

Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Infektiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zyklische Nukleotid-
abhängige Phosphorylierung von
Vasodilator-stimuliertem Phosphoprotein (VASP)
an Serin¹⁵⁷ und deren Einfluss auf das Zytoskelett
humaner Endothelzellen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anna Katharina Starzacher
aus Frankfurt am Main

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. N. Suttorp
 2. Prof. Dr. med. G. Schönrich
 3. Prof. Dr. med. H.-J. Schnittler

Datum der Promotion: 14.06.2009

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Einleitung | 5 |
| 1.1 | Endothel | 5 |
| 1.2 | Das endotheliale Zytoskelett | 6 |
| 1.2.1 | Das Strukturprotein Aktin | 7 |
| 1.2.2 | Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte | 8 |
| 1.2.2.1 | Zell-Zell-Kontakte | 9 |
| 1.2.2.2 | Zell-Matrix-Kontakte | 9 |
| 1.3 | Entzündung | 10 |
| 1.3.1 | Thrombin | 10 |
| 1.3.2 | Kleine GTP-bindende Proteine | 12 |
| 1.4 | Endotheliale Permeabilität | 13 |
| 1.4.1 | Transzelluläre endotheliale Permeabilität | 13 |
| 1.4.2 | Parazelluläre endotheliale Permeabilität | 14 |
| 1.4.3 | Zelluläre Vorgänge im Rahmen veränderter parazellulärer Permeabilität | 14 |
| 1.5 | Zyklische Nukleotide | 16 |
| 1.5.1 | Regulation der zyklischen Nukleotide | 17 |
| 1.5.1.1 | Adenylylzyklase und Guanylylzyklase | 17 |
| 1.5.1.2 | Phosphodiesterasen | 17 |
| 1.5.2 | Wirkungsweise der zyklischen Nukleotide | 18 |
| 1.6 | Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein (VASP) | 19 |
| 1.6.1 | Struktur von Vasodilator-stimuliertem Phosphoprotein | 19 |
| 1.6.1.1 | Die EVH1-Domäne | 19 |
| 1.6.1.2 | Das prolinhaltige Zentrum | 20 |
| 1.6.1.3 | Die EVH2-Domäne | 20 |
| 1.6.2 | Vorkommen | 21 |
| 1.6.3 | Regulation | 22 |
| 1.6.4 | Funktion | 24 |
| 1.7 | Klinische Relevanz | 25 |
| 1.8 | Fragestellung | 26 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2 | Material und Methoden | 27 |
| 2.1 | Material | 27 |
| 2.1.1 | Chemikalien | 27 |
| 2.1.2 | Kulturmedien | 28 |
| 2.1.3 | Puffer und Lösungen | 29 |
| 2.1.4 | Zubehör | 32 |
| 2.1.5 | Spezielle Geräte | 32 |
| 2.1.6 | Antikörper | 33 |
| 2.1.7 | Verzeichnis der Firmen | 33 |
| 2.2 | Methoden | 34 |
| 2.2.1 | Zellkultur humaner Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) | 34 |
| 2.2.1.1 | Isolierung | 34 |
| 2.2.1.2 | Passagieren | 34 |
| 2.2.2 | Bestimmung der endothelialen Permeabilität | 35 |
| 2.2.2.1 | Präparation der Membranen | 35 |
| 2.2.2.2 | Bepflanzung der Membranen | 35 |
| 2.2.2.3 | Bestimmung der Permeabilität | 36 |
| 2.2.3 | Immunfluoreszenzmikroskopie | 37 |
| 2.2.3.1 | Fixierung und Permeabilisierung | 37 |
| 2.2.3.2 | Antigendetektion | 37 |
| 2.2.4 | Western Blot | 38 |
| 2.2.4.1 | Proteinextraktion | 38 |
| 2.2.4.2 | Proteinbestimmung nach Bradford | 38 |
| 2.2.4.3 | Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese | 38 |
| 2.2.4.4 | Protein-Blot | 39 |
| 2.2.4.5 | Nachweis der Proteine auf der Membran | 39 |
| 2.2.4.6 | Antikörperexposition | 39 |
| 2.2.5 | Statistische Methoden | 40 |
| 3 | Ergebnisse | 41 |
| 3.1 | Untersuchungen zur endothelialen Permeabilität | 41 |
| 3.1.1 | Thrombin erhöhte die endotheliale Permeabilität in HUVECs | 41 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.1.2 | Zyklische Nukleotide reduzierten Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität | 42 |
| 3.2 | Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts | 47 |
| 3.2.1 | Das Aktingerüst ruhender und Thrombin-stimulierter Endothelzellen | 47 |
| 3.2.2 | Das Aktinzytoskelett von HUVECs nach cAMP-erhöhenden Maßnahmen | 48 |
| 3.2.3 | Erhöhte cAMP-Spiegel stabilisierten das Aktinzytoskelett von HUVECs | 49 |
| 3.2.4 | Das Aktingerüst von HUVECs bei erhöhten intrazellulären cGMP-Spiegeln | 51 |
| 3.2.5 | Erhöhte cGMP-Spiegel stabilisierten das Aktinzytoskelett von HUVECs | 52 |
| 3.3 | Das Phosphorylierungsprofil von VASP nach Beeinflussung der intrazellulären Konzentration zyklischer Nukleotide | 55 |
| 3.3.1 | cAMP und cGMP erhöhten den Anteil an Serin ¹⁵⁷ -phospho-VASP | 55 |
| 3.3.2 | Inhibition der PDE2 blieb ohne Effekt auf die Phosphorylierung von VASP an Serin ¹⁵⁷ | 56 |
| 3.3.3 | Inhibition der cAMP-abbauenden PDEs induzierte eine Phosphorylierung von VASP | 57 |
| 3.3.4 | Die Inhibition der Proteinkinasen A und G hatte geringe Auswirkungen auf das Phosphorylierungsprofil von VASP | 59 |
| 4 | Diskussion | 62 |
| 4.1 | Erhöhte cAMP- und cGMP- Spiegel reduzieren die Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität in HUVECs | 62 |
| 4.1.1 | cAMP reduziert Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität | 62 |
| 4.1.2 | Einfluss von cGMP auf Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität | 62 |
| 4.2 | Erhöhte intrazelluläre Nukleotidspiegel alterieren das Aktin-Zytoskelett in HUVECs | 65 |
| 4.2.1 | cAMP-erhöhende Maßnahmen stabilisieren das Aktin-Zytoskelett | 65 |
| 4.2.2 | Veränderungen des Zytoskeletts nach cGMP-erhöhenden Maßnahmen | 66 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.3 | Erhöhte cAMP- und cGMP- Spiegel verändern das Phosphorylierungsprofil von VASP | 68 |
| 4.3.1 | cAMP-erhöhende Maßnahmen induzieren eine VASP-Phosphorylierung an Serin ¹⁵⁷ in HUVECs | 68 |
| 4.3.2 | cGMP erhöht den Anteil von an Serin ¹⁵⁷ phosphoryliertem VASP in HUVECs | 69 |
| 4.4 | Einfluss der VASP-Phosphorylierung auf die Stabilisierung der endothelialen Barriere | 70 |
| 4.5 | Fazit | 74 |
| 5 | Zusammenfassung | 77 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 78 |
| 7 | Anhang | 100 |
| | Abkürzungsverzeichnis | 100 |
| | Erklärung | 102 |
| | Lebenslauf | 103 |
| | Danksagung | 104 |

1 Einleitung

Endothelzellen sind die primären Regulatoren der Gefäßpermeabilität. Im Rahmen akuter und chronischer Entzündungen kommt es durch äußere Einflüsse (zum Beispiel bakterielle Toxine, physikalische und chemische Noxen) sowie humorale und zelluläre Mediatoren zu endothelialer Hyperpermeabilität mit Ödembildung (van Nieuw Amerongen, 2002; Yuan, 2002; Farand, 2006; Czabanka, 2007). Dabei führen Alterationen des endothelialen Zytoskeletts und Änderungen der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen zu interzellulärer Lückenbildung mit parazellulärer Filtration von Flüssigkeit und Blutbestandteilen (McDonald, 1999; Bogatcheva, 2002; van Nieuw Amerongen, 2002; Minshall, 2006; Mehta, 2006; Temmesfeld-Wollbrück, 2007). Die vorgelegte Arbeit untersucht die Rolle der sekundären intrazellulären Botenstoffe zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) sowie der Phosphorylierung des Strukturproteins Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein (VASP) in Bezug auf die Permeabilität von aus Nabelschnurvenen isolierten humanen Endothelzellen (HUVECs).

1.1 Endothel

Endothelzellen kleiden die Blut- und Lymphgefäße sowie die Herzhöhlen von innen aus und bilden die Grenzschicht zwischen intra- und extravasalem Raum (Stevens, 2000; van Nieuw Amerongen, 2002). Sie sind in einfacher Zellschicht angeordnet und haben im menschlichen Körper eine Gesamtfläche, die etwa 350 m² entspricht und ein Gesamtgewicht von etwa 110 g (Pries, 2006). In Zellkultur bilden sie bei Konfluenz ein an Kopfsteinpflaster erinnerndes morphologisches Bild, die einzelne Zelle ist abgeflacht und polygonal. *In vivo* ist die Endothelzelle eher spindelförmig entsprechend der Blutströmung ausgerichtet (Dewey, 1981; Malek, 1996).

Das Endothel bildet keine rein passive Barriere, sondern kontrolliert aktiv den Austausch von Stoffen zwischen Blut und umliegendem Gewebe (Escoubet, 1979; Malik, 1989; Stevens, 2000; van Nieuw Amerongen, 2002; Mehta, 2006). Die Endothelzellen stellen Zielzellen von im Blut zirkulierenden Pathogenen oder deren Produkten dar (Hippenstiel, 2003). Die im Rahmen von generalisierter oder spezifischer Entzündung erhöhten Zyto- und Chemokine sowie andere Inflammationsprodukte haben hier einen wichtigen Wirkort (Crone, 1986).

Des Weiteren hat das Endothel regulatorische Funktionen, welche sowohl die unmittelbare Umgebung als auch den Gesamtorganismus betreffen. Für die

revolutionäre Entdeckung, dass ein vom Endothel produziertes Molekül - das Stickstoffmonoxid - eine Schlüsselfunktion im Herz-Kreislauf System übernimmt, wurden die Forschungsarbeiten von Robert F. Furchtgott, Ferid Murad und Louis Ignarro 1998 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet (Ignarro, 1987; Mitchell, 1991). Darüber hinaus ist das Endothel maßgeblich an der Blutgerinnung beteiligt. Thrombozyten werden durch verletzte Endothelzellen aktiviert, was eine Thrombozytenaggregation zur Folge hat (Chen, 2005; Langer, 2005; Rumbaut, 2005; Strukova, 2006). Außerdem wird der klassische Weg der Komplementkaskade der Gerinnung durch Endothelzellen aktiviert (Yin, 2007). Entzündungsreaktion und Blutgerinnung stellen entscheidende Mechanismen im Rahmen der Abwehr dar. Die Endothelzelle bildet dabei einen Überschneidungspunkt der Kaskaden der Entzündungsreaktion und der Blutgerinnung (Strukova, 2006).

Das Endothel ist für die Aufrechterhaltung von übergeordneten und lebenswichtigen Körperfunktionen notwendig. Die Endothelzellen bilden eine semipermeable Schranke, über welche chemische und physikalische Gradienten aufrecht erhalten werden müssen (Stevens, 2000; Mehta, 2006). Es darf weder durch physiologische Faktoren wie Blutdruck, osmotischen Druck oder Schubspannung, noch durch pathologische Faktoren wie Infektion, physikalischen oder chemischen Stress seine Integrität verlieren (Franke, 1984; Li, 2005).

Eine Besonderheit der Endothelzellschicht stellt die Variabilität ihrer Dichtigkeit dar (Stevens, 2000). Sie ist in verschiedenen Organen und hier innerhalb der einzelnen Gefäßabschnitte unterschiedlich stark ausgeprägt (Del Vecchio, 1987; Stevens, 2000). Zum Beispiel bildet das Endothel in den Sinusoiden von Leber, Milz und Knochenmark keine kontinuierliche Zellschicht, sondern weist Poren unterschiedlicher Größe auf. So kann es den Anforderungen des erhöhten Stoffaustausches zwischen intra- und extravasalem Raum in diesen Organsystemen gerecht werden (Del Vecchio, 1987; Pries, 2006). Je nach Bedarf des darunter liegenden Gewebes in Ruhe oder nach Stimulation durch entsprechende Mediatoren und Toxine ist das Endothel für Serum und darin gelöste oder suspensierte Substanzen durchlässig (Stevens, 2000; Kadl, 2005; Wu, 2005; Pries, 2006; Mehta, 2006).

1.2 Das endotheliale Zytoskelett

Das endotheliale Zytoskelett besteht aus einem Netzwerk verschiedener intrazellulärer Proteine und ist für die Form, Beweglichkeit, Migration und Polarität der Zelle (Gabbiani,

1984; Gotlieb, 1987; Wong, 1988) sowie den Erhalt des Gewebeverbands über Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte verantwortlich (Kalnins, 1981; Dudek, 2001; Lee, 2003). Es ist ein hochdynamisches Gebilde mit der Fähigkeit zu kontinuierlichem Um- und Neubau (Kalnins, 1981). Das Zytoskelett der Endothelzellen besteht unter anderem aus Mikrofilamenten (Aktin), Intermediärfilamenten (Vimentin, Desmin, Keratine und Neurofilamente) und Mikrotubuli (Tubulin) sowie weiteren Struktur- und Funktionsproteinen (Wong, 1988; Li, 2005). Bedingungen, welche zu Alterationen des Zytoskeletts führen, verändern Form und Funktionszustand der Zelle und können zu interzellulärer Lückenbildung und folgendem Barriereversagen führen (Schnittler, 1990; Ingber, 1997; Dudek, 2001; Lee, 2003; Guo, 2006; Kanthou, 2006).

1.2.1 Das Strukturprotein Aktin

Monomeres oder globuläres G-Aktin besteht aus 375 Aminosäuren (AS) und hat ein Molekulargewicht von 42 kDa, es steht im Gleichgewicht zu polymerem F-Aktin (filamentäres Aktin; Lee, 2003). Die *de novo* Synthese von F-Aktin bedarf zunächst eines so genannten Nukleus, welcher aus einer energetisch ungünstigen Verbindung von drei G-Aktinmolekülen besteht (Cooper, 1983; Lal, 1984; Sept, 2001; Lee, 2003). Dieses Aktintrimer wird in der Zelle durch Anlagerung verschiedener Proteine stabilisiert (Higgs, 2001; Welch, 2002). Durch Anlagerung von weiteren monomeren Aktinmolekülen werden Aktinfilamente polymerisiert. Bei der Synthese neuer Aktinfilamente ist die Bildung des Nukleus der zeitbestimmende Schritt (Dramsi, 1998). F-Aktin besteht aus zwei Ketten G-Aktin, welche sich zu einer Helix aneinanderlagern (Holmes, 1990; Lee, 2003; Aguda, 2005). Dabei ist jedes G-Aktin polarisiert und lagert sich seiner Polarität entsprechend ausgerichtet an die benachbarte Untereinheit (Lee, 2003). Auf Grund der Polarität der Untereinheiten lassen sich ein schneller polymerisierendes „Plus-Ende“ und ein circa zehnmal langsamer polymerisierendes „Minus-Ende“ unterscheiden (Schafer, 1995; Higgs, 2001; Lee, 2003). Zur Verlängerung der Filamente werden G-Aktin-Moleküle mit gebundenem ATP benötigt, die Depolymerisation wird durch die Hydrolyse des aktin gebundenen ATP zu ADP eingeleitet (Carrier, 1990; Lee, 2002; Lee, 2003).

Vorkommen

Das Protein Aktin ist Baustein der Mikrofilamente des Zytoskeletts aller tierischen Zellen und der Myofibrillen in Muskelzellen. In vaskulären Endothelzellen kommt Aktin in

kurzen Mikrofilamenten in der Zellperipherie sowie gebündelt in Form so genannter Stressfasern vor (Wong, 1983; Wong, 1986; Schnittler, 1989; Gotlieb, 1990; Lee, 2003). Migrierende Endothelzellen bilden außerdem in den Bereichen ihrer Filopodien und Lamellopodien Aktinfilamente aus (Gov, 2006). Die Morphologie und Anzahl der Aktinfilamente verändert sich je nach physiologischer und pathophysiologischer Belastung der Endothelzelle, wie zum Beispiel in Abhängigkeit von Schubspannung oder Blutdruck (Wong, 1983; Gabbiani, 1984; Dudek, 2001; Shin, 2003; Li, 2005; Wu, 2007)

Die in der Zellperipherie angereicherten Aktinfilamente, auch als „dense peripheral band“ (DPB) bezeichnet, sind in präkonfluenten Zellkulturen oder Zellinseln noch nicht vorhanden, sondern erst bei Konfluenz nachweisbar (Wong, 1986; Lee, 2003). Dieses Verhalten lässt auf eine Funktion des DPB in Zusammenhang mit Zell-Zell-Kontakten und damit der Zellverband-Integrität schließen (Wong, 1986; Dudek, 2001; Lee, 2003; Lee, 2005).

Den Stressfasern, welche das Zytosol durchkreuzen, wird eine wichtige Rolle bei der Ausbildung und der Verankerung von Zell-Matrix-Kontakten zugesprochen (Dudek, 2001; Lee, 2003). Stressfasern treten bei verschiedenen Belastungssituationen sowie im Rahmen der Zellkontraktion nach entsprechender Stimulation vermehrt auf (Wong, 1986; Bussolino, 1987; Ehringer, 1999; Lee, 2003).

1.2.2 Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte

Das Funktionieren einzelner Endothelzellen als Einheit im Zellverband bedarf ihrer Kommunikation über Verbindungen untereinander sowie zu der basal benachbarten Matrix (Dudek, 2001). Diese Verbindungen werden durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte vermittelt, sie gewährleisten ein abgestimmtes Verhalten der Zellen auf die jeweiligen Anforderungen (Mehta, 2006). Anzahl, Art und Dichte der Zell-Zell-beziehungsweise Zell-Matrix-Kontakte bestimmen die Durchlässigkeit der Barrierschicht (Dudek, 2001; Lee, 2003; Wu, 2005). Die Adhäsionsbereiche zu benachbarten Zellen oder zur Matrix stellen dabei keine statischen Gebilde dar, sondern unterliegen einer kontinuierlichen Neuordnung, um den Anforderungen an die einzelne Zelle oder den Zellverband situativ entsprechen zu können (Mehta, 2006). Zum Beispiel werden bei Verletzungen der Endothelschicht die Kontakte einer dem Defekt benachbarten Zelle zu ihren Nachbarzellen aufgelöst, sie kann sich nun mit Hilfe

„wandernder“ Zell-Matrix-Kontakte in Richtung des Defekts bewegen um diesen zu verschließen (Gabbiani, 1984; Shuster, 1998; Naik, 2006).

