombin, unterstützt.

Die vorliegende Arbeit zeigt einen Verlust der wichtigen junctionalen Proteine VE-Cadherin *ex vivo* sowie VE-Cadherin und Occludin *in vitro* nach *S.aureus* α -Toxin-Exposition. Das zentrale Ergebnis der Arbeit ist, dass die Behandlung mit ADM diesen α -toxininduzierten Verlust an Junctionsproteinen sowie die Ausbildung interendothelialer Lücken verhindern kann und somit die endotheliale Barriere stabilisiert. Die Vorinkubation mit ADM führte in *ex vivo* isoliert perfundierten Rattendärmen zu einem anhaltenden Erhalt des VE-Cadherinbandes nach α -Toxineinwirkung. *In vitro* konnte ADM den α -toxininduzierten Abfall des trans-elektrischen Widerstandes nur mittelfristig verhindern. In den zeitlich daran angepassten Endothelzellversuchen konnte jedoch der Verlust an VE-Cadherin und Occludin durch ADM verhindert werden.

Daneben wurden molekulare Signalwege der α -toxininduzierten Hyperpermeabilität untersucht. Sowohl die Erhöhung von cAMP sowie der ROCK als auch bis zu einem gewissen Grade die Blockade der MLCK stabilisieren die endotheliale Barrierefunktion *in vitro* und sichern die Junctionsintegrität. α -Toxin scheint RhoA-unabhängige Signalwege zu nutzen, da sich keine erhöhte Aktivität nach α -Toxinstimulation im Vergleich zu Thrombin nachweisen ließ.

So zeigen erste weiterführende Studien der Arbeitsgruppe, dass auch die Phosphorylierung von MLC unter α -Toxin im Gegensatz zu Thrombin ausbleibt, was ein Ansatzpunkt für neue Einblicke in die α -Toxinwirkung sein könnte. *In vivo*-Verhältnisse hinsichtlich Occludin wurden in der hier vorliegenden Arbeit nicht nachvollzogen, was ebenfalls einen Anhaltspunkt für weitere Untersuchungen darstellen könnte. Ferner könnte im Rahmen klinischer Studien bei ARDS- bzw. septischen Patienten der vorsichtige therapeutische Einsatz von ADM, unter Berücksichtigung seiner blutdrucksenkenden Eigenschaften, erprobt werden und so möglicherweise als neue Behandlungsstrategie zum sinnvollen Einsatz kommen.

6 Literaturverzeichnis

1. Vincent JL, Taccone F, Schmit X: Classification, incidence, and outcomes of sepsis and multiple organ failure. *Contributions to Nephrology* 2007; 156:64-74.
2. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M: The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *New England Journal of Medicine* 2003; 348:1546-1554.
3. Geffers C, Zuschneid I, Sohr D, Ruden H, Gastmeier P: Microbiological isolates associated with nosocomial infections in intensive care units: Data of 274 intensive care units participating in the German nosocomial infections surveillance system (KISS). *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie* 2004; 39:15-19.
4. Sista RR, Oda G, Barr J: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in ICU patients. *Anesthesiology Clinics of North America* 2004; 22:405-35, vi.
5. Bone RC: The Pathogenesis of Sepsis. *Annals of Internal Medicine* 1991; 115:457-469.
6. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA et al.: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992; 101:1644-1655.
7. Kumar P, Shen Q, Pivetti CD, Lee ES, Wu MH, Yuan SY: Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation *Expert Reviews on Molecular Medicine* 2009; 11:e19.
8. Khan RZ, Badr KF: Endotoxin and renal function: perspectives to the understanding of septic acute renal failure and toxic shock. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 1999; 14:814-818.
9. Aird WC: The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 2003; 101:3765-3777.
10. Lush CW, Kvietys PR: Microvascular dysfunction in sepsis. *Microcirculation* 2000; 7:83-101.
11. Marshall JC: Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Critical Care Medicine* 2001; 29:S99-106.
12. Volk T, Kox WJ: Endothelium function in sepsis. *Inflammation Research* 2000; 49:185-198.
13. Opitz B, Hippenstiel S, Eitel J, Suttrop N: Extra- and intracellular innate immune recognition in endothelial cells. *Thrombosis and Haemostasis* 2007; 98:319-326.
14. Sinha B, Francois PP, Nusse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P et al.: Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha(5)\beta(1)$. *Cellular Microbiology* 1999; 1:101-117.