1.2.2.1 Zell-Zell-Kontakte

Zell-Zell-Kontakte, so genannte „Adherens Junctions“, verbinden benachbarte Endothelzellen an ihrer lateralen Wand (Lee, 2003; Broman, 2006). Sie bestehen zum Beispiel aus den transmembranären Cadherinen, welche extrazellulär kalziumabhängig an die Cadherine der Nachbarzelle binden können (Stevens, 2000; Bogatcheva, 2002; Lee, 2003). Vaskuläres endotheliales Cadherin (VE-Cadherin) ist der Hauptbestandteil dieser Zell-Zell-Kontakte in humanen Endothelien, sein Wegfall bewirkt einen Anstieg der endothelialen Permeabilität ohne vorausgegangene Zellkontraktion (Lampugnani, 1995; Stevens, 2000; Lee, 2003; Broman, 2006). Intrazellulär sind die VE-Cadherine über α -, β - und γ -Catenin sowie über Aktin-bindende Proteine (wie zum Beispiel Vinculin, Zyxin oder α -Aktinin) mit Aktin verankert (Reinhard, 1996; Ingber, 1997; Lum, 2001; Lee, 2003). Die Verbindungen zwischen einzelnen Endothelzellen sind weniger dicht als zwischen Epithelzellen (zum Beispiel Darmepithel, Hautepithel), es wird eine parazelluläre Basisdiffusion von Wasser und Molekülen bis zu einer bestimmten Größe zwischen Blut und Gewebe ermöglicht (Rubin, 1992; Hirase, 1997).

1.2.2.2 Zell-Matrix-Kontakte

Zell-Matrix-Kontakte entstehen, indem sich sogenannte „Focal Adhesion“-Moleküle zu Komplexen zusammenlagern und Endothelzellen mit der extrazellulären basalen Matrix verbinden (Ingber, 1997; Lee, 2003; Wu, 2005). Der transmembranäre Teil der Focal Adhesions besteht jeweils aus α - und β -Integrinen (Lee, 2003). Die numerische Zusammensetzung dieser Integrine bestimmt dabei den extrazellulären Bindungspartner, zum Beispiel bindet Integrin $\alpha_5\beta_1$ an Fibronectin, während das Integrin $\alpha_2\beta_1$ an Kollagen bindet (Ingber, 1997). Intrazellulär sind die Integrine über Verbindungsproteine mit dem Zytoskelett verankert (Lee, 2003; Li, 2005). Als Verbindungsproteine fungieren hierbei unter anderem Talin, Vinculin, Paxillin, Zyxin und α -Aktinin (Plopper, 1993; Lee, 2003; Li, 2005). Sie übertragen die Kraft zwischen dem kontraktilem Apparat der Zelle und der extrazellulären Matrix.

1.3 Entzündung

Eine Entzündung ist klassischer Weise durch Rötung (Rubor), Schwellung (Tumor), Schmerz (Dolor), Überwärmung (Calor) und Funktionsverlust (Funktio laesa) des betroffenen Gewebes oder Organsystems gekennzeichnet. Die Schwellung kommt durch eine Verschiebung von Flüssigkeit von intravasal in das umgebende Gewebe zustande (Stevens, 2000; Alexander, 2002). Die Flüssigkeit wird auf Grund eines entzündungsbedingten Integritätsverlustes des Endothels dem Druckgradienten folgend aus den Gefäßen in das umliegende Gewebe gepresst, es kommt zum Gewebeödem (Michel, 1999; Stevens, 2000; Farand, 2006; Czabanka, 2007). Verursacht wird diese Störung der endothelialen Barriere zum Beispiel durch verschiedene chemische Noxen, Ischämie, Pathogene und deren Produkte (zum Beispiel *E. coli* Hämolysin A und *S. aureus* α -Toxin) sowie durch endogene Mediatoren wie Thrombin, Tumor-Nekrose-Faktor, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) und Histamin oder granulozytäre Produkte wie Hydroxylradikale, Proteasen oder Elastase (Ehringer, 1996; Hippenstiel, 1998; Alexander, 2001; Clauss, 2001; Hippenstiel, 2002; Hippenstiel, 2003; Seybold, 2005).

1.3.1 Thrombin

Thrombin ist eine Serin-Protease, deren Freisetzung aus im Blut zirkulierendem Prothrombin durch vorgeschaltete Proteine der Komplementkaskade (Faktor X und Faktor V) oder an der Oberfläche von in ihrer Integrität gestörten Endothelzellen vermittelt wird (Rodgers, 1983; Vu, 1991; Liu, 1996; Bogatcheva, 2002). Thrombin aktiviert zum einen die Blutgerinnung und bewirkt zum anderen Funktionsveränderungen der Endothelzellen. Diese beinhalten sowohl die Freisetzung von Entzündungsmediatoren, vasoaktiven Substanzen und Wachstumsfaktoren (Bogatcheva, 2002) als auch eine Alteration ihrer Barrierefunktion (Thurston, 1994; Ehringer, 2000; Sandoval, 2001).

Werden ruhende Endothelzellen *in vitro* mit Thrombin stimuliert, so resultiert eine starke Zunahme von Stressfasern, die Zellen kontrahieren sich und es bilden sich große interzelluläre Lücken aus (Garcia (1), 1995; Carbajal, 2000; Bogatcheva, 2002). Ein DPB ist in diesen Zellen nicht mehr nachzuweisen, es kommt zur Retraktion der Zellen mit konsekutiver Permeabilitätszunahme (Suttorp (2), 1996; Lee, 2003).

Thrombin aktiviert Endothelzellen direkt über die partielle Proteolyse seines membranständigen Rezeptors (Vu, 1991; Ehringer, 2000; Bogatcheva, 2002). Im

nächsten Schritt werden zum einen über verschiedene GTP-bindende Proteine die Adenylzyklase und somit die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) inhibiert und zum anderen die Aktivierung von Phospholipase C und darüber die Bildung von Diacylglycerol und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) induziert (Garcia, 1993; Lum, 1994; Ehringer, 2000; Bogatcheva, 2002).

Letzteres führt unter anderem zu der Aktivierung verschiedener Proteinkinase C-Isoformen und Tyrosinkinasen sowie einem Anstieg des intrazellulären Kalziums (Garcia (3), 1995; Ehringer, 2000; van Nieuw Amerongen, 2000; Bogatcheva, 2002). Der intrazelluläre Kalziumanstieg induziert eine Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen-2 sowie eine Phosphorylierung der Myosin-Leichtkette (MLC) durch die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK), die MLC liegt somit in ihrer kontraktile Form vor (van Nieuw Amerongen, 2000). Dies hat eine Bündelung der relativ ungeordneten Aktinfilamente der ruhenden Endothelzelle zu den Stressfasern der aktivierten Endothelzelle zur Folge (Garcia (2), 1995; Garcia (3), 1995; Dudek, 2001; Hippenstiel, 2002; Wójciak-Stothard, 2002; Lee, 2003). Dies führt zur Kontraktion der Zellen mit interendothelialer Lückenbildung und konsekutivem Anstieg der endothelialen Permeabilität (Garcia (3), 1995; Ehringer, 2000; van Nieuw Amerongen, 2000; Bogatcheva, 2002).

Aktiviert Proteinkinase C reduziert die Aktivität der Phospholipase C und bewirkt einen Abfall des intrazellulären Kalziums, was die Thrombinwirkung limitiert (Bogatcheva, 2002).

Die aktivierten Tyrosinkinasen scheinen über eine Phosphorylierung von junctionalen Proteinen ebenfalls eine Erhöhung der endothelialen Permeabilität zu bewirken (van Nieuw Amerongen, 2000).

Des Weiteren wird über einen Thrombinrezeptor vermittelten Weg Rho A Kalzium-unabhängig aktiviert (van Nieuw Amerongen, 2000; Bogatcheva, 2002; Setiadi, 2003).

Die Auswirkungen von Thrombin auf die endotheliale Permeabilität sind durch zyklische Nukleotide beeinflussbar (Lum, 1994; Suttorp (1), 1996; van Nieuw Amerongen, 2000; Bogatcheva, 2002; Hippenstiel, 2002).

Auf Grund der ausgeprägten und reproduzierbaren Antwort humaner Endothelzellen auf eine Stimulation mit Thrombin wurde in der vorliegenden Arbeit Thrombin als Positivkontrolle für die Induktion endothelialer Hyperpermeabilität verwendet (Garcia (1), 1995; Suttorp (1), 1996; Bogatcheva, 2002).

1.3.2 Kleine GTP-bindende Proteine

Die kleinen GTP-bindenden Proteine sind wichtige Akteure bei einer Vielzahl von intrazellulären Signalwegen (Takai, 2001). Rho-Proteine (Ras homologous proteins) gehören zur Rho-Superfamilie der kleinen GTP-bindenden Proteine, diese enthält neben Rho noch weitere Subfamilien (zum Beispiel Cdc42 und Rac; Ridley, 2001; Takai, 2001). Rho-Proteine haben spezifische Funktionen bei der Regulation des Zytoskeletts (Hippenstiel, 1997; Carbajal, 2000; Takai, 2001; Bogatcheva, 2002; Wójciak-Stothard, 2002; Lee, 2003; Sun, 2006), sie sind an der Bildung von Zell-Kontakten und Stressfasern beteiligt (Ridley, 1992; Hill, 1995; Takai, 2001; Bogatcheva, 2002; Lee, 2003).

Dies geschieht zum Beispiel auf folgendem exemplarisch dargestellten Weg: aktiviertes RhoA bindet an Rho-Kinase (ROK), welche daraufhin die Myosin-Leichtketten-Phosphatase phosphoryliert und damit inaktiviert (Carbajal, 2000; van Nieuw Amerongen, 2000; Takai, 2001; Bogatcheva, 2002; Hippenstiel, 2002; Lee, 2003; Sun, 2006). Die MLC kann nun von der MLCK wie auch von ROK phosphoryliert werden (Amano, 1996; Carbajal, 2000; van Nieuw Amerongen, 2000; Ridley, 2001; Takai, 2001; Bogatcheva, 2002; Hippenstiel, 2002).

Des Weiteren lokalisiert aktiviertes Rho die Phosphatidylinositol 4-phosphat 5-Kinase (PIP5K) an die Zellmembran und aktiviert sie, hierdurch wird eine lokalisierte Produktion von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) und darüber die Ausbildung von Stressfasern sowie die Aneinanderlagerung von Zell-Kontakten initiiert (Dudek, 2001; Takai, 2001; Lee, 2003).

Aktiviertes Rho induziert außerdem eine Translokation von P-Selektin zur Zelloberfläche (Setiadi, 2003). P-Selektin ist ein transmembranäres Protein, seine Translokation in die Zellwand induziert eine vermehrte Leukozytenmigration (Sugama, 2002; Setiadi, 2003).

Die Funktionen von Rho-Proteinen hinsichtlich des Aktinzytoskeletts sind sehr komplex, es werden eine Vielzahl von weiteren Effektoren beschrieben (Hippenstiel, 1997; Takai, 2001; van Nieuw Amerongen, 2002).

1.4 Endotheliale Permeabilität

Die im Rahmen vieler Erkrankungen auftretende spezifische oder unspezifische Entzündungsreaktion bewirkt endotheliales Barriereversagen mit konsekutiver Ödembildung und Dysfunktion (Tumor und functio laesa; van Nieuw Amerongen, 2002; Yuan, 2002; Farand, 2006; Czabanka, 2007).

Ursache für die erhöhte Permeabilität sind Veränderungen des Zytoskeletts sowie der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte (Shasby, 1982; Schnittler, 1990; Suttorp (2), 1996; Dudek, 2001; Minshall, 2006; Mehta, 2006). Dieser Prozess findet bei Entzündungen hauptsächlich im Bereich der postkapillären Venulen des jeweiligen Organsystems statt (McDonald, 1999; van Nieuw Amerongen, 2002).

Prinzipiell lassen sich zwei Wege des Flüssigkeits- und Stoffaustausches über die Endothelbarriere unterscheiden, der transzelluläre und der parazelluläre Weg (Minshall, 2006).

1.4.1 Transzelluläre endotheliale Permeabilität

Der transzelluläre Transport von Molekülen kann aktiv, erleichtert oder passiv erfolgen. Er ist bei größeren und/oder hydrophilen Molekülen an das Vorhandensein spezifischer Transportproteine oder Rezeptoren gekoppelt (Stevens, 2000; Minshall, 2002; Minshall, 2006). Diese Moleküle werden entweder mit Hilfe bestimmter Transporter über die Membranen gebracht und sind im Zytosol frei gelöst, oder sie werden in Vesikeln durch die Zelle geschleust (Dvorak, 1996; Stevens, 2000; Minshall, 2002; van Nieuw Amerongen, 2002; Minshall, 2006). Diese rezeptorvermittelten Transportmechanismen können durch spezifische Substanzen wie Hormone, Stoffwechselprodukte oder Medikamente für unterschiedliche Moleküle einzeln blockiert oder aktiviert werden und sind hochspezifisch (Mehta, 2006). Die transzelluläre Permeabilität beinhaltet eine Richtungsweisung durch das Zytoskelett, sie ist durch Veränderungen des Zytoskeletts beeinflussbar (Minshall, 2002; Minshall, 2006). Kleinere sowie lipophile Moleküle und Wasser können frei durch die Zellmembran entlang entsprechender Gradienten diffundieren (Michel, 1999; van Nieuw Amerongen, 2002). Als Beispiel für ein die transzelluläre Permeabilität erhöhendes Agens ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) zu nennen (Hippenstiel, 1998; Michel, 1999; Chen, 2002; van Nieuw Amerongen, 2002). VEGF, auch unter dem Namen vaskulärer Permeabilitätsfaktor bekannt, bewirkt eine Aktivierung der Endothelzellen mit erhöhter

Expression von P-Selektin sowie der vermehrten Bildung von IP₃ und konsekutiver Hyperpermeabilität (Hippenstiel, 1998; Feng, 1999).

1.4.2 Parazelluläre endotheliale Permeabilität

Parazelluläre Permeabilität erfolgt durch interzelluläre Poren unterschiedlicher und variabler Größe entlang von Druck- oder Konzentrationsgradienten (Minshall, 2006). Der Fluss ist abhängig von Größe, Form, Ladung und Bindungskapazitäten des jeweiligen Moleküls und stellt den typischen Weg erhöhter Permeabilität bei Entzündungsgeschehen dar (van Nieuw Amerongen, 2002; Minshall, 2006; Mehta, 2006).

Die parazelluläre Durchlässigkeit des Endothels ist vom Zustand der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte, also von den „Lücken“ im Gewebe, abhängig (Schnittler, 1990; Suttorp (2), 1996; McDonald, 1999; Stevens, 2000; Mehta, 2006). Veränderungen der parazellulären Permeabilität sind meist mit Alterationen des endothelialen Zytoskeletts vergesellschaftet (Schnittler, 1990; Suttorp (2), 1996; Dudek, 2001; Kanthou, 2006).

Bei Untersuchungen, welche die parazelluläre Permeabilität bei Entzündungen betreffen, erscheint es sinnvoll, Veränderungen des Zytoskeletts zu betrachten (Schnittler, 1990; Stevens, 2000).

1.4.3 Zelluläre Vorgänge im Rahmen veränderter parazellulärer Permeabilität

Der Zustand des Aktinzytoskeletts hat einen unmittelbaren Einfluss auf die Zellkontakte, die Form der Zelle und folglich auch auf die Integrität des Zellverbandes (Bussolino, 1987; Lin, 1992; Dudek, 2001; Shin, 2003; Lee, 2004). Eine Kontraktion der Zellfilamente Aktin und Myosin beziehungsweise eine entsprechende Neuordnung dieser Filamente bewirkt eine Verkleinerung der Zelloberfläche und konsekutiv eine Zunahme interzellulärer Poren und damit der Durchlässigkeit der endothelialen Barriere (Schnittler, 1990; Ehringer, 1996; Suttorp (2), 1996; Ikeda, 1999; Stevens, 2000; Dudek, 2001). Auch ein Wegfall der Zell-Kontakte erhöht die parazelluläre Permeabilität (Lampugnani, 1995; Stevens, 2000; Lee, 2003; Broman, 2006). Verschiedene Modelle versuchen den Zusammenhang zwischen den morphologischen Veränderungen der einzelnen Zelle und ihrer Kontakte und Veränderungen der Permeabilität des Zellverbands zu beschreiben. Im Folgenden wird auf zwei unterschiedliche Erklärungsansätze eingegangen:

Das Tensegrity Modell

Das von Ingber vorgestellte Tensegrity (tensional integrity) Modell beschreibt den Zusammenhang zwischen dem Zustand des Zytoskeletts einer Zelle und der Zellform und -funktion sowie die Möglichkeit eines mechanochemischen Signalweges über das Zytoskelett (Ingber, 1997). Es wird ein zusammenhängendes Aktinfilamentnetz postuliert, welches über weitere Strukturproteine direkt mit umliegenden Zellen sowie der extrazellulären Matrix auf der einen Seite und mit intrazellulären Organellen und dem Zellkern auf der anderen Seite verbunden ist (Ingber, 1993; Lee, 2003). Auf Grund seiner Kontraktilität erzeugt es eine zentripetal gerichtete Spannung (Dudek, 2001). Die mit dem Filamentnetz verbundenen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte bilden durch ihren festen Kontakt mit umliegenden Zellen oder der Matrix die Gegenkraft. Mikrotubuli bilden dabei möglicherweise ebenfalls eine stabilisierende Gegenkraft zu den kontraktilen Mikrofilamenten (Ingber, 1993; Ingber, 1997). In diesem Modell bestimmen das Spiel und Gegenspiel dieser gegeneinander gerichteten Kräfte die Form der Zelle (Stevens, 2000; Lum, 2001; Lee, 2003). Die Größe der interzellulären Lücken ist abhängig von der zytoskelettalen Spannung, von Lokalisation und Aktivitätszustand der junctionalen Proteine sowie von den Verbindungen zwischen ihnen und dem Zytoskelett (Stevens, 2000; Alexander, 2002). Eine aktive Kontraktion des Zytoskeletts geht mit einer Zunahme der zentripetal gerichteten Kraft einher, dies hat konsekutiv eine Zunahme von interzellulärer Porenanzahl und -größe und somit der Permeabilität zur Folge (Ingber, 1993; Ingber, 1997; Stevens, 2000). Umgekehrt führt auch eine Abnahme der stabilisierenden Gegenkraft durch Wegfall oder Umorganisation der junctionalen Proteine oder der Mikrotubuli zu einem Ungleichgewicht der Kräfte mit daraus resultierender Zellkontraktion und Permeabilitätszunahme (Ingber, 1997). Eine Nettopolymerisation von Mikrotubuli oder Mikrofilamenten oder deren Umverteilung ist demnach nicht notwendig, um den Funktionszustand des Endothels in Bezug auf seine Durchlässigkeit zu verändern (Ingber, 1997).

Integritätsverlust der endothelialen Barriere durch Neuordnung von Strukturproteinen

Untersuchungen an Endothelzellen zeigten, dass nach entsprechender Stimulation eine Reorganisation der Mikrofilamente mit Zunahme der Stressfasern und Abnahme des DPB erfolgt (Lum, 1994; Lum, 2001). Das DPB hat unter anderem die Funktion, Proteine der Adherens Junctions zusammen zu lagern und an der lateralen

Zellmembran zu lokalisieren. Bei einem Verlust dieses peripheren Aktinbandes und damit der Adherens Junctions verliert der Zellverband seine Integrität, die Permeabilität nimmt zu (Lampugnani, 1995; Stevens, 2000; Lum, 2001; Lee, 2003; Broman, 2006). Auf der anderen Seite bewirken Aktin-stabilisierende Substanzen, wie zum Beispiel Phalloidin, den Erhalt des DPB und anderer Aktinfilamente und vermindern hierdurch eine Zunahme der Permeabilität nach entsprechender Stimulation (Schnittler, 1990; Alexander, 2002).

Die unterschiedlichen Erklärungsmodelle müssen sich letztlich nicht gegenseitig ausschließen, sondern stellen verschiedene, sich überlappende Wege dar, auf denen das Zytoskelett und somit der Funktionszustand der endothelialen Barriere variiert werden kann (Stevens, 2000).

1.5 Zyklische Nukleotide

Zyklische Nukleotide [zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP)] sind als sekundäre Botenstoffe Bestandteil einer Vielzahl von Signalwegen. Sie sind an der Regulation von Stoffwechsel, Kontraktilität, Mobilität und an der Transkription von Genen in verschiedenen Zelltypen beteiligt (Smirnov, 1989; Omori, 2001). Sie beeinflussen unter anderem die Aktivität von Proteinkinasen, Phosphodiesterasen und Ionenkanälen (Francis, 1999; Francis, 2001; Omori, 2007). Sie nehmen Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration und spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation der endothelialen Permeabilität (van Nieuw Amerongen, 2002; Yuan, 2002; Minshall, 2006).

Ein Abfall von intrazellulärem cAMP, zum Beispiel durch die Thrombin-vermittelte Inaktivierung der Adenylzyklase, führt zu einem Integritätsverlust des Endothels (Brodie, 1972; Aktories, 1984; Bogatcheva, 2002). Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass erhöhte cAMP-Konzentrationen die entzündungsbedingte, zum Beispiel Thrombin-induzierte, Permeabilitätszunahme reduziert (Suttorp, 1993; Suttorp (1), 1996; Bogatcheva, 2002; Hippenstiel, 2002; van Nieuw Amerongen, 2002).

Die Wirkung von cGMP in Bezug auf die Permeabilität wird kontrovers diskutiert (Surapisitchat, 2007). Sie scheint abhängig vom jeweiligen Gefäßabschnitt sowie dem Funktionszustand des Endothels zu sein (Cooper, 1987; Zimmerman, 1990). Des Weiteren scheint die Höhe des zytosolischen cGMP-Spiegels bezüglich seiner Wirkung auf die endotheliale Permeabilität eine Rolle zu spielen (Surapisitchat, 2007).

1.5.1 Regulation der zyklischen Nukleotide

Die zyklischen Nukleotide werden von den Enzymen Adenylylzyklase und Guanylylzyklase aus Adenosintriphosphat (ATP) und Guanosintriphosphat (GTP) gebildet (Bentley, 1992; Baker, 2004). Sie aktivieren im nächsten Schritt unter anderem die cAMP- beziehungsweise cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKA und PKG; Francis, 1999). Phosphodiesterasen limitieren die Wirkung der zyklischen Nukleotide durch deren Abbau (Bentley, 1992; Lucas, 2000).

1.5.1.1 Adenylylzyklase und Guanylylzyklase

Die Zyklasen existieren in mehreren Isoformen, welche spezifische Verteilungsmuster in den verschiedenen Geweben wie auch in einzelnen Zellen aufweisen (Lucas, 2000; Hanoune, 2001). Es werden derzeit neun Isoformen der Adenylylzyklase (Hanoune, 2001) und elf Isoformen der Guanylylzyklase (Kobińska, 2000; Lucas, 2000) beschrieben. Die Adenylylzyklase ist membrangebunden, die Guanylylzyklase tritt als membrangebundenes und zytosolisches Enzym auf (Kobińska, 2000; Lucas, 2000; Pyriochou, 2005). Sie sind jeweils Bestandteil bestimmter Signalwege und werden auf unterschiedliche Art und Weise, wie zum Beispiel durch Phosphorylierung, aktiviert (Lucas, 2000; Hanoune, 2001; Pyriochou, 2005).

1.5.1.2 Phosphodiesterasen

In Säugetieren werden gegenwärtig Phosphodiesterasen (PDE) in elf Isoenzymfamilien unterschieden (Matsumoto, 2003; Maurice, 2003; Bender 2006), diese enthalten mehr als 50 verschiedene Isoenzyme (Bender, 2006; Lugnier, 2006). Phosphodiesterasen beenden die Wirkung zyklischer Nukleotide durch Spaltung ihrer 3'-Phosphodiesterbindung, dies führt zur Bildung des entsprechenden 5'-Monophosphats (Francis, 2001; Bender, 2006; Lugnier, 2006). In Endothelzellen lässt sich die Aktivität der Isoenzyme PDE2, PDE3 und PDE4 nachweisen (Suttorp, 1993; Suttorp (1), 1996; Suttorp (2), 1996; Bender, 2006). In geringeren Mengen finden sich auch die PDE1 und PDE7 (Bender, 2006). Die PDE2 ist dabei hauptsächliches Metabolisationsenzym von cGMP (Suttorp (2), 1996), die PDE3 trägt zu dessen Abbau wenig, die PDE4 gar nichts bei (Suttorp (2), 1996; Bender, 2006). Im Gegensatz dazu wird cAMP hauptsächlich zu etwa gleichen Teilen durch die PDE3 und PDE4 verstoffwechselt (Suttorp, 1993; Seybold, 2005; Suttorp (2), 1996; Lugnier, 2006).

1.5.2 Wirkungsweise der zyklischen Nukleotide

Schlüsselenzyme der cAMP- und cGMP-vermittelten intrazellulären Wirkung stellen die cAMP- beziehungsweise cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKA und PKG) dar (Lucas, 2000). Durch direkte Bindung von cAMP beziehungsweise cGMP an die jeweiligen Proteinkinasen werden diese aktiviert (Lucas, 2000). Weitere Zielproteine der zyklischen Nukleotide stellen zum Beispiel Ionen-Kanäle oder sogenannte EPACs dar (Lucas, 2000). Letztere sind GTPase-Austausch-Proteine, welche wiederum nachgeschaltete Proteine (zum Beispiel die kleinen G-Proteine Rap1a und Rap1b) PKA-unabhängig aktivieren (de Rooij, 2000; Kawasaki, 1998; Houslay, 2000).

PKA und PKG

Die Proteinkinasen A und G werden in jeweils zwei Subtypen (I und II) unterteilt, diese enthalten mehrere Isoformen. Jedes Enzym besteht aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten, welche zusammen ein Tetramär bilden (Essayan, 2001). Durch Anlagerung von vier zyklischen Nukleotiden geben die regulatorischen Untereinheiten die katalytischen frei und überführen das Enzym in seinen aktivierten Zustand (Essayan, 2001). Die Proteinkinasen A und G vermitteln durch Phosphorylierung nachgeschalteter Proteine unterschiedlichste zelluläre Signale (Francis, 1999). Beide Kinasen fungieren dabei als Serin/Threonin-Kinase. Zielproteine der Proteinkinasen sind zum Beispiel Transkriptionsfaktoren, Ionen-Kanäle oder Signalproteine, die Adenylyl- und Guanylylzyklase sowie verschiedene PDEs (Francis, 1999). Ein weiteres etabliertes Zielprotein der beiden Proteinkinasen ist das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP; Halbrügge, 1990; Butt, 1994; Bachmann, 1999).

Beide Enzyme wurden als Stabilisatoren der Endothelbarriere beschrieben. So führte eine Blockade der PKA in verschiedenen Zelltypen zu einer Zunahme der Permeabilität (Comerford 2002).

1.6 Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein (VASP)

VASP ist Mitglied der Ena/VASP-Familie, welche außerdem die Proteine Ena (*Drosophila Enabled*), sein Säugetier-Homolog Mena (*Mammalian Ena*), Avena (*Avian Ena*), EVL (*Ena/VASP-like protein*) und das *Caenorhabditis unc-34* Genprodukt enthält (Gertler, 1996; Harbeck, 2000). Mena, EVL und VASP finden sich in verschiedenen Zelltypen bei Vertebraten (Gertler, 1996). Es wird vermutet, dass die Mitglieder dieser Familie eine wichtige Rolle bei der Vermittlung extrazellulärer Signale auf das Zytoskelett spielen, wobei ihnen jeweils spezifische als auch überlappende Funktionen zugeschrieben werden (Gertler, 1996; Aszódi, 1999; Reinhard, 2001; Loureiro, 2002; Kwiatkowski, 2003). Sie sind an verschiedenen Aktin-abhängigen Prozessen, wie Axon-guidance, Verschluss der Neuralröhre, Beeinflussung der Plättchenaggregation, T-Zell Aktivierung, Phagozytose, der Ausbildung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten sowie der intrazellulären Fortbewegung von *Listeria monocytogenes* beteiligt (Gertler, 1996; Harbeck, 2000; Kwiatkowski, 2003).

1.6.1 Struktur von Vasodilator-stimuliertem Phosphoprotein

Gemeinsam ist den Proteinen der Ena/VASP-Familie ihre konservierte Struktur, welche die folgenden drei Domänen enthält:

1. die N-terminale Ena-VASP-Homologie-1 (EVH1),
2. die zentrale Prolinreiche Domäne und
3. die C-terminale Ena-VASP-Homologie-2 (EVH2; Gertler, 1996).

Humanes VASP besteht aus 380 Aminosäuren (AS), die sich folgendermaßen auf die einzelnen Domänen aufteilen:

EVH1: AS 1-113
 Zentrum: AS 114-225
 EVH2: AS 226-380

und hat ein angenommenes Molekulargewicht von 46 kDa (Hüttelmaier, 1998; Harbeck, 2000; Price, 2000).

1.6.1.1 Die EVH1-Domäne

Die EVH1-Domäne ist der am höchsten konservierte Bereich innerhalb der Ena/VASP-Familie (Gertler, 1996). Sie vermittelt eine Anreicherung von VASP an Zellkontakte sowie Bereiche erhöhter Membranaktivität. Dabei bindet VASP an Proteine der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte, welche über eine EVH1-Bindungsstelle verfügen, zum

Beispiel Zyxin und Vinculin (Brindle, 1996; Gertler, 1996; Reinhard (1), 1995; Reinhard, 1996; Niebuhr, 1997; Harbeck, 2000). VASP bindet innerhalb dieser Proteine an kurze Sequenzen, welche aus einem Phenylalanin gefolgt von vier oder fünf Prolin bestehen (sogenannte FP₄-Motive; Brindle, 1996; Gertler, 1996; Niebuhr, 1997) und welche von sauren Aminosäuren flankiert werden (Harbeck, 2000; Price, 2000).

Weitere Proteine, welche über eine EVH1-Bindungsstelle verfügen, sind FYB/SLAP (Fyn-binding protein/SLP76-associated protein; Bestandteil immunologischer Synapsen in T-Zellen und beteiligt an der Phagozytose von Makrophagen), LPP, Ankyrin G und FAT (unbekannte physiologische Relevanz) sowie das Bakterienprotein ActA der Listerien (Reinhard, 2001).

Die EVH1-Domäne scheint für die örtliche Verteilung von VASP innerhalb der Zelle verantwortlich zu sein.

1.6.1.2 Das prolinhaltige Zentrum

Das prolinhaltige Zentrum ist die am wenigsten konservierte Untereinheit innerhalb dieser Proteinfamilie. Es enthält vier Wiederholungen eines GP₅-Motivs (Reinhard (2), 1995; Comerford, 2002). Diese GP₅-Bindungsstellen binden sowohl die Proteine Profilin I und II als auch das Protein Chickadee (Reinhard (2), 1995; Harbeck, 2000). Profilin hat als Bindungspartner von G-Aktin eine zentrale Rolle bei der Aktinpolymerisation. Des Weiteren finden sich hier Bindungsstellen für weitere Proteinbestandteile wie zum Beispiel die Src-homology 3, WW-Domänen, Abl und D-Abl (Reinhard, 2001; Reinhard (2), 1995; Gertler, 1996; Kwiatkowski, 2003).

Das zwischen der EVH1- und EVH2-Domäne gelegene prolinhaltige Zentrum scheint die Aktinpolymerisation initiieren und beschleunigen zu können (Sun, 1995; Price, 2000).

1.6.1.3 Die EVH2-Domäne

Die EVH2-Domäne enthält drei hoch konservierte Regionen: die F-Aktin bindende Region (FAB), die Coiled-coil-Region (COCO-Region) und das thymosin-β₄-like motif (TLM; Kwiatkowski, 2003). Die EVH2-Domäne scheint die Nukleation von F-Aktin, die Bindung von VASP an F-Aktin sowie die Verlängerung und Bündelung von F-Aktin zu vermitteln (Bachmann, 1999; Hüttelmaier, 1999; Harbeck, 2000; Lambrechts, 2000; Price, 2000; Walders-Harbeck, 2002; Kwiatkowski, 2003).

Die FAB bindet filamentäres Aktin, ist für die Nukleation von Aktin notwendig und vermittelt die anti-capping-Aktivität von VASP (Krause, 2002; Walders-Harbeck, 2002; Kwiatkowski, 2003). Sie scheint außerdem für die Konzentration von VASP an den Lamellopodien spitzen zuständig und für die Motilität der Gesamtzelle notwendig zu sein (Loureiro, 2002).

Durch die COCO-Region der EVH2-Domäne wird die Oligomerisation des Proteins vermittelt (Bachmann, 1999; Walders-Harbeck, 2002; Kwiatkowski, 2003). Das VASP Tetramär ist, verglichen mit seinem Monomer oder Dimer, in der Lage, F-Aktin Stränge untereinander zu verbinden und eine verstärkte Bindung an F-Aktin und G-Aktin auszubilden (Walders-Harbeck, 2002). Diese ist, verglichen mit der Bindung zwischen einem VASP-Monomer und F-Aktin, weniger salz- und temperaturabhängig (Bachmann, 1999; Hüttelmaier, 1999). Auch scheint die VASP-Oligomerisation für die Aktinnukleation notwendig zu sein (Bachmann, 1999; Walders-Harbeck, 2002; Kwiatkowski, 2003)

Das TLM ist eine 14 AS lange basische Sequenz, welche G-Aktin binden kann und auch in vielen anderen G-Aktin bindenden Proteinen enthalten ist (Gertler, 1996; van Troys, 1996; Walders-Harbeck, 2002; Kwiatkowski, 2003). β -Thymosin bindet G-Aktin und stellt es, zumindest *in vitro*, schnell zur Polymerisation zu Verfügung. Es kann angenommen werden, dass diese Sequenz innerhalb von VASP die Wirkung des zentral gebundenen Profilins und damit seine eigene Funktion verstärkt (Sun, 1995). Das TLM scheint für die katalytische Funktion von VASP bei der Aktin-Polymerisation essentiell (Sun, 1995; Walders-Harbeck, 2002; Kwiatkowski, 2003).

In keinem anderen bekannten Protein außerhalb der Ena/VASP-Familie ist eine der EVH2-Domäne ähnliche Struktur vorhanden (Bachmann, 1999).

1.6.2 Vorkommen

VASP ist ein im Zytoplasma verschiedener humaner Zellen vorkommendes Protein. Man findet es in Endothelzellen, aber auch in glatten Muskelzellen, Lymphozyten, Leukozyten, Fibroblasten und Epithelzellen. Erstmals wurde es in Thrombozyten als unmittelbares Substrat der Proteinkinasen A und G beschrieben (Halbrügge, 1990). Eine Phosphorylierung von VASP verhinderte eine Bindung von Fibrinogen an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und hatte eine Aggregationshemmung der Thrombozyten zur Folge (Halbrügge, 1990; Walter, 1993).

In kontraktile Zellen wie Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten ist VASP an der Regulation des Aktinzytoskeletts beteiligt (Aszódi, 1999; Smolenski, 2000). VASP reichert sich an Komplexen der Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Kontakte, an Stressfasern und in Gebieten hoher Membranaktivität, wie zum Beispiel Lamellopodien- und Filopodienspitzen, an (Price, 2000). Innerhalb der Stressfasern bindet VASP an die Strukturproteine α -Aktinin und Zyxin, von denen angenommen wird, dass sie die Plus-Enden von Aktinfilamenten einbetten (Reinhard, 2001). Des Weiteren bildet VASP eine direkte elektrostatische Interaktion mit Aktinfilamenten aus (Bachmann, 1999; Harbeck, 2000).

1.6.3 Regulation

Humanes VASP besitzt Phosphorylierungsstellen an Serin¹⁵⁷, Serin²³⁹ und Threonin²⁷⁸ (Butt, 1994; Smolenski, 1998). Serin¹⁵⁷ befindet sich innerhalb des prolinreichen Zentrums von VASP, Serin²³⁹ und Threonin²⁷⁸ innerhalb der EVH-2 Domäne (Butt, 1994; Smolenski, 1998; Harbeck, 2000). VASP ist ein direktes Substrat der cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKA und PKG; Halbrügge, 1990; Butt, 1994; Bachmann, 1999), eine Blockade der PKA beziehungsweise PKG verhindert die Phosphorylierung von VASP an den entsprechenden Aminosäuren (Comerford, 2002). Die Proteinkinasen sind in der Lage, jeweils alle drei genannten Aminosäuren zu phosphorylieren. Dies geschieht mit unterschiedlicher Präferenz, wobei Serin¹⁵⁷ von der PKA bevorzugt phosphoryliert wird. Serin²³⁹ wird etwas geringer und Threonin²⁷⁸ nur schwach von der PKA phosphoryliert (Harbeck, 2000). Serin²³⁹ ist eine der am besten charakterisierten PKG-abhängigen Phosphorylierungsstellen (Smolenski, 1998; Harbeck, 2000). Serin¹⁵⁷ wird mit schwächerer Kinetik und Threonin²⁷⁸ kaum von der PKG umgesetzt. Threonin²⁷⁸ wird von beiden Proteinkinasen mit wenig Effizienz phosphoryliert (Butt, 1994; Harbeck, 2000; Schäfer, 2003).