15. Sinha B, Francois P, Que YA, Hussain M, Heilmann C, Moreillon P et al.: Heterologously expressed Staphylococcus aureus fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infection and Immunity* 2000; 68:6871-6878.
16. Bonazzi M, Lecuit M, Cossart P: Listeria monocytogenes internalin and E-cadherin: from structure to pathogenesis. *Cellular Microbiology* 2009; 11:693-702.
17. Grimminger F, Rose F, Sibelius U, Meinhardt M, Potzsch B, Spriestersbach R et al.: Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins Escherichia coli hemolysin and staphylococcal alpha-toxin. *Journal of Immunology* 1997; 159:1909-1916.
18. Suttorp N, Weber U, Welsch T, Schudt C: Role of phosphodiesterases in the regulation of endothelial permeability in vitro. *Journal of Clinical Investigation* 1993; 91:1421-1428.
19. Suttorp N, Seeger W, Dewein E, Bhakdi S, Roka L: Staphylococcal alpha-toxin-induced PGI₂ production in endothelial cells: role of calcium. *American Journal of Physiology* 1985; 248:C127-C134.
20. Suttorp N, Floer B, Schnittler H, Seeger W, Bhakdi S: Effects of escherichia-coli hemolysin on endothelial-cell function. *Infection and Immunity* 1990; 58:3796-3801.
21. Ermert L, Rousseau S, Schutte H, Birkemeyer RG, Grimminger F, Bhakdi S et al.: Induction of severe vascular leakage by low-doses of escherichia-coli hemolysin in perfused rabbit lungs. *Laboratory Investigation* 1992; 66:362-369.
22. Chavakis T, Hussain M, Kanse SM, Peters G, Bretzel RG, Flock JI et al.: Staphylococcus aureus extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nature Medicine* 2002; 8:687-693.
23. Faure E, Thomas L, Xu H, Medvedev AE, Equils O, Arditi M: Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: Role of NF-kappa B activation. *Journal of Immunology* 2001; 166:2018-2024.
24. Henneke P, Golenbock DT: Innate immune recognition of lipopolysaccharide by endothelial cells. *Critical Care Medicine* 2002; 30:S207-S213.
25. Zhao BT, Bowden RA, Stavchansky SA, Bowman PD: Human endothelial cell response to gram-negative lipopolysaccharide assessed with cDNA microarrays. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2001; 281:C1587-C1595.
26. Bogatcheva NV, Garcia JG, Verin AD: Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochemistry (Mosc.)* 2002; 67:75-84.

27. Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM et al.: Recognition of pneumolysin by toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100:1966-1971.
28. Akira S, Takeda K, Kaisho T: Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology* 2001; 2:675-680.
29. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124:783-801.
30. Baggiolini M: Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998; 392:565-568.
31. Sriskandan S, Altmann DM: The immunology of sepsis. *Journal of Pathology* 2008; 214:211-223.
32. Morrison DC, Ulevitch RJ: The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. A review. *American Journal of Pathology* 1978; 93:526-618.
33. Brunkhorst FM: Epidemiology, economy and practice - Results of the german study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet). *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie* 2006; 41:43-44.
34. Freer JH, Arbuthnott JP: Toxins of Staphylococcus-Aureus. *Pharmacology and Therapeutics* 1982; 19:55-106.
35. Patel AH, Nowlan P, Weavers ED, Foster T: Virulence of protein A-deficient and alpha-toxin-deficient mutants of Staphylococcus aureus isolated by allele replacement. *Infection and Immunity* 1987; 55:3103-3110.
36. Krull 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. *Journal of Immunology* 1996; 157:4133-4140.
37. Suttorp N, Fuhrmann M, Tannert-Otto S, Grimminger F, Bhakdi S: Pore-forming bacterial toxins potently induce release of nitric oxide in porcine endothelial cells. *Journal of Experimental Medicine* 1993; 178:337-341.
38. Hildebrand A, Pohl M, Bhakdi S: Staphylococcus-Aureus alpha-toxin - Dual mechanism of binding to target-cells. *Journal of Biological Chemistry* 1991; 266:17195-17200.
39. Bhakdi S, Tranum-Jensen J: Alpha-toxin of Staphylococcus aureus. *Microbiological Reviews* 1991; 55:733-751.
40. Bhakdi S, Bayley H, Valeva A, Walev I, Walker B, Kehoe M et al.: Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and Escherichia coli hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Archives of Microbiology* 1996; 165:73-79.

41. Tiruppathi C, Minshall RD, Paria BC, Vogel SM, Malik AB: Role of Ca²⁺ signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascular Pharmacology* 2002; 39:173-185.
42. Nobe K, Sone T, Paul RJ, Honda K: Thrombin-induced force development in vascular endothelial cells: contribution to alteration of permeability mediated by calcium-dependent and -independent pathways. *Journal of Pharmacological Sciences* 2005; 99:252-263.
43. 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:C368-C376.
44. Brell B, Temmesfeld-Wollbruck B, Altschner I, Frisch E, Schmeck B, Hocke AC et al.: Adrenomedullin reduces Staphylococcus aureus alpha-toxin-induced rat ileum microcirculatory damage. *Critical Care Medicine* 2005; 33:819-826.
45. Seeger W, Birkemeyer RG, Ermert L, Suttorp N, Bhakdi S, Duncker HR: Staphylococcal alpha-toxin-induced vascular leakage in isolated perfused rabbit lungs. *Laboratory Investigation* 1990; 63:341-349.
46. Brell B, Hippenstiel S, David I, Pries AR, Habazettl H, Schmeck B et al.: Adrenomedullin treatment abolishes ileal mucosal hypoperfusion induced by Staphylococcus aureus alpha-toxin - An intravital microscopic study on an isolated rat ileum. *Critical Care Medicine* 2005; 33:2810-2816.
47. Temmesfeld-Wollbruck B, Brell B, David I, Dorenberg M, Adolphs J, Schmeck B et al.: Adrenomedullin reduces vascular hyperpermeability and improves survival in rat septic shock. *Intensive Care Medicine* 2007; 33:703-710.
48. Sibelius U, Grandel U, Buerke M, Mueller D, Kiss L, Kraemer HJ et al.: Staphylococcal alpha-toxin provokes coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility in perfused rat hearts: role of thromboxane generation. *Circulation* 2000; 101:78-85.
49. Bazzoni G, Dejana E: Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological Reviews* 2004; 84:869-901.
50. Majno G, Palade GE: Studies on Inflammation .1. Effect of Histamine and Serotonin on vascular permeability - An electron microscopic study. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 1961; 11:571-&.
51. Kolodney MS, Wysolmerski RB: Isometric contraction by fibroblasts and endothelial-cells in tissue-culture - A quantitative study. *Journal of Cell Biology* 1992; 117:73-82.
52. Morel NML, Petruzzo PP, Hechtman HB, Shepro D: Inflammatory agonists that increase microvascular permeability in vivo stimulate cultured pulmonary microvessel endothelial-cell contraction. *Inflammation* 1990; 14:571-583.
53. Moy AB, Blackwell K, Kamath A: Differential effects of histamine and thrombin on

- endothelial barrier function through actin-myosin tension. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2002; 282:H21-H29.
54. Goeckeler ZM, Wysolmerski RB: Myosin light-chain kinase-Regulated endothelial-cell contraction - The relationship between isometric tension, actin polymerization, and myosin phosphorylation. *Journal of Cell Biology* 1995; 130:613-627.
 55. Yuan Y, Huang QB, Wu HM: Myosin light chain phosphorylation: Modulation of basal and agonist-stimulated venular permeability. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1997; 41:H1437-H1443.
 56. Dudek SM, Garcia JG: Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *Journal of Applied Physiology* 2001; 91:1487-1500.
 57. Konstantoulaki M, Kouklis P, Malik AB: Protein kinase C modifications of VE-cadherin, p120, and beta-catenin contribute to endothelial barrier dysregulation induced by thrombin. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2003; 285:L434-L442.
 58. Kouklis P, Konstantoulaki M, Vogel S, Broman M, Malik AB: Cdc42 regulates the restoration of endothelial barrier function. *Circulation Research* 2004; 94:159-166.
 59. Hall A, Nobes CD: Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 2000; 355:965-970.
 60. Wojciak-Stothard B, Ridley AJ: Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascular Pharmacology* 2002; 39:187-199.
 61. Wojciak-Stothard B, Potempa S, Eichholtz T, Ridley AJ: Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability. *Journal of Cell Science* 2001; 114:1343-1355.
 62. Hippenstiel S, Tannert Otto S, Vollrath N, Krull M, Just I, Aktories K et al.: Glucosylation of small GTP-binding Rho proteins disrupts endothelial barrier function. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 1997; 16:L38-L43.
 63. Van Aelst L, D Souza Schorey C: Rho GTPases and signaling networks. *Genes and Development* 1997; 11:2295-2322.
 64. Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A et al.: Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 1999; 285:895-898.
 65. Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T et al.: Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271:20246-20249.
 66. Essler M, Amano M, Kruse HJ, Kaibuchi K, Weber PC, Aepfelbacher M:

- Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273:21867-21874.
67. Verin AD, Birukova A, Wang P, Liu F, Becker P, Birukov K et al.: Microtubule disassembly increases endothelial cell barrier dysfunction: role of MLC phosphorylation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2001; 281:L565-L574.
 68. Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y et al.: Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science* 1997; 275:1308-1311.
 69. Carbajal JM, Gratrix ML, Yu CH, Schaeffer RC, Jr.: ROCK mediates thrombin's endothelial barrier dysfunction. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 2000; 279:C195-C204.
 70. Holinstat M, Mehta D, Kozasa T, Minshall RD, Malik AB: Protein kinase C alpha-induced p115RhoGEF phosphorylation signals endothelial cytoskeletal rearrangement. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278:28793-28798.
 71. Mehta D, Rahman A, Malik AB: Protein kinase C-alpha signals rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor phosphorylation and rho activation and regulates the endothelial cell barrier function. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276:22614-22620.
 72. Mehta D, Malik AB: Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiological Reviews* 2006; 86:279-367.
 73. Stringaris AK, Bergmann F, Geisenhainer J, Bahr M, Nau R: Neurotoxicity of pneumolysin, a major pneumococcal virulence factor, involves calcium influx and depends on activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neurology* 2002; 58:A262-A263.
 74. Barr AJ, Brass LF, Manning DR: Reconstitution of receptors and GTP-binding regulatory proteins (G proteins) in Sf9 cells - A direct evaluation of selectivity in receptor center dot G protein coupling. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272:2223-2229.
 75. Coughlin SR: Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 2000; 407:258-264.
 76. Coughlin SR: How the protease thrombin talks to cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96:11023-11027.
 77. van Hinsbergh VW, Nieuw Amerongen GP: Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function. *Journal of Anatomy* 2002; 200:549-560.
 78. Bird GS, Aziz O, Lievremont JP, Wedel BJ, Trebak M, Vazquez G et al.: Mechanisms of phospholipase C-regulated calcium entry. *Current Molecular*