Abbildung 1:

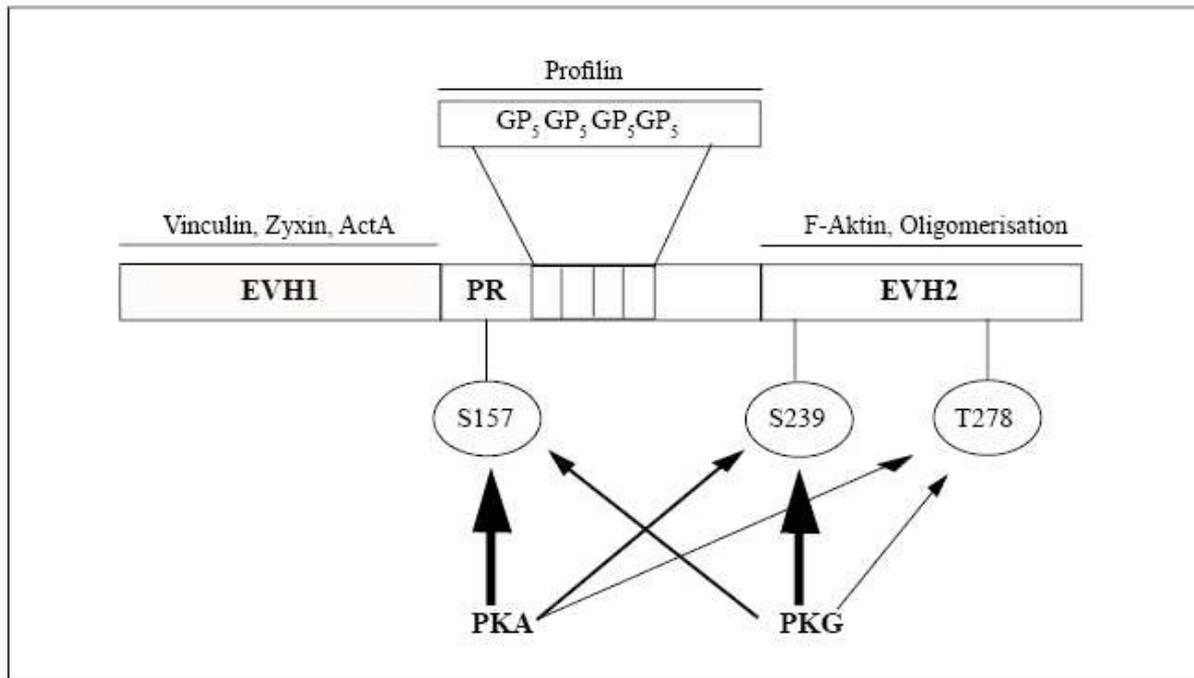


Abb. 1: Die Proteinkinasen A und G phosphorylieren die Phosphorylierungsstellen von VASP mit unterschiedlicher Präferenz. Die Dicke der Pfeile stellt schematisch die Affinität der Kinasen zu den jeweiligen Phosphorylierungsstellen dar. Oberhalb der Domänen sind Beispiele der jeweiligen Bindungspartner angegeben. PKA=Proteinkinase A; PKG=Proteinkinase G; EVH1=Ena-VASP-Homologie1; PR=Prolinreiche Region; EVH2=Ena-VASP-Homologie2; S=Serin; T=Threonin. Die Abbildung ist modifiziert aus Harbeck, 2000 entliehen.

Die Dephosphorylierung erfolgt schnell nach Absinken der intrazellulären cAMP- und cGMP-Konzentrationen auf Basalwerte und wird durch die Serin/Threonin-Phosphatasen 1 und 2 vermittelt (Halbrügge, 1989; Smolenski, 1998; Harbeck, 2000).

Die Phosphorylierung von VASP zeigte sich bei einigen Autoren ohne Auswirkung auf seine Bindung an die Liganden Profilin, Zyxin oder Vinculin *in vitro* (Harbeck, 2000; Loureiro, 2002; Kwiatkowski, 2003) und scheint dadurch keinen Einfluss auf die Verteilung von VASP innerhalb der Zelle zu haben (Harbeck, 2000; Loureiro, 2002; Kwiatkowski, 2003). Auch scheinen die Oligomerisationseigenschaften von VASP durch seine Phosphorylierung nicht beeinflusst (Harbeck, 2000).

Auf der anderen Seite zeigten Versuche mit humanen Endothelzellen, dass eine PKG-vermittelte VASP-Phosphorylierung eine Abwanderung von VASP von Focal Adhesions, aber nicht von Adherens Junctions bewirkte (Smolenski, 2000).

Eine VASP-Phosphorylierung hatte dagegen seine verminderte Bindung an F-Aktin, G-Aktin und eine reduzierte Aktinnukleation zur Folge (Harbeck, 2000; Lambrechts, 2000; Walders-Harbeck, 2002; Kwiatkowski, 2003).

1.6.4 Funktion

Es konnte ein unmittelbarer Einfluss von VASP auf das Zytoskelett nachgewiesen werden, die genauen Mechanismen sind Gegenstand der Forschung.

In Endothelzellen scheint VASP an den Vorgängen der zellulären Reorganisation während der Angiogenese, Migration und Kontraktion sowie der damit verbundenen Veränderung der Permeabilität regulatorisch beteiligt zu sein (Price, 2000; Trichet, 2008).

Es wird angenommen, dass VASP eine Aktinpolymerisation an Orten wie den Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten reguliert (Trichet, 2008). Dabei stellt es globuläres Aktin über seine Bindungsstellen für G-Aktin direkt (EVH2-Domäne) oder indirekt über seine Bindungsstelle für Profilin (zentrale Domäne) selbst bereit (Harbeck, 2000; Kwiatkowski, 2003). Des Weiteren fungiert es als anti-capping-Protein für F-Aktin (Krause, 2002; Kwiatkowski, 2003). Möglicherweise wird die Aktinpolymerisation über eine Phosphorylierung von VASP reguliert (Harbeck, 2000).

Ob VASP neben der Beeinflussung des Zytoskeletts und den damit zusammenhängenden Vorgängen noch weitere Funktionen innerhalb der Zelle ausübt, ist bislang nicht bekannt.

1.7 Klinische Relevanz

Eine Entzündungsreaktion ist charakteristisch für eine Vielzahl von akuten und chronischen Erkrankungen. Das im Rahmen einer Entzündung entstehende Gewebeödem ist Folge einer reduzierten Barrierefunktion des Endothels, es geht mit einem Abfall der Druck- und Konzentrationsgradienten einher (Alexander, 2002; Hippenstiel, 2002; van Nieuw Amerongen, 2002; Temmesfeld-Wollbrück, 2007). Ist der Flüssigkeitsverlust aus den Gefäßen beziehungsweise das Ödem des umliegenden Gewebes sehr groß, so kann es zum Funktionsverlust bis hin zum Organversagen kommen (van Nieuw Amerongen, 2000; Farand, 2006; Czabanka, 2007). Ein Beispiel hierfür ist das akute Lungenversagen, auch Schocklunge genannt („Adult Respiratory Distress Syndrome“, ARDS). Bei der Schocklunge kommt es durch die entzündungsbedingte Einschränkung der Barrierefunktion des Endothels zu einem Austritt von Flüssigkeit aus dem Intravasalraum in das Lungengewebe und den Alveolarraum. Die Folge ist ein gestörter Gasaustausch mit Lungenversagen, welches zu Hypoxämie mit Multiorganversagen und bis zum Tod des Patienten führen kann (van Nieuw Amerongen, 2000; Hippenstiel, 2002; Farand, 2006).

Eine Verbesserung der Barrierefunktion durch selektiv am Lungenendothel ansetzende Medikamente wäre hier von großem klinischem Nutzen.

Therapieansätze mit dem Ziel der organspezifischen Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion haben demnach größte klinische Relevanz (Hippenstiel, 2002; van Nieuw Amerongen, 2002). Hierfür bildet die Erforschung der molekularen Grundlagen der Endothelbarriere und ihrer Funktionsveränderungen die rationale Basis.

Substanzen unterschiedlichster Herkunft und Stoffklassen stören die endotheliale Integrität und erhöhen damit die Durchlässigkeit dieser Grenzschicht (Hippenstiel, 2002; van Nieuw Amerongen, 2002; Temmesfeld-Wollbrück, 2007). Es finden sich jedoch auch eine erhebliche Anzahl von Substanzen, welche einen gegenteiligen, stabilisierenden Effekt auf den Endothelzellverband ausüben. Forschungsteams konzentrieren sich zum Beispiel auf Sphingosin 1-phosphat, Adrenomedullin und Angiopoetin1 (Hippenstiel, 2002; Temmesfeld-Wollbrück, 2007). Als besonders wirksam erwiesen sich aber vor allem auch die zyklischen Nukleotide (Suttorp, 1993; Suttorp (1), 1996; Bogatcheva, 2002; Hippenstiel, 2002; van Nieuw Amerongen, 2002).

1.8. Fragestellung

In der Literatur wird eine Abhängigkeit der endothelialen Permeabilität von zyklischen Nukleotiden sowie der Phosphorylierung von VASP postuliert. Ein Zusammenhang zwischen erhöhter intrazellulärer cAMP- und cGMP-Spiegel und verbesserter Barrierefunktion wird in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Modellen inklusive humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen beobachtet. Die PKA- beziehungsweise PKG-abhängige Phosphorylierung von VASP wurde in verschiedenen humanen und tierischen Zellen als möglicher Faktor hinsichtlich einer Alteration des Zytoskeletts beschrieben.

In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob erhöhte cAMP- und cGMP-Spiegel die Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität eines Monolayers humaner Endothelzellen reduzieren können. Außerdem sollten die bei solcher Stimulation auftretenden Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts analysiert und auf molekularer Ebene ein Zusammenhang zwischen diesen funktionellen und morphologischen Veränderungen und der Phosphorylierung von VASP an Serin¹⁵⁷ nachgewiesen werden.

Folgende Fragestellungen werden bearbeitet:

1. Lässt sich der Einfluss zyklischer Nukleotide auf eine Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität in humanen Endothelzellen bestätigen?
2. Gibt es für eventuelle, durch zyklische Nukleotide verursachte Veränderungen hinsichtlich Thrombin-induzierter Hyperpermeabilität ein morphologisches Korrelat im Zytoskelett dieser Zellen?
3. Wird Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein auch in humanen Endothelzellen cAMP- und cGMP-abhängig phosphoryliert?
4. Besteht in humanen Endothelzellen ein Zusammenhang zwischen den Veränderungen der Zellform und -funktion und der Phosphorylierung von VASP an Serin¹⁵⁷ nach Stimulation mit cAMP- und cGMP-erhöhenden Substanzen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

Im Folgenden sind die für diese Arbeit verwendeten Materialien und deren Hersteller aufgelistet.

2.1.1 Chemikalien

| | |
|---------------------------------|------------------------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid | Serva |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Serva |
| Amphotericin B | Boehringer |
| Antipain | Sigma |
| Bradfordreagenz | BioRad |
| 8br-cAMP | Sigma |
| 8br-cGMP | Sigma |
| Bromphenolblau | Pharmacia-Biotech |
| Calciumchlorid-Hexahydrat | Merck |
| Coomassie Brilliant Blue® | Imperial Chemical Industries |
| Essigsäure 100 % | Merck |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Roth |
| Epidermal Growth Factor (EGF) | Gibco |
| Fetales Kälberserum (FCS) | Gibco |
| Forskolin | Merck |
| Gelatine (aus Schweinehaut) | Sigma |
| Glycerin | Merck |
| Hepes | Roth |
| Kaliumchlorid | Merck |
| Kaliumhydrogenphosphat | Merck |
| Leupeptin | Sigma |
| L-Glutamin | Gibco |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat | Merck |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat | Merck |
| MCDB 131 | Gibco |
| Medium 199 | Gibco |
| β-Mercaptoethanol | Serva |

| | |
|--|---------------|
| Motapizon | Rhône-Poulenc |
| Natriumcitrat | Sigma |
| Natriumchlorid | Roth |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Serva |
| Natriumhydrogencarbonat | Merck |
| Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat | Merck |
| Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat | Merck |
| Natriumhydroxid | Merck |
| Natrium-Nitroprussid | Sigma |
| Natriumsulfat | Sigma |
| NP-40 | Sigma |
| Odyssey-Puffer | Licor-Inc. |
| Paraformaldehyd (PFA) | Merck |
| Penicillin/Streptomycin | Biochrom AG |
| Pepstatin A | Sigma |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | Sigma |
| PKA-Inhibitor | Calbiochem |
| PKG-Inhibitor | Calbiochem |
| Ponceau S | Serva |
| RP73401 | Rhône-Poulenc |
| N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED) | Roth |
| Thrombin | Sigma |
| Tris(Hydroxymethyl)aminomethan | Roth |
| Triton X-100 | Serva |
| Trypsin EDTA | Boehringer |
| Tween-20 | Sigma |
| Zardaverin | Byk Gulden |

2.1.2 Kulturmedien

Endothelzellmedium (MCDB 131):

Verwendet als Zellkulturmedium nach Zugabe von:

L-Glutamin (500 µg)

Amphotericin B (0,5 µg)

EGF (5 ng/ml)

Paraformaldehyd (20x): Paraformaldehyd 200 g
 Aqua bidest ad 1000 ml

Unter dem Abzug auf 60°C erhitzen, tropfenweise 1 M NaOH hinzugeben bis die Lösung klar wird, bei Raumtemperatur abkühlen lassen und anschließend bei 4°C aufbewahren.

Paraformaldehyd (0,5 %): Paraformaldehyd (20x) 5 ml
 Aqua bidest ad 1000 ml

PBS-Stammlösung: Na₂HPO₄ 58,5 g
 KH₂PO₄ 9,8 g
 NaCl 320 g
 Aqua bidest ad 1000 ml

PBS: PBS-Stammlösung 50 ml
 Aqua bidest ad 1000 ml
 pH 7,4

Proteinextraktion:

Lysepuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4
 0,25 mM EDTA
 1 mM PMSF
 10 µg/ml Antipain
 10 µg/ml Leupeptin
 10 µg/ml Pepstatin
 1 % (v/v) NP-40

Phosphatase-Inhibitoren: NaF 100 mM
 Na₃VO₄ 2 mM
 Na₄P₂O₇ 15 mM

Western Blot:

Auftragepuffer: 3,8 ml Tridest
1,0 ml Tris-HCl, 0,5 M, pH 6,8
0,8 ml Glycerin
1,6 ml SDS (10 %, w/v)
0,4 ml Bromphenolblau (1 %, w/v)
0,4 ml β -Mercaptoethanol (1%, v/v)

Sammelgel:

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
10 % SDS
40 % Acrylamidlösung, 19:1
Bidest
TEMED
10 % Ammoniumpersulfat

Trenngel :

1,5 M Tris HCl, pH 8,8
10 % SDS
40 % Acrylamidlösung, 19:1
Bidest
TEMED
10 % Ammoniumpersulfat

Die relative Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele richtete sich nach dem molekularen Gewicht des Zielproteins.

Laemmli-Puffer (5x):

15 g Tris-Base
72 g Glycerin
5 g SDS
1000 ml Aqua bidest

Ponceau-S-Proteinfärbelösung: 1 g Ponceau-S

50 ml Essigsäure
950 ml Aqua bidest

| | |
|------------------------------------|--|
| Blotting-Puffer (10x) Stocklösung: | 15 g Tris-Base 72 g Glycerin 500 ml Aqua bidest |
| Blotting-Puffer: | 80 ml Stocklösung 200 ml Methanol 720 ml Aqua bidest |
| Blocking-Puffer: | Odyssey-Puffer: PBS -/-, pH 8,0 1:1 |
| Waschpuffer: | PBS-/- 0,05 % Tween |
| Immunfluoreszenz: | |
| Fixierlösung: | 4 % Paraformaldehyd |
| Permeabilisierungslösung: | 0,1 % Triton X-100 in aqua bidest |
| Absättigungslösung (Stock): | 5 g Venimmun [®] 100 ml Aqua bidest |
| Absättigungslösung: | Stocklösung 1:50 verdünnt mit PBS -/-, pH 7,4 |
| Waschlösung: | PBS -/-, pH 7,4 |

2.1.4 Zubehör

| | |
|----------------------------------|--------------------------|
| Zellkulturflaschen (T80) | Falcon |
| Chamber Slides (8 Kammern) | Falcon |
| Petrischalen (3 cm Durchmesser) | Falcon |
| Petrischalen (10 cm Durchmesser) | Falcon |
| Hybound-ECL-Membranen | Amersham |
| Gel-Blotting-Papier | Whatman |
| Polykarbonatfiltermembranen | Nucleopore oder Minipore |

2.1.5 Spezielle Geräte

| | |
|---|---------|
| Laborwaage | Mettler |
| Mini-Protean-Gel System | BioRad |
| Phasenkontrast Mikroskop mit Fluoreszenzeinheit | Olympus |

| | |
|-------------------------------------|------------|
| Spektralphotometer Uvicon UV 860 | Kontron |
| Sterilbank Laminair HB 2448 | Heraeus |
| Zellkultur-Inkubator BB 6220 | Heraeus |
| Zentrifuge 48RC, Rotanta RPC | Hettich |
| Odyssey (Infrared-Imaging-System ®) | Licor-Inc. |

2.1.6 Antikörper

Westernblot:

| | | |
|----------------------------|------------------------------|--------|
| 1. AK anti-VASP | monoklonal, mouse anti-human | Alexis |
| 2. AK S15 (IRDye-markiert) | monoklonal, goat anti-mouse | Licor |

Immunfluoreszenz:

| | |
|---|------------------|
| Alexa®konjugiertes Phalloidin | Molecular Probes |
| Ak Alexa® Fluor konj. F(ab') ₂ , 488 | Molecular Probes |

2.1.7 Verzeichnis der Firmen:

Amersham Pharmacia, Braunschweig
 B. Braun, Melsungen
 Biochrom AG, Berlin
 BioRad, München
 Boehringer, Mannheim
 BD-Falcon, NJ, USA
 Byk Gulden, Koblenz
 Gibco, Karlsruhe
 Heraeus, Hanau
 Licor-Inc., Homburg
 Merck, Darmstadt
 Nucleopore, Tübingen
 Pharmacia-Biotech, Freiburg
 Roth, Karlsruhe
 Serva, Heidelberg
 Sigma, Deisenhofen

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur humaner Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC)

Die Basis der Versuche bildete die Kultivierung humaner Endothelzellen aus Nabelschnurvenen.

2.2.1.1 Isolierung

Die Isolierung von Endothelzellen aus Nabelschnurvenen erfolgte auf modifizierte Weise nach dem von Jaffe *et al.* 1973 veröffentlichten Protokoll.

Die Nabelschnüre wurden aus umliegenden Krankenhäusern bezogen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C steril (in H/H +/-) aufbewahrt.

Unter sterilen Bedingungen unter der Laminar Air Flow (LaminAir® HB 2448, Heraeus) wurde zunächst die Vene der Nabelschnur identifiziert und mit einer Braunüle® (18 G, Braun) kanüliert. Über die liegende Braunüle® wurde die Vene mit sterilem H/H +/- gespült und dann für 20 Minuten mit Kollagenase TypII 0,025 % gefüllt. Anschliessend liess sich nach vorsichtiger Massage der Nabelschnüre ein großer Teil der Endothelzellen mit zusatzfreiem Medium 199 auswaschen. Das zellhaltige Medium wurde für 10 Minuten bei 350 g zentrifugiert und das entstandene Pellet in MCDB 131 resuspendiert. Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturmedium (MCDB 131, 10 % FCS) bei 37°C und 5 % CO₂ (Begasungsbrutschrank BB 6220, Heraeus) in T80-Flaschen.

Bei Konfluenz (nach 3-5 Tagen) wurden die Endothelzellen je nach geplanter Verwendung in 6-Well-Platten, auf Glasplättchen, auf Polycarbonfilter oder erneut in T-80 Flaschen passagiert.

Die Charakterisierung der Endothelzellen erfolgte nach den von Jaffe *et al.* beschriebenen morphologischen und immunzytologischen Kriterien. Sie wuchsen zu einem kopfsteinpflasterähnlichen Monolayer und waren CD31-, vWF-, Vimentin-, E-Selektin- und VCAM-positiv sowie Zytokeratin-negativ.