Medicine 2004; 4:291-301.

79. Garcia JG, Pavalko FM, Patterson CE: Vascular endothelial cell activation and permeability responses to thrombin. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 1995; 6:609-626.
80. Sandoval R, Malik AB, Minshall RD, Kouklis P, Ellis CA, Tiruppathi C: Ca(2+) signalling and PKC α activate increased endothelial permeability by disassembly of VE-cadherin junctions. *Journal of Physiology* 2001; 533:433-445.
81. Baumer Y, Drenckhahn D, Waschke J: cAMP induced Rac 1-mediated cytoskeletal reorganization in microvascular endothelium. *Histochemistry and Cell Biology* 2008; 129:765-778.
82. Seibert AF, Thompson WJ, Taylor A, Wilborn WH, Barnard J, Haynes J: Reversal of increased microvascular permeability associated with ischemia-reperfusion: role of cAMP. *Journal of Applied Physiology* 1992; 72:389-395.
83. Michel CC, Curry FE: Microvascular permeability. *Physiological Reviews* 1999; 79:703-761.
84. Chong TJ, Victorino GP: Cyclic nucleotide second messengers (cAMP and cGMP) play a central role in signal transduction and regulation of mesenteric postcapillary fluid leak. *Journal of Trauma* 2005; 59:302-306.
85. Yuan SY: Protein kinase signaling in the modulation of microvascular permeability. *Vascular Pharmacology* 2002; 39:213-223.
86. Seibert AF, Thompson WJ, Taylor A, Wilborn WH, Barnard J, Haynes J: Reversal of increased microvascular permeability associated with ischemia-reperfusion - Role of Camp. *Journal of Applied Physiology* 1992; 72:389-395.
87. Stelzner TJ, Weil JV, O'Brien RF: Role of cyclic adenosine monophosphate in the induction of endothelial barrier properties. *Journal of Cellular Physiology* 1989; 139:157-166.
88. 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 α . *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273:22554-22562.
89. Patterson CE, Lum H, Schaphorst KL, Verin AD, Garcia JGN: Regulation of endothelial barrier function by the cAMP-dependent protein kinase. *Endothelium-Journal of Endothelial Cell Research* 2000; 7:287-+.
90. Cullere X, Shaw SK, Andersson L, Hirahashi J, Luscinskas FW, Mayadas TN: Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP activated exchange factor for Rap GTPase. *Blood* 2004.
91. Springett GM, Kawasaki H, Spriggs DR: Non-kinase second-messenger signaling: new pathways with new promise. *Bioessays* 2004; 26:730-738.
92. Kooistra MRH, Corada M, Dejana E, Bos JL: Epac1 regulates integrity of

- endothelial cell junctions through VE-cadherin. *Febs Letters* 2005; 579:4966-4972.
93. Fukuhara S, Sakurai A, Sano H, Yamagishi A, Somekawa S, Takakura N et al.: Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology* 2005; 25:136-146.
94. Simon AM, Goodenough DA: Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends in Cell Biology* 1998; 8:477-483.
95. Simionescu M, Gafencu A, Antohe F: Transcytosis of plasma macromolecules in endothelial cells: A cell biological survey. *Microscopy Research and Technique* 2002; 57:269-288.
96. Bannerman DD, Fitzpatrick MJ, Anderson DY, Bhattacharjee AK, Novitsky TJ, Hasday JD et al.: Endotoxin-neutralizing protein protects against endotoxin-induced endothelial barrier dysfunction. *Infection and Immunity* 1998; 66:1400-1407.
97. Anastasiadis PZ, Reynolds AB: The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *Journal of Cell Science* 2000; 113:1319-1334.
98. Dejana E, Spagnuolo R, Bazzoni G: Interendothelial junctions and their role in the control of angiogenesis, vascular permeability and leukocyte transmigration. *Thrombosis and Haemostasis* 2001; 86:308-315.
99. Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G et al.: A novel endothelial-specific membrane-protein is a marker of cell cell contacts. *Journal of Cell Biology* 1992; 118:1511-1522.
100. Grosheva I, Shtutman M, Elbaum M, Bershadsky AD: p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *Journal of Cell Science* 2001; 114:695-707.
101. Iyer S, Ferreri DM, DeCocco NC, Minnear FL, Vincent PA: VE-cadherin-p120 interaction is required for maintenance of endothelial barrier function. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2004; 286:L1143-L1153.
102. Noren NK, Liu BP, Burrige K, Kreft B: p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *Journal of Cell Biology* 2000; 150:567-579.
103. Xiao K, Allison DF, Kottke MD, Summers S, Sorescu GP, Faundez V et al.: Mechanisms of VE-cadherin processing and degradation in microvascular endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278:19199-19208.
104. Andriopoulou P, Navarro P, Zanetti A, Lampugnani MG, Dejana E: Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1999; 19:2286-2297.

105. Dejana E, Corada M, Lampugnani MG: Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB Journal* 1995; 9:910-918.
106. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S et al.: Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *Journal of Cell Biology* 1993; 123:1777-1788.
107. Balda MS, Whitney JA, Flores C, Gonzalez S, Cereijido M, Matter K: Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *Journal of Cell Biology* 1996; 134:1031-1049.
108. Chen Y, Merzdorf C, Paul DL, Goodenough DA: COOH terminus of occludin is required for tight junction barrier function in early *Xenopus* embryos. *Journal of Cell Biology* 1997; 138:891-899.
109. McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, Furuse M, Tsukita S, Rogers RA et al.: Occludin is a functional component of the tight junction. *Journal of Cell Science* 1996; 109:2287-2298.
110. Muller SL, Portwich M, Schmidt A, Utepbergenov DI, Huber O, Blasig IE et al.: The tight junction protein occludin and the adherens junction protein alpha-catenin share a common interaction mechanism with ZO-1. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280:3747-3756.
111. Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S et al.: Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *Journal of Cell Biology* 1994; 127:1617-1626.
112. Kuwabara H, Kokai Y, Kojima T, Takakuwa R, Mori M, Sawada N: Occludin regulates actin cytoskeleton in endothelial cells. *Cell Structure and Function* 2001; 26:109-116.
113. Clarke H, Soler AP, Mullin JM: Protein kinase C activation leads to dephosphorylation of occludin and tight junction permeability increase in LLC-PK1 epithelial cell sheets. *Journal of Cell Science* 2000; 113:3187-3196.
114. Jou TS, Nelson WJ: Effects of regulated expression of mutant RhoA and Rac1 small GTPases on the development of epithelial (MDCK) cell polarity. *Journal of Cell Biology* 1998; 142:85-100.
115. Hirase T, Staddon JM, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M et al.: Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *Journal of Cell Science* 1997; 110 (Pt 14):1603-1613.
116. Kim JY, Sajjan US, Krasan GP, Lipuma JJ: Disruption of tight junctions during traversal of the respiratory epithelium by *Burkholderia cenocepacia*. *Infection and Immunity* 2005; 73:7107-7112.
117. Sun YJ, Chen WM, Zhang TZ, Cao HJ, Zhou J: Effects of cardiopulmonary bypass on tight junction protein expressions in intestinal mucosa of rats. *World*

Journal of Gastroenterology 2008; 14:5868-5875.

118. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H et al.: Adrenomedullin - A novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1993; 192:553-560.
119. Lopez J, Martinez A: Cell and molecular biology of the multifunctional peptide, adrenomedullin. *International Review of Cytology* 2002; 221:1-92.
120. Bell D, McDermott BJ: Intermedin (adrenomedullin-2): a novel counter-regulatory peptide in the cardiovascular and renal systems. *British Journal of Pharmacology* 2008; 153 Suppl 1:S247-S262.
121. Ishimitsu T, Kojima M, Kangawa K, Hino J, Matsuoka H, Kitamura K et al.: Genomic structure of human adrenomedullin gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1994; 203:631-639.
122. Kitamura K, Kangawa K, Eto T: Adrenomedullin and PAMP: Discovery, structures, and cardiovascular functions. *Microscopy Research and Technique* 2002; 57:3-13.
123. Shimosawa T, Fujita T: Adrenomedullin and its related peptide. *Endocrine Journal* 2005; 52:1-10.
124. Hirayama N, Kitamura K, Imamura T, Kato J, Koiwaya Y, Eto T: Secretion and clearance of the mature form of adrenomedullin in humans. *Life Sciences* 1999; 64:2505-2509.
125. Kitamura K, Kato J, Kawamoto M, Tanaka M, Chino N, Kangawa K et al.: The intermediate form of glycine-extended adrenomedullin is the major circulating molecular form in human plasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 244:551-555.
126. Buhlmann N, Leuthauser K, Muff R, Fischer JA, Born W: A receptor activity modifying protein (RAMP)2-dependent adrenomedullin receptor is a calcitonin gene-related peptide receptor when coexpressed with human RAMP1. *Endocrinology* 1999; 140:2883-2890.
127. Samson WK: Adrenomedullin and the control of fluid and electrolyte homeostasis. *Annual Review of Physiology* 1999; 61:363-389.
128. Hay DL, Conner AC, Howitt SG, Smith DM, Poyner DR: The pharmacology of adrenomedullin receptors and their relationship to CGRP receptors. *Journal of Molecular Neuroscience* 2004; 22:105-113.
129. Eguchi S, Hirata Y, Kano H, Sato K, Watanabe Y, Watanabe TX et al.: Specific receptors for adrenomedullin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Febs Letters* 1994; 340:226-230.