2.2.1.2 Passagieren

Zunächst wurden die entsprechenden Kulturgefäße für 60 Minuten mit Gelatine 0,5 mg/ml vorbehandelt, um eine möglichst naturgemäße Haftung der Endothelzellen zu gewährleisten. Die konfluenten Endothelzellen wurden mit sterilem H/H +/- gewaschen und anschließend mittels 3 ml Trypsin-EDTA 0,5 % abgelöst. Sobald die Zellen sich abrundeten (Beobachtung unter dem Mikroskop), wurden sie mit einem kräftigen Schlag

auf die Flasche vollständig abgelöst und die Reaktion sofort durch Zugabe von Kulturmedium beendet. Anschließend wurden die Endothelzellen wieder in Kulturmedium auf die jeweiligen Kulturgefäße verteilt. Nach 3-5 Tagen waren die Zellen erneut konfluent.

2.2.2 Bestimmung der endothelialen Permeabilität

Zur Messung der endothelialen Permeabilität wurde eine Filtermembran zunächst mit einem Endothelzellmonolayer bepflanzt und anschließend einem konstanten hydrostatischen Druck ausgesetzt. Die Durchlässigkeit des Endothelzellmonolayers wurde mit Hilfe eines angeschlossenen Messsystems in Abhängigkeit von der Zeit mit und ohne Zugabe von Inhibitoren oder Stimulantien gemessen.

2.2.2.1 Präparation der Membranen

Die Filter wurden für 1 Stunde steril in Gelatine (2 mg/ml) eingelegt. Anschließend wurde der Überstand abgegossen und Glutaraldehyd 3 % (unter dem Abzug) zur Quervernetzung der Gelatine zugegeben. Zur Sterilisierung wurden die Filter für mindestens eine Stunde in Ethanol 70 % gelegt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Filter zur Äquibrilierung steril in H/H -/- im Inkubator aufbewahrt. Dabei war zu beachten, dass sich die beiden Seiten der Filter unterscheiden, die matte Seite zeigte bei allen Schritten nach oben.

2.2.2.2 Bepflanzung der Membranen

Es wurden die Endothelzellen von 2 konfluent bewachsenen T-80 Flaschen auf 6 Filter gepflanzt. Die vorbereiteten Filter wurden je zweimal mit sterilem H/H -/- gewaschen und mit der matten Seite nach oben in eine Petrischale (Durchmesser 3 cm) gelegt, um darin zu trocknen. Das Medium wurde aus den T-80 Kulturflaschen gesaugt, diese dann vorsichtig zweimal mit H/H -/- gewaschen, bevor die Zellen mittels 3 ml Trypsin-EDTA 0,5 % pro Flasche abgelöst wurden. Sobald die Zellen sich abrundeten (Beobachtung unter dem Mikroskop) wurden sie mit einem kräftigen Schlag auf die Flasche vollständig abgelöst und die Reaktion sofort mit 6 ml Kulturmedium pro Flasche beendet. Die Suspension wurde in Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 200 g 5 Minuten zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden die Filter mittels einer glühenden Kanüle an den Boden der Petrischalen fixiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt, die Pellets mit exakt 0,5 ml Kulturmedium pro Filter resuspendiert, in ein

Röhrchen geeint und anschließend gleichmäßig auf die Filter pipettiert. Die Filter wurden für 4 Stunden in den Inkubator gestellt damit die Zellen auf den Filter sedimentieren konnten, danach erfolgte die Zugabe von 8 ml Medium pro Filter. Nach 2 bis 3 Tagen waren die Filter konfluent bewachsen (Kontrolle unter dem Mikroskop) und konnten zur Permeabilitätsbestimmung verwendet werden.

2.2.2.3 Bestimmung der Permeabilität

Bei Konfluenz der Endothelzellen wurden die Filter in ein Kammerensystem gespannt, welches ein Volumen von 1 ml fasst. Der obere Teil der Kammer hatte 2 Zugänge. Über den ersten wurde der Filter einem konstanten Druck von 10 cm Wassersäule ausgesetzt, der zweite ermöglichte die Zugabe von Substanzen. Unterhalb der Kammer befand sich eine Messsäule, welche das Volumen der durch die Endothelzellschicht gelangten Flüssigkeit anzeigte. Das System wurde mit Hilfe einer Pumpe und einer Heizung mit 37°C warmer H/H -/- umspült.

Zu beachten ist, dass die Zellen, nachdem sie einem hydrostatischen Druck ausgesetzt waren, zunächst einen Sealing-Prozeß durchliefen. Das heißt, über den Zeitraum von circa einer halben Stunde waren die Filter verstärkt durchlässig mit einer hydraulischen Konduktivität von bis zu $1 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$. Nur die Filter, welche nach Ablauf dieser Zeit ihre Durchlässigkeit auf unter $0,4 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$ reduzierten, wurden zu weiteren Untersuchungen verwendet.

Die Permeabilität wurde alle 5 Minuten gemessen, dabei wurden Filtrationsvolumina ab 10 μl erfasst.

Abbildung 2:

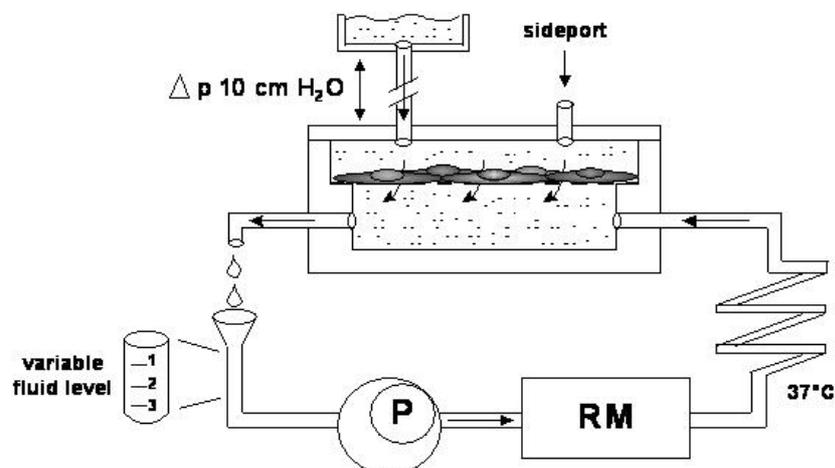


Abb. 2: Übersicht über den Aufbau der Filteranlage. variable fluid level: Messvorrichtung für die hydraulische Konduktivität; P=Pumpe; RM=Heizung; sideport: Vorrichtung zur Zugabe von Substanzen.

2.2.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Bei fixierten und permeabilisierten Zellen lassen sich im Zytoplasma oder auf der Zelloberfläche enthaltene Proteine mittels Antikörpern (AK) oder anderer an das jeweilige Protein bindende Substanzen nachweisen. Der Antikörper beziehungsweise das an das Zielprotein bindende Agens ist dabei gegen das zu untersuchende Protein gerichtet und an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt. Dies bewirkt eine Fluoreszenz des Bindungs-Komplexes nach Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge. Bei den Versuchen wurde Phalloidin verwendet, welches direkt an F-Aktin bindet.

2.2.3.1 Fixierung und Permeabilisierung

Die auf Glasplättchen in 24-Well Platten kultivierten Endothelzellen wurden bei Konfluenz mit entsprechenden Stimuli und Inhibitoren inkubiert.

Das Medium wurde anschließend vorsichtig aus den Vertiefungen gesaugt und die Zellen mit 250 µl Paraformaldehyd (PFA) 3 % pro Vertiefung für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach Absaugen des PFA wurden die Zellen mittels 250 µl Triton X-100 0,1 % über 5 Minuten permeabilisiert.

2.2.3.2 Antigendetektion

Nach vorsichtigem Absaugen der Permeabilisierungslösung erfolgte ein zweimaliges Waschen mit 250 µl PBS pro Vertiefung. Anschließend wurden die Fc-Rezeptoren mit 250 µl humanem IgG (Venimmun[®] 5 mg/ml, 5 Minuten) pro Vertiefung abgeblockt. Das Venimmun[®] wurde abgesaugt und die Zellen anschließend mit Fluoreszenzfarbstoffgekoppeltem Phalloidin für 20 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut zweimal mit 250 µl PBS pro Vertiefung gewaschen und die Vertiefungen mit 250 µl PBS aufgefüllt. Zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung wurden die Glasplättchen aus den Vertiefungen entnommen und unter dem Mikroskop mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Es wurden ausschließlich repräsentative Ausschnitte der Präparate fotografiert.

2.2.4 Western Blot

Mittels der Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-Page) wurde das aus den Zellen gewonnene Gesamtprotein entsprechend der jeweiligen Molekülgröße aufgetrennt. Nach Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran waren sie einer Immundetektion durch spezifische Antikörper zugänglich.

2.2.4.1 Proteinextraktion

Die auf 6-Well-Platten stimulierten Zellen (je 2 Wells entsprachen einer Stimulation) wurden zunächst zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschliessend in 30 µl Lyse-Puffer pro Vertiefung mit einem Zellschaber abgelöst. Beide Schritte erfolgten auf Eis. Das Lysat wurde in ein Eppendorfgefäß gegeben und bei 12.000 rpm und 4°C für 3 Minuten zentrifugiert. Der das Zellprotein enthaltende Überstand wurde in ein weiteres Eppendorfgefäß gegeben. 10 µl wurden für die Bestimmung der Proteinkonzentration entnommen und der Rest sofort bei -20°C eingefroren.

2.2.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Da der Lysepuffer keine interferierenden Substanzen wie Triton, TRIS oder EDTA enthielt, konnte die Proteinmenge mit dem BioRad Protein Assay (BioRad) nach Bradford bestimmt werden. Hierzu wurde dem Protein der Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue*® hinzugegeben, welcher nach Bindung an basische und aromatische Aminosäuren sein Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verlagert. Dabei erfolgt ein Farbumschlag von Grün-Braun in Blau mit von der Proteinkonzentration der Probe abhängiger Intensität. Die Proben wurden in einem Spektralphotometer bei 595 nm gemessen, und ihr Proteingehalt durch den Vergleich mit einer Standardkurve bestimmt.

2.2.4.3 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Bei der SDS-Page werden die denaturierten, negativ geladenen Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Dies erfolgt durch eine Wanderung aller Proteine im elektrischen Feld in Richtung Anode und ihrer Auftrennung entsprechend dem relativen Molekulargewicht. Bei einem Molekulargewicht von VASP von 46 kDa und Serin¹⁵⁷-phospho-VASP von 50 kDa wurden ausschließlich 7,5 % Gele verwendet. Jeweils 80 µg Protein wurde im Verhältnis 1:1 mit Auftragepuffer versetzt, für 3 Minuten bei 95°C

geschüttelt und anschließend in die jeweilige Geltasche übertragen. Ein Größenmarker lief bei jeder Elektrophorese mit. Die Elektrophorese erfolgte 2 Stunden im Laemmli-Puffer in BioRad Mini-Gel-Kammern bei 100 V Stromspannung.

2.2.4.4 Protein-Blot

Um die nun im Gel enthaltenen Proteine einer Antikörperdetektion zugänglich zu machen wurden sie, auf Grund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode wandernd, mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine geeignete Membran übertragen. Hierzu wurde das Gel vorsichtig aus der Apparatur genommen, für 15 Minuten im Blotting-Puffer äquilibriert und auf eine ebenfalls in Puffer getränkte Hybound-Nitrozellulosemembran (Amersham) gelegt. Luftblasen zwischen Gel und Membran waren unbedingt zu vermeiden oder gegebenenfalls zu beseitigen, da sie das Wandern der Proteine verhindern. Beide Seiten dieses Gel-Membran-Sandwiches wurden nun mit je 2 Lagen 3M-Whatman-Papier (Whatman) belegt, in die Blotvorrichtung gelegt und in die Kammer (BioRad) gesetzt. Der Proteintransfer erfolgte über 1 Stunde in eiskaltem zirkulierendem Blotting-Puffer bei 100 V und maximaler Stromstärke.

2.2.4.5 Nachweis der Proteine auf der Membran

Um den Erfolg des Proteintransfers zu überprüfen wurde die Hybound-Membran in Ponceau-S-Lösung inkubiert, dies führte zu einem Anfärben der Proteine. Anschließend wurde die Membran durch sorgfältiges Waschen mit Aqua bidest wieder komplett entfärbt.

2.2.4.6 Antikörperexposition

Zunächst wurden unspezifische Proteinbindungen durch Zugabe des Blockpuffers (Odyssee:PBS 1:1) auf die Membran über 1 Stunde bei Raumtemperatur abblockt. Anschließend wurde der VASP-Antikörper in einem Verhältnis 1:1000 zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 Minuten in Waschpuffer und einmal für 5 Minuten in reinem PBS wurde der Detektionsantikörper 1:2.500, ebenfalls in Blockpuffer, zur Membran gegeben und über 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe mit Hilfe des Odyssey Infrared-Imaging-Systems (Licor).

2.2.5 Statistische Methoden

Die erhobenen Daten aus den Versuchen zur Messung der hydraulischen Konduktivität (Abb. 3-6) wurden mittels AxB ANOVA analysiert. Die Effekte wurden mittels F-Test verglichen. Ein P-Wert von <0.05 wurde als signifikant gewertet. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SE dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur endothelialen Permeabilität

Auf Membranen gepflanzte Endothelzellmonolayer wurden zunächst durch Applikation eines konstanten Drucks von 10 cm Wassersäule einem sogenannten „Sealingprozess“ unterzogen. Die Monolayer, welche danach einen Wert der hydraulischen Konduktivität von $0,4 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$ nicht überschritten, wurden mit Stimulantien inkubiert. Die anderen Monolayer wurden verworfen. Die Filtrationsrate wurde in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Es werden jeweils die Mittelwerte der erhobenen Messdaten \pm SE angegeben.

3.1.1 Thrombin erhöhte die endotheliale Permeabilität in HUVECs

Thrombin erhöhte in einer Dosis von 1 U/ml innerhalb von Minuten nach Zugabe die hydraulische Konduktivität endothelialer Monolayer um ein Vielfaches. Während die Filtrationsrate unbehandelter Kontrollen im Untersuchungszeitraum von 50 Minuten einen Wert von $0,34 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \pm 0,03$ nicht überschritt, erreichte die Filtrationsrate der Thrombin-exponierten Zellen Werte von bis zu $3,98 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \pm 0,60$ und war somit signifikant erhöht ($P < 0.001$; Abb. 3). Die Permeabilitätszunahme fand hauptsächlich innerhalb der ersten 5 Minuten statt, die maximale hydraulische Konduktivität war nach 10 Minuten nachweisbar. Thrombin erhöhte die Filtrationsrate der Endothelzellen reversibel, sie sank nach Erreichen des Maximums kontinuierlich ab bis nach 40-50 Minuten wieder Werte vergleichbar denen der Negativkontrolle erreicht waren. 25 Minuten nach Thrombin-Applikation war die Filtrationsrate nicht mehr signifikant von der Negativkontrolle verschieden ($P > 0.05$).

Abbildung 3:

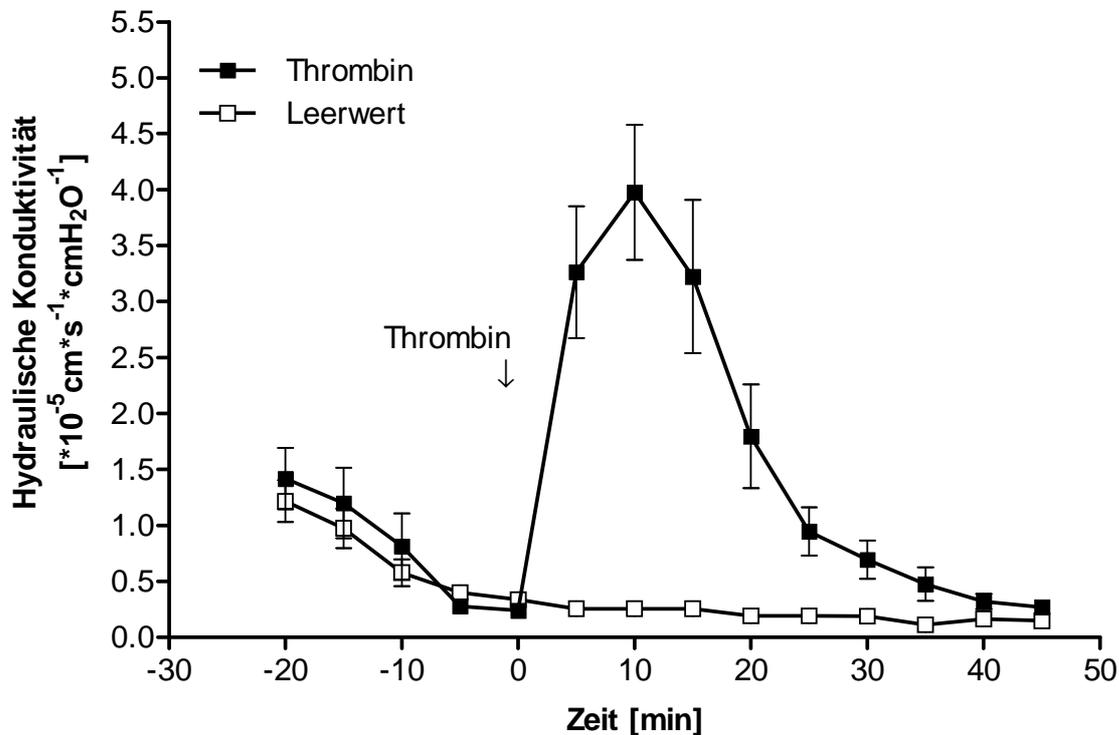


Abb. 3: **Thrombin erhöhte reversibel die hydraulische Konduktivität endothelialer Monolayer.** Nach Applikation von Thrombin in einer Konzentration von 1 U/ml zum Zeitpunkt 0 erhöhte sich die hydraulische Konduktivität gesealter endothelialer Monolayer reversibel auf Werte von bis zu $3,98 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \pm 0,60$ ($P < 0.001$). Die maximale hydraulische Konduktivität war 10 Minuten nach Thrombin-Applikation erreicht. Danach sank die Filtrationsrate wieder und zeigte 25 Minuten nach Stimulation keine signifikante Differenz mehr verglichen mit der Negativkontrolle ($P > 0.05$). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SE aus 6 unabhängigen Experimenten.

3.1.2 Zyklische Nukleotide reduzierten Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität

Die Applikation des Adenylylzyklase-Aktivators Forskolin sowie des Stickstoffmonoxid (NO)-Donators SNP auf gesealte Endothelzellmonolayer hatte keinen signifikanten Effekt ($P > 0.05$) auf die basale Filtrationsrate verglichen mit der unbehandelten Negativkontrolle (Abb. 4). Auch die Applikation des PDE2-Inhibitors Byk190954 induzierte keine signifikante Veränderung der basalen hydraulischen Konduktivität ($P > 0.05$). Über den Beobachtungszeitraum von 45 Minuten fand sich weder ein Anstieg noch ein Abfall der basalen Filtrationsrate.