130. Michibata H, Mukoyama M, Tanaka I, Suga S, Nakagawa M, Ishibashi R et al.: Autocrine/paracrine role of adrenomedullin in cultured endothelial and mesangial cells. *Kidney International* 1998; 53:979-985.
131. Hippenstiel S, Witzenrath M, Schmeck B, Hocke A, Krisp M, Krull M et al.: Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability. *Circulation Research* 2002; 91:618-625.
132. Hocke AC, Temmesfeld-Wollbrueck B, Schmeck B, Berger K, Frisch EM, Witzenrath M et al.: Perturbation of endothelial junction proteins by Staphylococcus aureus alpha-toxin: inhibition of endothelial gap formation by adrenomedullin. *Histochemistry and Cell Biology* 2006; 126:305-316.
133. Temmesfeld-Wollbruck B, Hocke AC, Suttorp N, Hippenstiel S: Adrenomedullin and endothelial barrier function. *Thrombosis and Haemostasis* 2007; 98:944-951.
134. Sugo S, Minamino N, Kangawa K, Miyamoto K, Kitamura K, Sakata J et al.: Endothelial cells actively synthesize and secrete adrenomedullin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1994; 201:1160-1166.
135. Hinson JP, Kapas S, Smith DM: Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocrine Reviews* 2000; 21:138-167.
136. Takahashi K, Satoh F, Sone M, Totsune K, Arihara Z, Noshiro T et al.: Expression of adrenomedullin mRNA in adrenocortical tumors and secretion of adrenomedullin by cultured adrenocortical carcinoma cells. *Peptides* 1998; 19:1719-1724.
137. Isumi Y, Shoji H, Sugo S, Tochimoto T, Yoshioka M, Kangawa K et al.: Regulation of adrenomedullin production in rat endothelial cells. *Endocrinology* 1998; 139:838-846.
138. Meeran K, O Shea D, Upton PD, Small CJ, Ghatei MA, Byfield PH et al.: Circulating adrenomedullin does not regulate systemic blood pressure but increases plasma prolactin after intravenous infusion in humans: A pharmacokinetic study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997; 82:95-100.
139. Ishimitsu T, Miyata A, Kangawa K, Matsuoka H: Transcriptional regulation of human adrenomedullin gene in vascular endothelial cells. *Journal of Hypertension* 1998; 16:S40.
140. Wang P, Zhou M, Ba ZF, Cioffi WG, Chaudry IH: Up-regulation of a novel potent vasodilatory peptide adrenomedullin during polymicrobial sepsis. *Shock* 1998; 10:118-122.
141. Hirata Y, Mitaka C, Sato K, Nagura T, Tsunoda Y, Amaha K et al.: Increased circulating adrenomedullin, a novel vasodilatory peptide, in sepsis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996; 81:1449-1453.
142. Ueda S, Nishio K, Minamino N, Kubo A, Akai Y, Kangawa K et al.: Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with systemic inflammatory response

- syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1999; 160:132-136.
143. Wang P: Adrenomedullin in sepsis and septic shock. *Shock* 1998; 10:383-384.
144. Fowler DE, Wang P: The cardiovascular response in sepsis: proposed mechanisms of the beneficial effect of adrenomedullin and its binding protein (review). *International Journal of Molecular Medicine* 2002; 9:443-449.
145. Fowler DE, Yang S, Zhou M, Chaudry IH, Simms HH, Wang P: Adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1: their role in the septic response. *Journal of Surgical Research* 2003; 109:175-181.
146. Shindo T, Kurihara H, Maemura K, Kurihara Y, Kuwaki T, Izumida T et al.: Hypotension and resistance to lipopolysaccharide-induced shock in transgenic mice overexpressing adrenomedullin in their vasculature. *Circulation* 2000; 101:2309-2316.
147. 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. *Critical Care Medicine* 2002; 30:2729-2735.
148. 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. *Annals of Surgery* 2002; 236:625-633.
149. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM: Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews* 2000; 13:16-+.
150. Zolotarevsky Y, Hecht G, Koutsouris A, Gonzalez DE, Quan C, Tom J et al.: A membrane-permeant peptide that inhibits MLC kinase restores barrier function in in vitro models of intestinal disease. *Gastroenterology* 2002; 123:163-172.
151. Mayer K, Temmesfeld-Wollbruck B, Friedland A, Olschewski H, Reich M, Seeger W et al.: Severe microcirculatory abnormalities elicited by E-coli hemolysin in the rabbit ileum mucosa. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1999; 160:1171-1178.
152. Giaever I, Keese CR: A morphological biosensor for mammalian cells. *Nature* 1993; 366:591-592.
153. Tiruppathi C, Malik AB, Del Vecchio PJ, Keese CR, Giaever I: Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: assessment of endothelial barrier function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1992; 89:7919-7923.
154. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins - Identification by morphologic and immunological criteria. *Journal of Clinical Investigation* 1973; 52:2745-2756.
155. Owens SE, Graham WV, Siccardi D, Turner JR, Mrsny RJ: A strategy to identify