Abbildung 4:

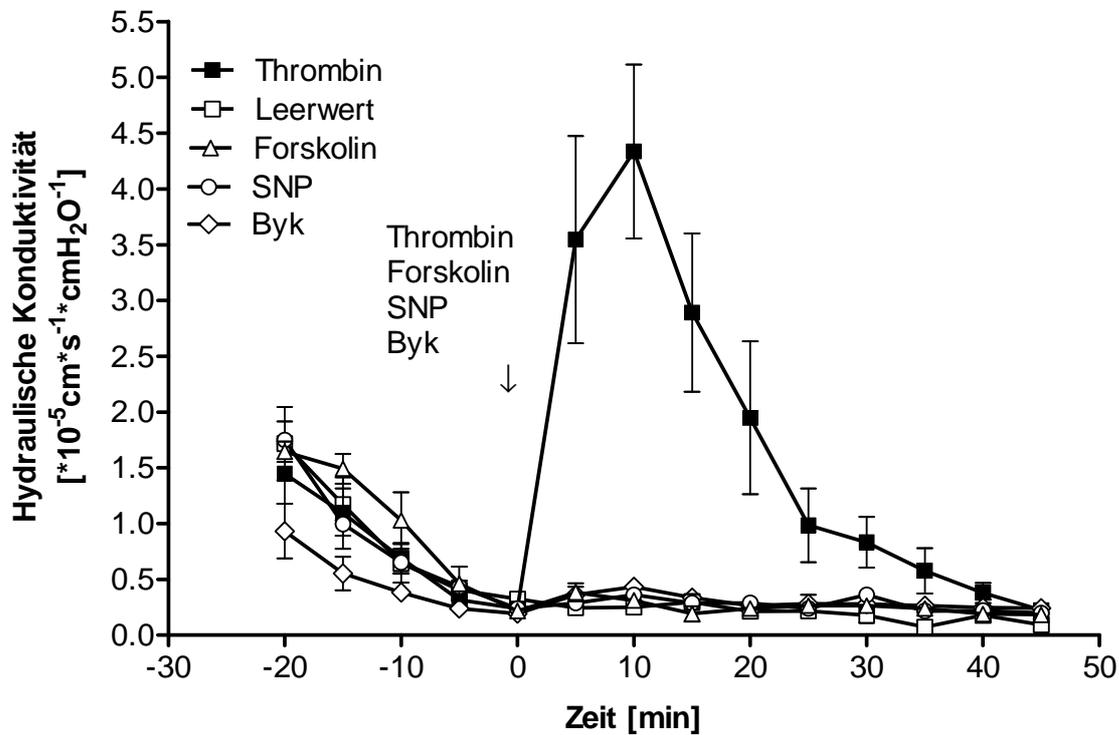


Abb. 4: **Forskolin, SNP und der PDE2-Inhibitor Byk190954 induzierten keine Veränderung der basalen endothelialen Permeabilität.** Die Inkubation endothelialer Monolayer mit Forskolin (1 μM), SNP (10 μM) oder dem PDE2-Inhibitor Byk190954 (Byk; 1 μM) führte zu keinen signifikanten Veränderungen der hydraulischen Konduktivität innerhalb des Beobachtungszeitraums von 45 Minuten verglichen mit der Negativkontrolle ($P > 0.05$). Die Stimulation mit Thrombin (1 U/ml) führte zu einer signifikanten Permeabilitätszunahme über einen Zeitraum von 25 Minuten ($P < 0.001$), danach unterschied sich die Filtrationsrate nicht mehr signifikant von der Negativkontrolle ($P > 0.05$). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SE aus 4 unabhängigen Experimenten.

Wurden die Zellen 20 Minuten nach Applikation von Forskolin, SNP oder Byk190954 mit Thrombin stimuliert, so war die Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität jeweils signifikant reduziert ($P < 0.001$; Abb. 5). Des Weiteren war auch die Dauer der Thrombin-induzierten Hyperpermeabilität verkürzt. Die Vorstimulation mit Forskolin schien dabei die stärkste Reduktion der Thrombin-induzierten Hyperpermeabilität zu bewirken, es

fanden sich Maximalwerte der hydraulischen Konduktivität von $0,58 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \pm 0,10$.

Die Werte der hydraulischen Konduktivität waren nach Inkubation mit den cGMP-erhöhenden Substanzen SNP und Byk190954 vor Stimulation mit Thrombin vergleichbar hoch ($0,91 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \pm 0,10$ und $0,82 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \pm 0,20$).

Statistisch fanden sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Filtrationsrate der Negativkontrolle mit den Filtrationsraten nach SNP-, Forskolin- oder Byk190954-Applikation vor Thrombin-Stimulation ($P > 0,05$).

Abbildung 5:

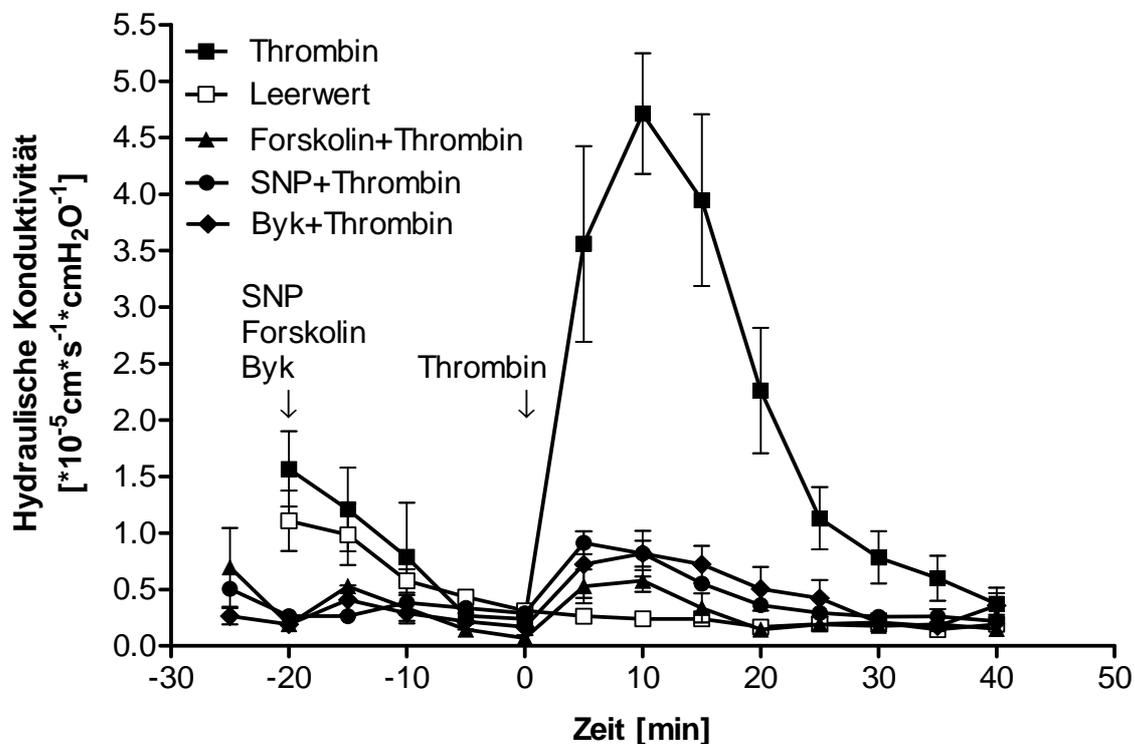


Abb. 5: **Forskolin, SNP und Byk190954 reduzierten die Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität.** Wurde den Endothelzellen 20 Minuten vor Thrombin-Stimulation (1 U/ml) Forskolin (1 μM), SNP (10 μM) oder der PDE2-Inhibitor Byk190954 (Byk; 1 μM) zugegeben, so war die Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität jeweils signifikant reduziert ($P < 0,001$). Den stärksten Effekt bezüglich der Reduktion der Thrombin-induzierten Hyperpermeabilität hatte Forskolin, neben der Verminderung der Hyperpermeabilität war auch ihre Dauer auf etwa 20 Minuten verkürzt.

Die Unterschiede im Vergleich der Filtrationsraten der Negativkontrolle und der SNP-, Forskolin- oder Byk190954-Applikation vor Thrombin-Stimulation waren nicht signifikant ($P > 0.05$).

Die Maximalwerte der hydraulischen Konduktivität betragen nach Stimulation mit Forskolin und Thrombin $0,58 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \pm 0,10$, nach Stimulation mit SNP und Thrombin $0,91 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \pm 0,10$ und nach Stimulation mit Byk190954 und Thrombin $0,82 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \pm 0,20$. In der Positivkontrolle wurden Werte der hydraulischen Konduktivität von $4,71 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \pm 0,53$ erreicht, in der Negativkontrolle überschritt die Filtrationsrate nicht $0,31 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \pm 0,02$. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SE aus 4 unabhängigen Experimenten.

Die Vorinkubation mit sowohl Byk190954 als auch Forskolin beziehungsweise SNP vor Stimulation mit Thrombin hatte bezüglich der Reduktion der Thrombin-induzierten Hyperpermeabilität keinen additiven Effekt.

Die Filtrationsrate nach Applikation von sowohl Byk190954 (zum Zeitpunkt -40 Minuten) als auch Forskolin (zum Zeitpunkt -20 Minuten) auf den Monolayer vor Thrombin-Stimulation (zum Zeitpunkt 0) entsprach mit einem Maximalwert der hydraulischen Konduktivität von $0,77 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \pm 0,26$ etwa jener, welche nach Forskolin- und Thrombin-Stimulation gemessen wurde. Die Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität war signifikant reduziert ($P < 0.001$) und die Filtrationsrate nicht signifikant von der Kontrolle verschieden ($P > 0.05$).

Wurden die Zellen vor Thrombin-Stimulation sowohl mit Byk190954 (zum Zeitpunkt -40 Minuten) als auch SNP (zum Zeitpunkt -20 Minuten) inkubiert, so war die hydraulische Konduktivität auf $1,69 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \pm 0,26$ reduziert. Die Filtrationsrate war niedriger als nach alleiniger Thrombin-Stimulation ($P < 0.001$), aber höher als nach entweder Byk 190954- oder SNP-Applikation vor Thrombin-Stimulation. Die Filtrationsrate war zu den Messzeitpunkten 5 und 10 Minuten signifikant höher als in der Negativkontrolle ($P < 0.01$).

Abbildung 6:

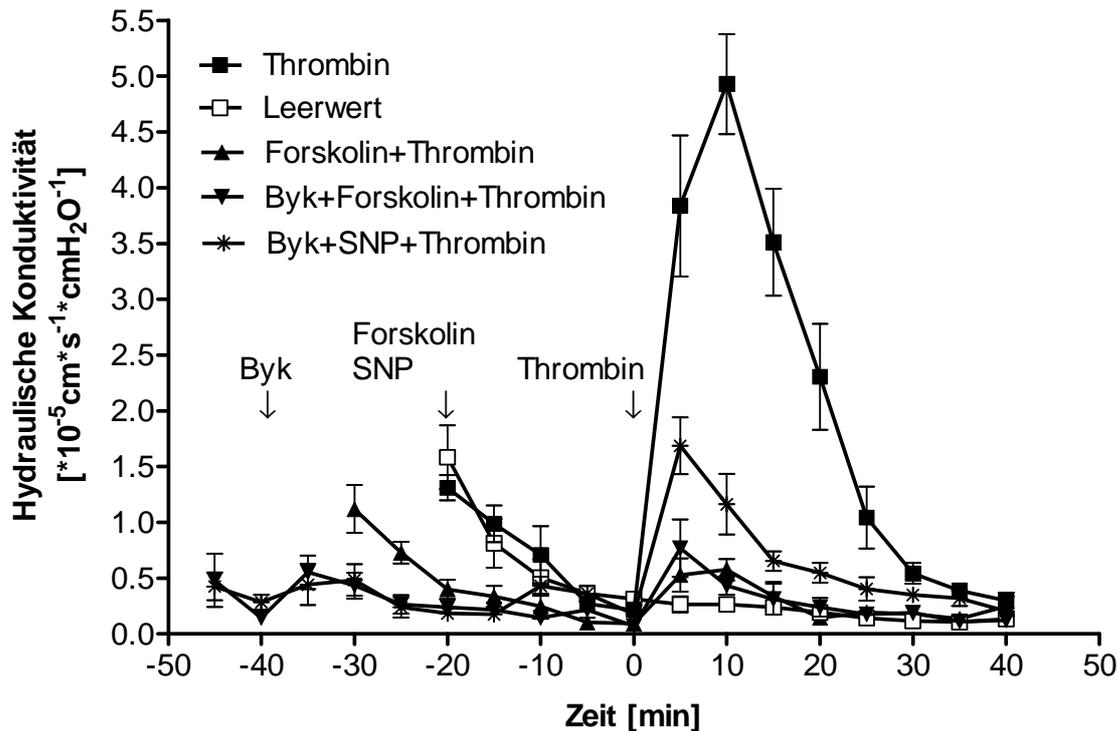


Abb. 6: Die Inkubation mit Byk190954 vor Forskolin- oder SNP-Applikation führte zu keiner weiteren Reduktion der Thrombin-induzierten Hyperpermeabilität.

Wurde der PDE2-Inhibitor Byk190954 (Byk; 1 μM zum Zeitpunkt -40 Minuten) 20 Minuten vor Stimulation mit Forskolin (1 μM zum Zeitpunkt -20 Minuten) appliziert, so führte dies zu keiner weiteren Reduktion der Thrombin-induzierten Hyperpermeabilität verglichen mit der alleinigen Inkubation mit Forskolin oder Byk190954 vor Thrombin-Stimulation. Die Inkubation sowohl mit Byk190954 als auch Forskolin reduzierte die Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität signifikant ($P < 0.001$), statistisch waren die erhobenen Messwerte nicht von der Negativkontrolle verschieden ($P > 0.05$). Wurden mit Byk190954 (Byk; 1 μM zum Zeitpunkt -40 Minuten) vorinkubierte Zellen gegenüber SNP (10 μM zum Zeitpunkt -20 Minuten) exponiert, so war die Filtrationsrate nach Thrombin-Stimulation höher als nach alleiniger Vorinkubation mit SNP oder Byk 190954 vor Thrombin-Stimulation (Abb. 5). Dabei war die Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität signifikant reduziert ($P < 0.001$), gleichzeitig war die Filtrationsrate verglichen mit der Negativkontrolle signifikant erhöht ($P < 0.01$).

Die Maximalwerte der hydraulischen Konduktivität betragen nach Stimulation mit Forskolin und Thrombin $0,58 \times 10^{-5} \text{cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \pm 0,10$, nach Stimulation mit Byk190954, Forskolin und Thrombin $0,77 \times 10^{-5} \text{cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \pm 0,26$ und nach

Stimulation mit Byk190954, SNP und Thrombin $1,69 \times 10^{-5} \text{cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \pm 0,26$. In der Positivkontrolle wurden Werte der hydraulischen Konduktivität von $4,93 \times 10^{-5} \text{cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \pm 0,45$ erreicht, in der Negativkontrolle überschritt die Filtrationsrate nicht Werte von $0,31 \times 10^{-5} \text{cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \pm 0,03$. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SE aus 4 unabhängigen Experimenten.

3.2 Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts

Bei den Abbildungen handelt es sich um immunfluoreszenz-mikroskopische Bilder. Es wurden konfluente endotheliale Monolayer mit unterschiedlichen Stimulantien inkubiert und anschließend, nach Permeabilisierung und Fixierung, das Aktinzytoskelett mittels Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltem Phalloidin angefärbt.

3.2.1 Das Aktingerüst ruhender und Thrombin-stimulierter Endothelzellen

Ruhende HUVECs wiesen bei Konfluenz im lichtmikroskopischen Bild ein an Kopfsteinpflaster erinnerndes homogenes Bild mit gut diskriminierbaren polygonalen Zellen auf. Nach der Aktinfärbung waren einzelne durch das Zytoplasma laufende Stressfasern sowie ein gut ausgebildetes DPB zu erkennen. Es fanden sich einzelne kleine interzelluläre Lücken. Wurden die Zellen mit Thrombin stimuliert, so bildeten sich innerhalb weniger Minuten prominente Stressfasern aus, ein DPB ließ sich nicht mehr diskriminieren. Die Zellen retrahierten sich und bildeten ausgeprägte interzelluläre Lücken aus (Abb. 7).

Abbildung 7:

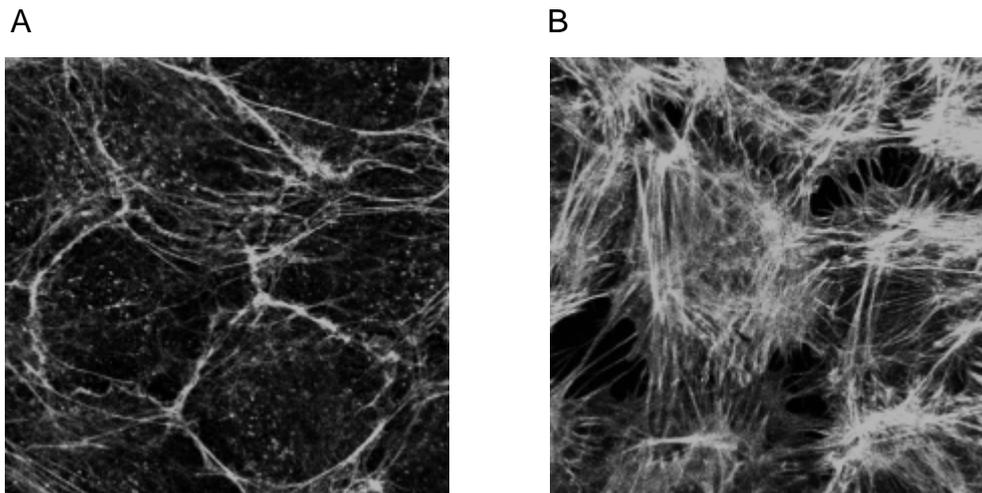


Abb. 7: **Aktinergüst ruhender und Thrombin-stimulierter Endothelzellen.** In der Kontrolle (Bild A) wurde das Aktin unstimulierter konfluenter Endothelzellen mittels Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltem Phalloidin gefärbt. Es waren einzelne Stressfasern zu erkennen. Das DPB grenzte die Zellen deutlich voneinander ab. Nach Thrombin-Stimulation (Bild B, Thrombin 1 U/ml, 15 Minuten) bildeten die Zellen dicht gebündelte Stressfasern aus, welche das gesamte Zytoplasma durchzogen. Das DPB war nicht mehr zu diskriminieren. Die Zellen retrahierten sich und bildeten große interzelluläre Lücken aus. Zellausläufer hielten dabei weiterhin Kontakt zur jeweiligen Nachbarzelle. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für 5 unabhängige Experimente.

3.2.2 Das Aktinzytoskelett von HUVECs nach cAMP-erhöhenden Maßnahmen

Die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration mittels Forskolin (Abb. 8) oder durch Hemmung der abbauenden Enzyme PDE3 und PDE4 mittels Zardaverin (Bilder nicht gezeigt) induzierte eine Abnahme der Stressfasern und eine verstärkte Ausbildung des DPB. Das DPB erschien verdichtet und war kompakt entlang der Zellgrenzen zu erkennen. Die Zellen waren in ihrer polygonalen Form deutlich voneinander abgrenzbar. Nach Doppelstimulation mit Forskolin und Zardaverin erschien das DPB noch kompakter, interzelluläre Lücken waren kaum zu erkennen (Bilder nicht gezeigt).

Abbildung 8:

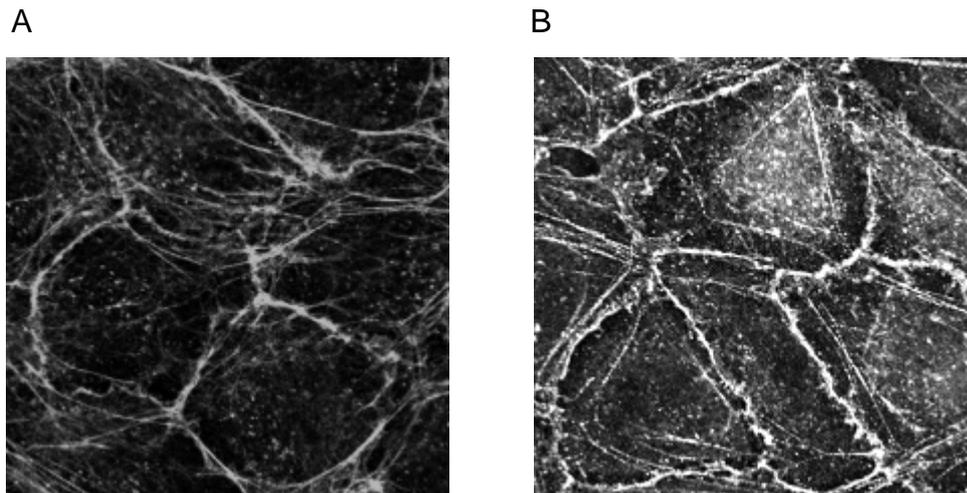


Abb. 8: **Das Aktinzytoskelett von HUVECs nach cAMP-erhöhenden Maßnahmen.** Nach Inkubation mit Forskolin (Bild B, 1 µM, 20 Minuten) erkannte man im Vergleich zur Kontrolle (Bild A) eine Verdichtung des DPB, welches gut abgrenzbar entlang der Zellgrenzen verlief. Die Ausbildung von Stressfasern erschien reduziert. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für 5 unabhängige Experimente.

3.2.3 Erhöhte cAMP-Spiegel stabilisierten das Aktinzytoskelett von HUVECs

Wurden die Endothelzellen nach Inkubation mit Forskolin oder Zardaverin mit Thrombin stimuliert, so war eine deutliche Zunahme an Stressfasern zu erkennen. Die Stressfasern erschienen dabei weniger ausgeprägt als nach alleiniger Thrombin-Stimulation. Das DPB war weiterhin entlang der Zellgrenzen zu diskriminieren. Eine Retraktion der Zellen blieb aus und der Zellverband erhalten. Interendotheliale Lücken waren nur vereinzelt zu erkennen (Abb. 9). Der Thrombineffekt ließ sich durch Vorinkubation mit sowohl Forskolin als auch Zardaverin weiter reduzieren (Bilder nicht gezeigt).

Abbildung 9:

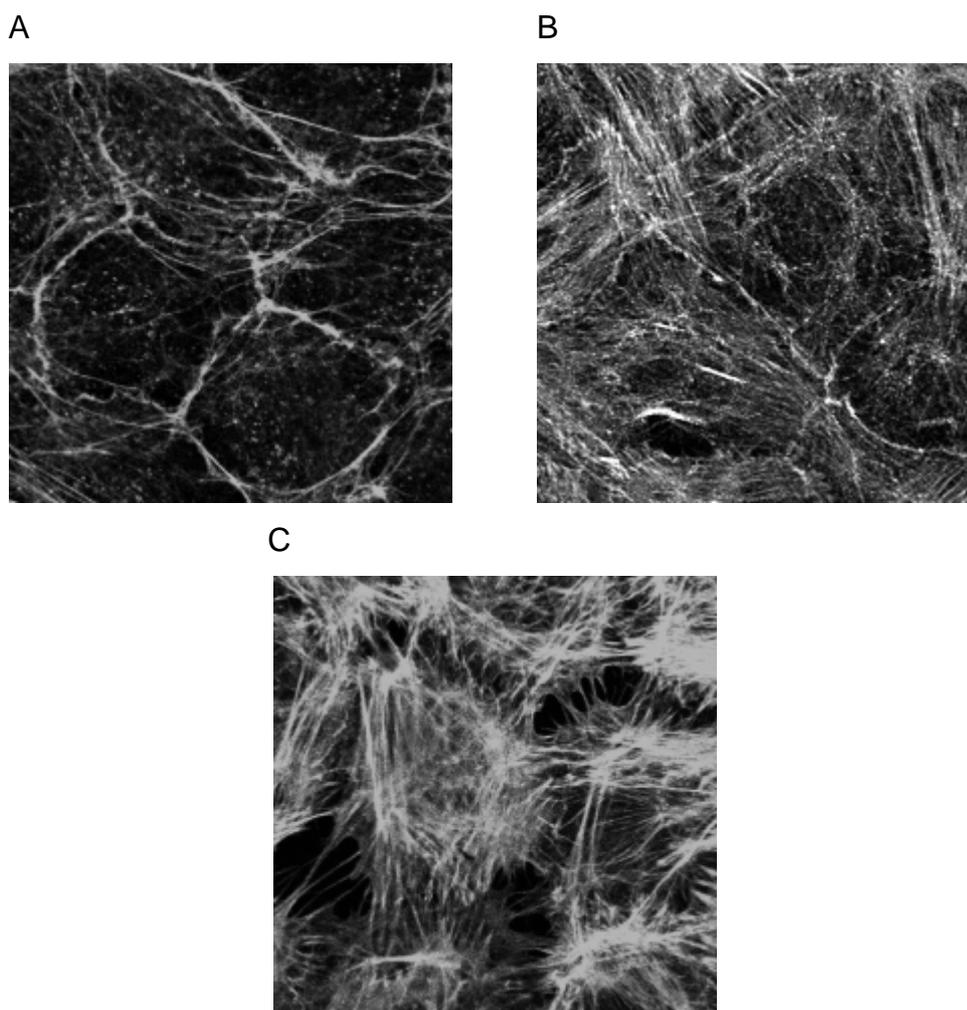


Abb. 9: **cAMP-erhöhende Maßnahmen reduzierten Thrombin-induzierte morphologische Veränderungen des Aktinzytoskeletts.** Nach Inkubation der Endothelzellen mit Forskolin (1 μM , 20 Minuten) wurden sie mit Thrombin (1 U/ml, 15 Minuten) stimuliert (Bild B). Es war eine Zunahme der Stressfasern zu erkennen, diese erschienen weniger gebündelt als nach alleiniger Thrombin-Stimulation (Bild C, 1U/ml, 15 Minuten). Das DPB war weiterhin diskriminierbar. Die Ausbildung interzellulärer Lücken war nur vereinzelt zu erkennen, eine Retraktion der Zellen blieb aus und die Integrität des Zellverbandes erhalten. Bild A: Negativkontrolle. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

3.2.4 Das Aktingerüst von HUVECs bei erhöhten intrazellulären cGMP-Spiegeln

Nach Inkubation der HUVECs mit cGMP-erhöhenden Substanzen trat das DPB im Vergleich zu unstimulierten Zellen prominenter und etwas verbreitert hervor. Dabei erschienen das DPB sowie Anzahl und Größe der interzellulären Lücken bei den verwendeten Stimulantien Byk190954, SNP und dem zellgängigen cGMP-Analogen 8br-cGMP etwa vergleichbar stark ausgeprägt (Abb. 10). Die Stressfasern erschienen nach Inkubation mit Byk190954, verglichen mit der Negativkontrolle, reduziert. Nach SNP-Applikation fanden sich vermehrt, nach 8br-cGMP-Applikation etwa vergleichbar stark ausgeprägte Stressfasern im Vergleich zu unstimulierten Zellen.

Abbildung 10:

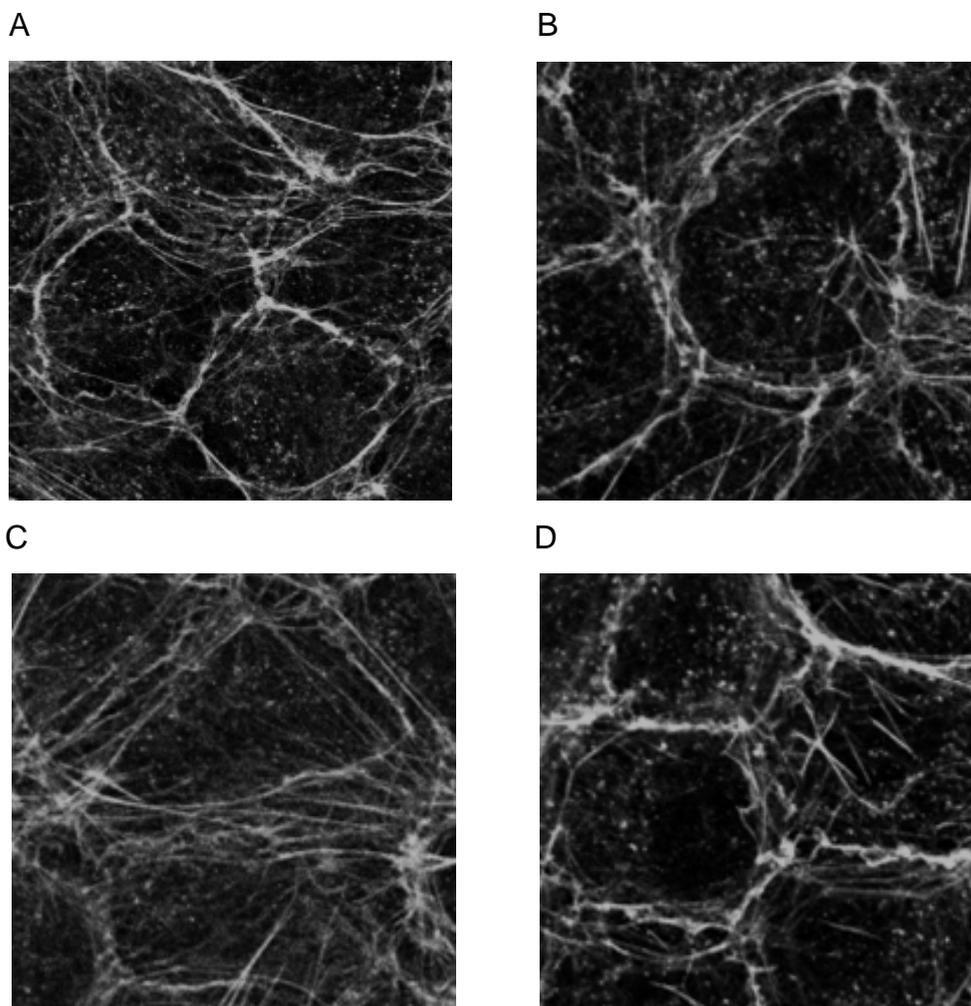


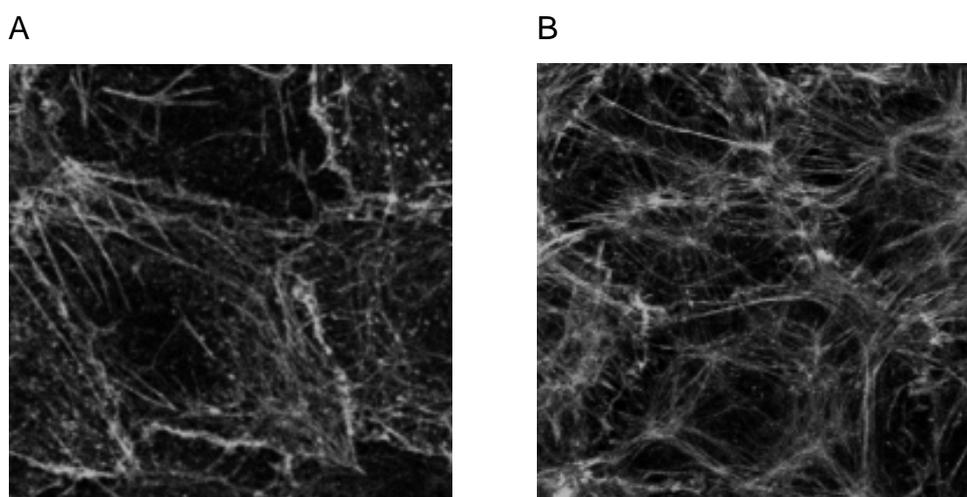
Abb. 10: **Das Aktingerüst von HUVECs nach cGMP-erhöhenden Maßnahmen.** Nach Stimulation mit dem PDE2-Inhibitor Byk190954 (Bild B, 1 μ M, 20 Minuten) war eine Verbreiterung des DPB im Vergleich zur Negativkontrolle (Bild A) zu erkennen.

Stressfasern waren, verglichen mit der Negativkontrolle, reduziert nachweisbar. Die Stimulation mit SNP (Bild C, 10 μ M, 20 Minuten) induzierte ebenso eine Verbreiterung des DPB. Es traten etwas vermehrt Stressfasern auf. Die Gabe des cGMP-Analogons 8br-cGMP (Bild D, 1 mM, 20 Minuten) verursachte eine deutliche Verbreiterung und Verdichtung des DPB, Stressfasern fanden sich, verglichen mit ruhenden Endothelzellen, etwa gleich stark ausgeprägt. Nach Applikation der cGMP-erhöhenden Substanzen fanden sich nur vereinzelt interzelluläre Lücken, etwa vergleichbar mit unstimulierten Zellen. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

3.2.5 Erhöhte cGMP-Spiegel stabilisierten das Aktinzytoskelett von HUVECs

Die Inkubation von HUVECs mit den cGMP-erhöhenden Substanzen Byk190954, SNP oder 8br-cGMP reduzierte die Thrombin-induzierte Ausbildung von Stressfasern und interzellulären Lücken. Die Immunfluoreszenzbilder zeigten, verglichen mit der Negativkontrolle, vermehrt Stressfasern. In der Zellperipherie waren ebenfalls vermehrt Aktinfilamente nachweisbar, das DPB erschien diffus verbreitert. Es bildeten sich interzelluläre Lücken aus, die Zellkontakte blieben jedoch erhalten. Die Ausprägung der zellulären Antwort blieb deutlich unterhalb der nach alleiniger Thrombin-Stimulation (Abb. 11).

Abbildung 11:



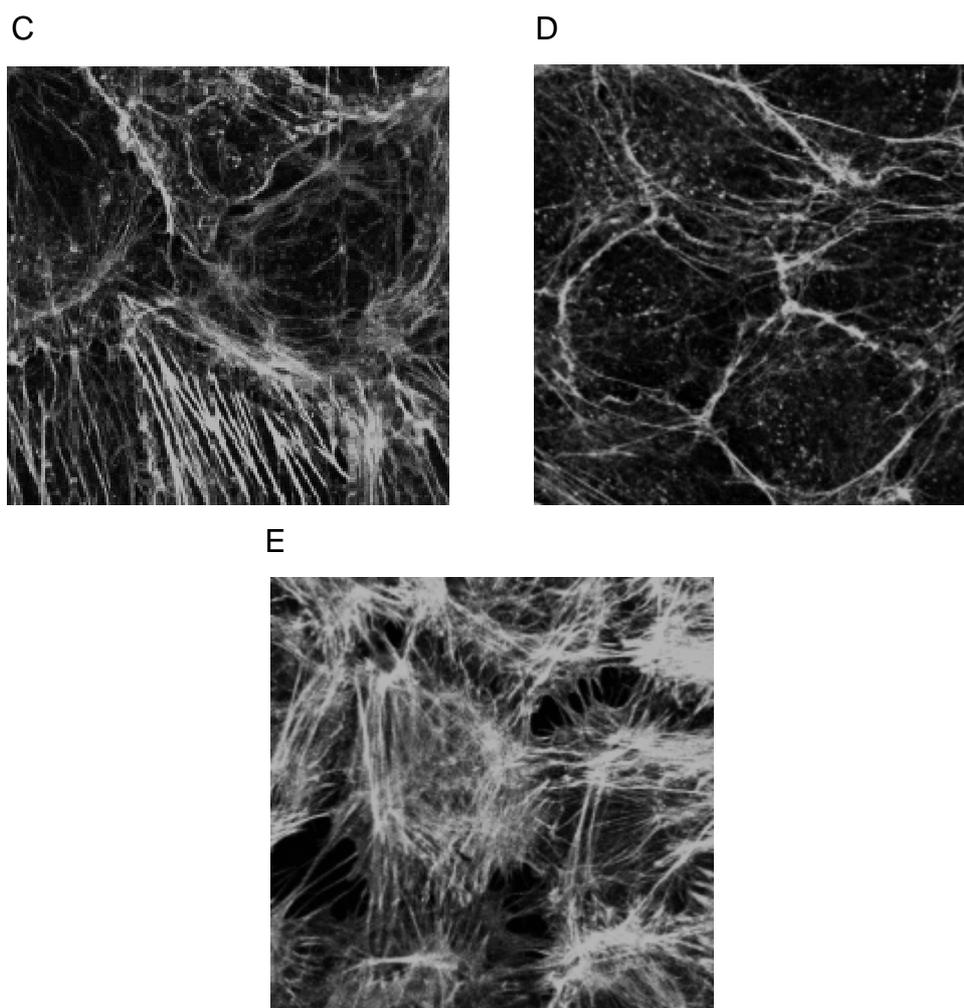


Abb. 11: **cGMP-erhöhende Maßnahmen reduzierten Thrombin-induzierte morphologische Veränderungen des Aktinzytoskeletts.** Wurden die Zellen mit dem PDE2-Inhibitor Byk190954 (Bild A, 1 μ M, 20 Minuten), SNP (Bild B, 10 μ M, 20 Minuten) oder 8br-cGMP (Bild C, 1 mM, 20 Minuten) vorinkubiert, war bei anschließender Stimulation mit Thrombin (je 1U/ml, 15 Minuten) die Zellantwort reduziert. Es war eine leichte Zunahme an Stressfasern zu erkennen und das DPB wirkte diffus verbreitert. Eine Zellretraktion blieb aus und die Integrität des Zellverbandes erhalten. Bild D: Negativkontrolle, Bild E: Positivkontrolle. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Wurden die endothelialen Monolayer sowohl mit Byk190954 als auch mit SNP inkubiert, war, verglichen mit der jeweiligen Einzelstimulation, eine Zunahme von dem DPB und den Stressfasern zu beobachten. Auch waren vermehrt interzelluläre Lücken nachweisbar. Bei nachfolgender Stimulation mit Thrombin war die Ausbildung von

Stressfasern und interzellulären Lücken geringer ausgeprägt als nach alleiniger Thrombin-Stimulation. Die Zellantwort war, verglichen mit Thrombin-Stimulation nach Vorinkubation mit nur einem der beiden cGMP-erhöhenden Substanzen, verstärkt.