- stable membrane-permeant peptide inhibitors of myosin light chain kinase. *Pharmaceutical Research* 2005; 22:703-709.
156. Nieuw Amerongen GP, van Delft S, Vermeer MA, Collard JG, van Hinsbergh VW: Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of Rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circulation Research* 2000; 87:335-340.
157. Birukova AA, Smurova K, Birukov KG, Kaibuchi K, Garcia JG, Verin AD: Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction. *Microvascular Research* 2004; 67:64-77.
158. Garcia JG, Verin AD, Schaphorst KL: Regulation of thrombin-mediated endothelial cell contraction and permeability. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1996; 22:309-315.
159. Lum H, Malik AB: Regulation of vascular endothelial barrier function. *American Journal of Physiology* 1994; 267:L223-L241.
160. Emmert DA, Fee JA, Goeckeler ZM, Grojean JM, Wakatsuki T, Elson EL et al.: Rho-kinase-mediated Ca²⁺-independent contraction in rat embryo fibroblasts. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2004; 286:C8-C21.
161. Kernodle DS, Voladri RK, Menzies BE, Hager CC, Edwards KM: Expression of an antisense hla fragment in *Staphylococcus aureus* reduces alpha-toxin production in vitro and attenuates lethal activity in a murine model. *Infection and Immunity* 1997; 65:179-184.
162. Cheung AL, Nishina KA, Trotonda MP, Tamber S: The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2008; 40:355-361.
163. Pruefer D, Makowski J, Schnell M, Buerke U, Dahm M, Oelert H et al.: Simvastatin inhibits inflammatory properties of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Circulation* 2002; 106:2104-2110.
164. Fritz-Six KL, Dunworth WP, Li M, Caron KM: Adrenomedullin signaling is necessary for murine lymphatic vascular development. *Journal of Clinical Investigation* 2008; 118:40-50.
165. Kato J, Tsuruda T, Kita T, Kitamura K, Eto T: Adrenomedullin: a protective factor for blood vessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2005; 25:2480-2487.
166. Temmesfeld-Wollbruck B, Brell B, Dohna CZ, Dorenberg M, Hocke AC, Martens H et al.: Adrenomedullin reduces intestinal epithelial permeability in vivo and in vitro. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2009; 297:G43-G51.
167. Kis B, Snipes JA, Deli MA, Abraham CS, Yamashita H, Ueta Y et al.: Chronic adrenomedullin treatment improves blood-brain barrier function but has no effects on expression of tight junction proteins. *Acta Neurochirurgica*.

- Supplement* 2003; 86:565-568.
168. Stevens T, Garcia JG, Shasby DM, Bhattacharya J, Malik AB: Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *American Journal of Physiology -Lung Cellular and Molecular Physiology* 2000; 279:L419-L422.
 169. Laher I, Thorintrescases N, Ding A, Laporte R, Osol G: Alpha-toxin selectively impairs endothelial-dependent vasodilator responses. *FASEB Journal* 1995; 9:A61.
 170. Bruhn H.D. Hämostaseologie für die Praxis. Christian M.Schambeck u.Viola Hach-Wunderle. Sicher durch den klinischen Alltag. Schattauer Verlag 2007, 1.
 171. Bhakdi S, Fussle R, Trantum-Jensen J: Staphylococcal alpha-toxin: oligomerization of hydrophilic monomers to form amphiphilic hexamers induced through contact with deoxycholate detergent micelles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1981; 78:5475-5479.
 172. Valeva A, Walev I, Gerber A, Klein J, Palmer M, Bhakdi S: Staphylococcal alpha-toxin: repair of a calcium-impermeable pore in the target cell membrane. *Molecular Microbiology* 2000; 36:467-476.
 173. Garcia JG, Lazar V, Gilbert-McClain LI, Gallagher PJ, Verin AD: Myosin light chain kinase in endothelium: molecular cloning and regulation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1997; 16:489-494.
 174. Nobes CD, Hall A: Rho, Rac and Cdc42 Gtpases - Regulators of actin structures, cell-adhesion and motility. *Biochemical Society Transactions* 1995; 23:456-459.
 175. Ridley AJ: Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends in Cell Biology* 2001; 11:471-477.
 176. Seybold J, Thomas D, Witzentrath M, Boral S, Hocke AC, Burger A et al.: Tumor necrosis factor-alpha-dependent expression of phosphodiesterase 2: role in endothelial hyperpermeability. *Blood* 2005; 105:3569-3576.
 177. Szokodi I, Kinnunen P, Tavi P, Weckstrom M, Toth M, Ruskoaho H: Evidence for cAMP-independent mechanisms mediating the effects of adrenomedullin, a new inotropic peptide. *Circulation* 1998; 97:1062-1070.
 178. Somlyo AP, Somlyo AV: Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *Journal of Physiology-London* 2000; 522:177-185.
 179. Kouklis P, Konstantoulaki M, Malik AB: VE-cadherin-induced Cdc42 signaling regulates formation of membrane protrusions in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278:16230-16236.
 180. Lampugnani MG, Zanetti A, Breviario F, Balconi G, Orsenigo F, Corada M et al.: VE-cadherin regulates endothelial actin activating Rac and increasing membrane association of Tiam. *Molecular Biology of the Cell* 2002; 13:1175-1189.

7 Danksagung

Die Forschung im Bereich der Sepsis, deren Auswirkungen auf den Organismus verheerend sind, hat sich immer weiterentwickelt und ist einer der Grundpfeiler in der modernen Intensivmedizin. Systemische Entzündungsreaktionen und Infektionen bis hin zur Sepsis sind Themen, die den täglichen klinischen Alltag bestimmen und deren therapeutische Interventionsmöglichkeiten bei weitem nicht ausgeschöpft sind. Ich danke daher Herrn Prof. Dr. Stefan Hippenstiel für die Vergabe des Themas und für die Möglichkeit auf diesem Gebiet in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie bei Prof. Norbert Suttorp promovieren zu dürfen. Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Andreas Hocke und Herrn PD Dr. Bernd Schmeck, die mich in jeder Situation unterstützt haben und jederzeit für Fragen zur Verfügung standen. Herrn Dr. Hocke möchte ich hervorheben, da er mir die Freude am wissenschaftlichen Arbeiten und den Blick für die wesentlichen Dinge nahe gebracht hat.

Ich möchte Herrn Dr. Bernhard Brell für die hervorragende Versuchsdurchführung und Vorbereitung der isoliert perfundierten Rattendärme zugunsten der histologischen Aufarbeitung danken. Ferner möchte ich mich für die Bereitstellung des MLCK-Inhibitors herzlich bei Jerrold R. Turner von der Universität von Chicago bedanken. Mein Dank gilt auch Kerstin Möhr und Dr. Janine Zahlten, die mir während der Einarbeitung und der weiteren Arbeit im Labor sehr geholfen haben.

Meiner Familie möchte ich ebenfalls danken, da sie immer an mich geglaubt und mir in jedem Lebensabschnitt zur Seite gestanden hat. Adam Chalk danke ich für seinen Optimismus und seinen Rückhalt.

8 Erklärung

„Ich, Katharina Judith Berger, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: **„Integritätsstörung endothelialer Junctionsproteine durch *Staphylococcus aureus* alpha-Toxin -Stabilisierung durch Adrenomedullin“** selbst verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe. Bei den von mir durchgeführten Untersuchungen habe ich die Grundsätze der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätmedizin Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis eingehalten.“

Berlin, 26. März 2010

Katharina Berger

9 Lebenslauf

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

10 Publikationsliste

1. Hocke AC, Temmesfeld-Wollbrueck B, 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 (Zum Thema der vorliegenden Arbeit)

2. Witzenrath M, Gutbier B, Hocke AC, Schmeck B, Hippenstiel S, **Berger K**, Mitchell TJ, de los Toyos JR, Rosseau S, Suttorp N, Schutte H.

“Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia.” Crit Care Med. 2006

3. Sander M, Spies CD, **Berger K**, Grubitzsch H, Foer A, Krämer M, Carl M, von Heymann C.

“Prediction of volume response under open-chest conditions during coronary artery bypass surgery.” Crit Care 2007

4. **Berger K**, Sander M, Spies CD, Weymann L, Buhner S, Lochs H, Wernecke K, von Heymann C.

“Profound haemodilution during normothermic cardiopulmonary bypass neither influences gastrointestinal permeability nor cytokine release in coronary artery bypass graft surgery.” Br J Anaesth. 2009

5. Sander M, Spies CD, **Berger K**, Schroder T, Grubitzsch H, Wernecke KD, von Heymann C.

“Perioperative indocyanine green clearance is predictive for prolonged intensive care unit stay after coronary artery bypass grafting - an observational study.” Crit Care 2009