Abbildung 12:

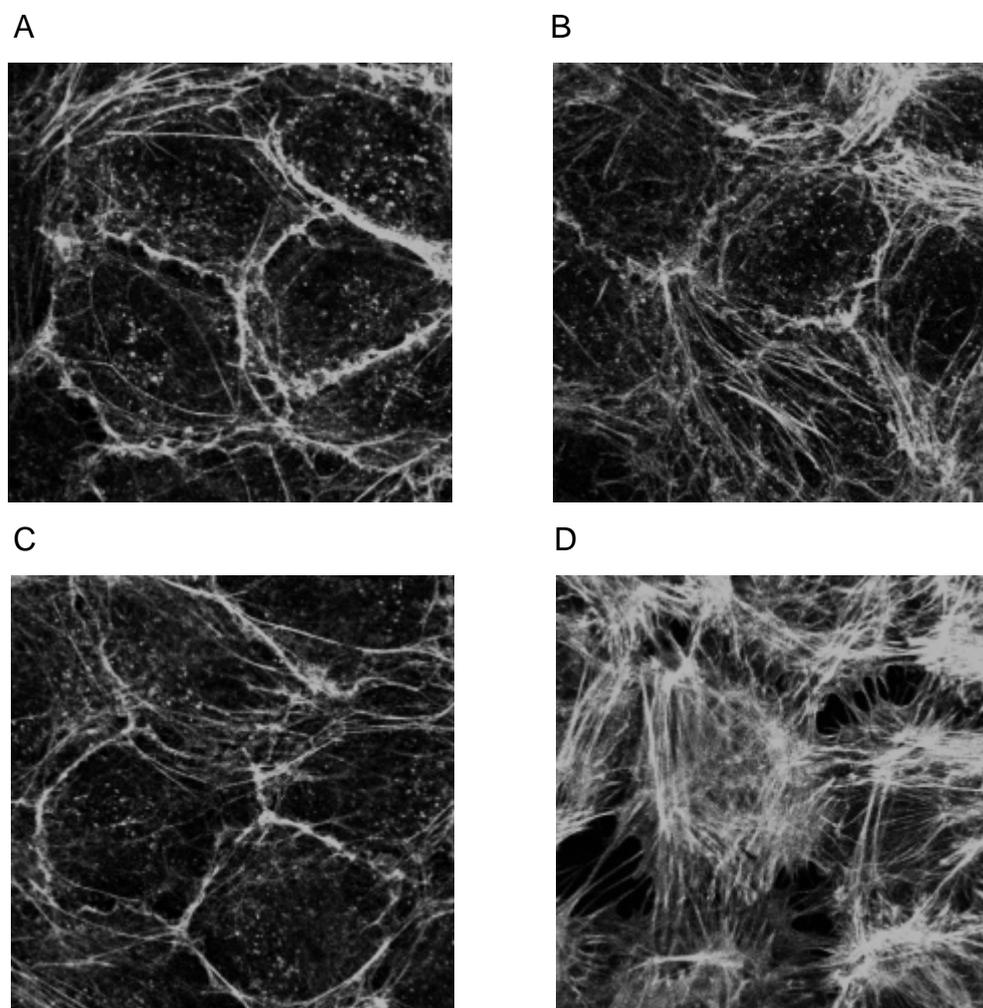


Abb. 12: **Morphologische Veränderungen nach Applikation von Byk190954 und SNP mit und ohne Stimulation mit Thrombin.**

Wurde 20 Minuten vor SNP-Applikation (10 μ M, 20 Minuten) die PDE2 inhibiert (PDE2-Inhibitor Byk190954, 1 μ M), war eine vermehrte Stressfaserbildung und ein etwas verstärkt ausgebildetes DPB, verglichen mit der jeweiligen Einzelstimulation (für je 20 Minuten), zu erkennen (Bild A). Die Exposition gegenüber Thrombin (1 U/ml, 15 Minuten) nach PDE2-Inhibition und SNP-Applikation führte, verglichen mit der Thrombin-Stimulation nach alleiniger Inkubation mit SNP oder Byk190954, zu einer vermehrten Stressfaserbildung (Bild B). Die morphologischen Veränderungen waren

jedoch geringer ausgeprägt als die der Positivkontrolle (Bild D). Eine Retraktion der Zellen blieb aus, und die Integrität des Zellverbandes blieb erhalten. Bild C: Negativkontrolle, Bild D: Positivkontrolle. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

3.3 Das Phosphorylierungsprofil von VASP nach Beeinflussung der intrazellulären Konzentration zyklischer Nukleotide

Der verwendete Antikörper diskriminierte die an Serin¹⁵⁷ phosphorylierte von der an Serin¹⁵⁷ unphosphorylierten Form von VASP. Serin¹⁵⁷-phospho-VASP lässt sich in der SDS-Page bei 50 kDa detektieren und entspricht der oberen der beiden Banden im Western Blot. Die untere Bande wird gebildet von der leichteren (46 kDa), an Serin¹⁵⁷ unphosphorylierten Form. Eine Phosphorylierung an Serin²³⁹ oder Threonin²⁷⁸ konnte nicht mit Hilfe der SDS-Page dargestellt werden, da diese keine Veränderungen in der elektrophoretischen Mobilität verursachen.

3.3.1 cAMP und cGMP erhöhten den Anteil an Serin¹⁵⁷-phospho-VASP

In unstimulierten HUVECs war nur eine Spur von an Serin¹⁵⁷ phosphoryliertem VASP nachweisbar. Eine Stimulation der Endothelzellen mit Forskolin oder dem zellgängigen cAMP-Analogon 8br-cAMP induzierte eine prominente 50 kDa-Bande im Western Blot. Die Applikation von SNP oder dem zellgängigen cGMP-Analogon 8br-cGMP resultierte ebenfalls in einer deutlichen 50 kDa Bande. Diese war nach 8br-cGMP-Applikation etwas stärker ausgeprägt als nach Inkubation mit SNP. In der Intensität waren die 50 kDa-Banden nach cAMP-erhöhenden Maßnahmen deutlich stärker ausgeprägt als nach den cGMP-erhöhenden Maßnahmen (Abb. 13).

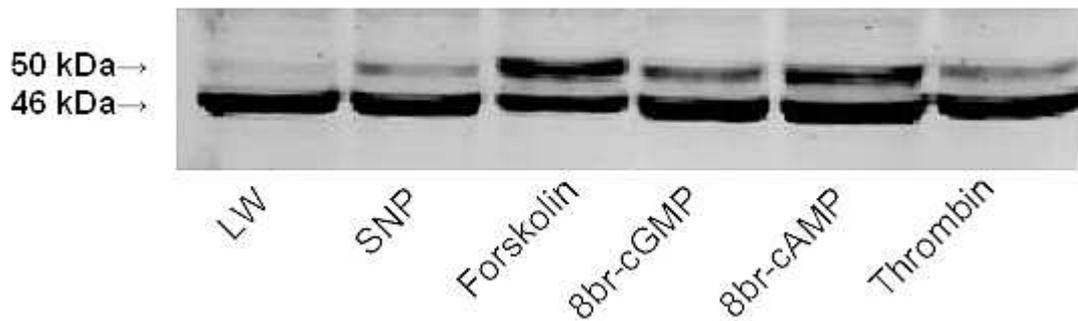
Abbildung 13:

Abb. 13: **cAMP und cGMP erhöhten den Anteil an Serin¹⁵⁷-phospho-VASP in HUVECs.** In unstimulierten Endothelzellen war die Serin¹⁵⁷-phospho-VASP-Bande bei 50 kDa nur sehr schwach ausgeprägt. Die Applikation von Forskolin (1 μ M, 20 Minuten) oder 8br-cAMP (1 mM, 20 Minuten) induzierte eine deutliche Bande bei 50 kDa. Eine etwas schwächer ausgeprägte 50 kDa-Bande war im Protein der mit 8br-cGMP (1 mM, 20 Minuten) stimulierten Zellen nachweisbar. Noch etwas schwächer ausgeprägt, aber weiterhin deutlich zu erkennen, war die 50 kDa-Bande nach SNP-Applikation (10 μ M, 20 Minuten). Eine Stimulation mit Thrombin (1U/ml, 20 Minuten) induzierte einen Shift zur 50 kDa-Bande vergleichbar mit dem nach SNP-Applikation. Der gezeigte Blot ist repräsentativ für 5 unabhängige Experimente.

(LW=Leerwert)

3.3.2 Inhibition der PDE2 blieb ohne Effekt auf die Phosphorylierung von VASP an Serin¹⁵⁷

Die Inkubation der HUVECs mit Byk190954 hatte weder alleine noch bei anschließender Stimulation mit Forskolin, SNP, 8br-cGMP oder 8br-cAMP eine Auswirkung auf das Phosphorylierungsprofil von VASP. Die alleinige Inkubation der Zellen mit Byk190954 entsprach dem Leerwert. Das Signal der 50 kDa-Bande war nach Inkubation mit Byk190954 und anschließender Applikation von Forskolin oder 8br-cAMP deutlich verstärkt, aber nicht stärker als nach alleiniger Forskolin- oder 8br-cAMP-Stimulation. Das 50 kDa-Signal nach Applikation von sowohl Byk190954 als auch SNP beziehungsweise 8br-cGMP war in seiner Intensität ähnlich ausgeprägt wie nach alleiniger SNP- oder 8br-cGMP-Stimulation.

Abbildung 14:

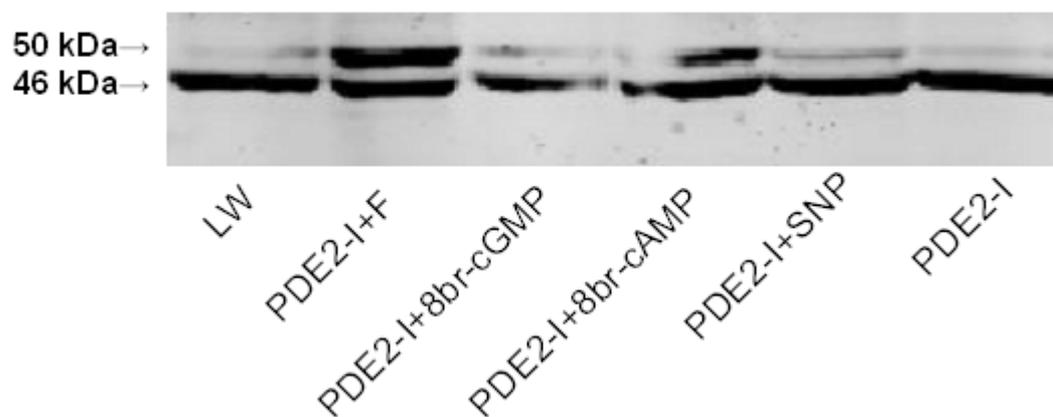


Abb. 14: **Inhibition der PDE2 blieb ohne Effekt auf die Phosphorylierung von VASP an Serin¹⁵⁷**. Eine Inkubation der HUVECs mit dem PDE2-Inhibitor Byk190954 (1 μ M, 20 Minuten) induzierte keine Signalzunahme der 50 kDa-Bande verglichen mit dem Leerwert. Auch eine anschließende Inkubation mit Forskolin (1 μ M), 8br-cAMP (1 mM), SNP (10 μ M) oder 8br-cGMP (1 mM, je 20 Minuten) verstärkte nicht das Signal der 50 kDa-Bande im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit den jeweiligen Substanzen (Abb. 13). Der gezeigte Blot ist repräsentativ für 5 unabhängige Experimente.

(LW=Leerwert; PDE2-I=PDE2-Inhibitor Byk190954; F=Forskolin)

3.3.3 Inhibition der cAMP-abbauenden PDEs induzierte eine Phosphorylierung von VASP

Die Inhibition der cAMP-abbauenden Isoenzyme PDE3 und PDE4 induzierte einen Shift zu Gunsten der 50 kDa-Bande im Western Blot. Die Inhibition der PDE3 bewirkte dabei nur einen geringen Signalzuwachs, die Inhibition der PDE4 einen deutlichen Signalzuwachs bei 50 kDa. Der Effekt addierte sich bei gleichzeitiger Blockade der beiden Isoenzyme. Wurden beide cAMP-abbauenden Enzyme inhibiert, so entsprach die 50 kDa-Bande in ihrer Intensität etwa der Bande nach Forskolin-Stimulation.

Abbildung 15:

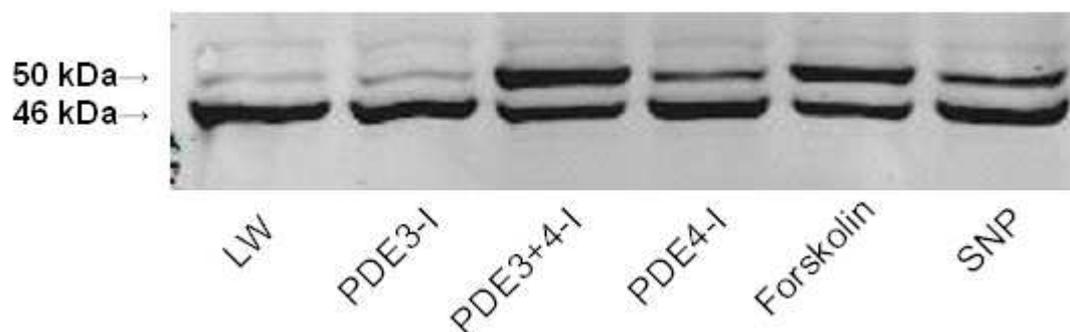


Abb. 15: **Inhibition der cAMP-abbauenden PDEs induzierte einen Anstieg von Serin¹⁵⁷-phospho-VASP.** Die Inhibition der PDE3 in HUVECs mit Motapizon (10 μ M, 20 Minuten) führte zu einem geringen Signalzuwachs im Bereich der 50 kDa-Bande. Die Applikation des PDE4-Inhibitors RP73401 (1 μ M, 20 Minuten) induzierte einen stärkeren Signalzuwachs der 50 kDa-Bande. Wurden sowohl die PDE3 (Motapizon, 10 μ M, 20 Minuten) als auch die PDE4 (RP73401, 1 μ M, 20 Minuten) inhibiert, so resultierte ein ausgeprägter Signalzuwachs im Bereich der 50 kDa-Bande, das Signal entsprach oder überstieg jenes nach Forskolin-Applikation. Der gezeigte Blot ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

(LW=Leerwert; PDE3-I=PDE3-Inhibitor; PDE4-I=PDE4-Inhibitor)

Wurden vor Applikation von Forskolin eine oder beide der cAMP-abbauenden PDEs inhibiert, so resultierte dies in einer sehr stark ausgeprägten 50 kDa-Bande. Gleichzeitig war ein Signalverlust im Bereich der 46 kDa-Bande zu erkennen. Dabei war der Signalzuwachs der 50kDa-Bande nach Inhibition der PDE3 oder PDE4 und anschließender Applikation von Forskolin etwa gleich hoch, er überstieg den Signalzuwachs nach alleiniger Forskolin-Stimulation. Es war eine deutliche Abnahme der Intensität der 46 kDa-Bande zu erkennen. Wurden beide cAMP-abbauenden PDEs inhibiert und anschließend Forskolin appliziert, so resultierte ein maximales Signal im Bereich der 50 kDa-Bande, die 46 kDa-Bande war nur noch schwach ausgeprägt.

Abbildung 16:

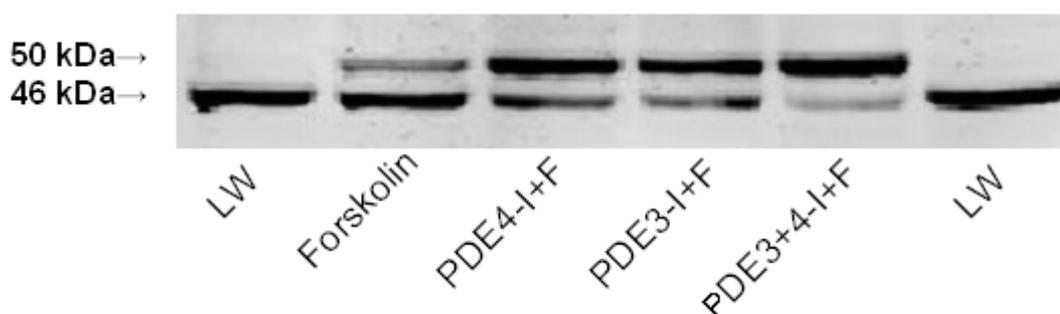


Abb. 16: **Die Inhibition der cAMP-abbauenden PDEs mit anschließender Forskolin-Applikation induzierte einen maximalen Bandenshift von der 46 kDa-Bande zur 50 kDa-Bande.** Wurde 20 Minuten vor Forskolin-Stimulation (1 μ M, 20 Minuten) der PDE3-Inhibitor Motapizon (10 μ M) oder der PDE4-Inhibitor RP73401 (1 μ M) appliziert, so war die Signalzunahme der 50 kDa-Bande, verglichen mit der nach alleiniger Forskolin-Stimulation, verstärkt. Der stärkste Signalzuwachs der 50 kDa-Bande wurde bei der gleichzeitigen Inhibition der PDE3 und PDE4 vor Forskolin-Applikation erzielt. Dabei war die Intensität der 46 kDa-Bande deutlich reduziert. Der gezeigte Blot ist repräsentativ für 5 unabhängige Experimente.

(LW=Leerwert; PDE3-I=PDE3-Inhibitor; PDE4-I=PDE4-Inhibitor; F=Forskolin)

Wurden die Zellen vor SNP-Applikation mit dem PDE3-Inhibitors Motapizon (10 μ M, 20 Minuten) oder dem PDE4-Inhibitors RP73401 (1 μ M, 20 Minuten) inkubiert, so resultierte ein leichter Signalzuwachs der 50 kDa-Bande verglichen mit der alleinigen Stimulation mit den jeweiligen Substanzen. Die Daten sind nicht gezeigt.

3.3.4 Die Inhibition der Proteinkinasen A und G hatte geringe Auswirkungen auf das Phosphorylierungsprofil von VASP

Die Inhibition der PKA oder PKG in HUVECs hatte zunächst keine Veränderung der 50 kDa-Bande im Western Blot zur Folge. Nach Gabe des jeweiligen Inhibitors entsprach das Phosphorylierungsprofil dem des Leerwerts. Die 50 kDa-Bande war nach Inhibition der PKA und nachfolgender Forskolin-Applikation von minimal geringerer Intensität als nach der alleinigen Stimulation mit Forskolin. Wurde die PKG vor SNP-Applikation

inhibiert, so war das 50 kDa-Signal minimal geringer ausgeprägt als nach alleiniger SNP-Stimulation. Wurden sowohl die PKA als auch die PDE2 vor SNP-Applikation inhibiert, entsprach das resultierende Bandenmuster etwa dem nach alleiniger SNP-Applikation. Wurden vor SNP-Stimulation die PKG und die PDE2 inhibiert, so war das Signal der 50 kDa-Bande, verglichen mit dem nach alleiniger SNP-Applikation, reduziert. Das Bandenmuster entsprach etwa dem nach PKG-Inhibitor/SNP-Doppelstimulation.

Abbildung 17:

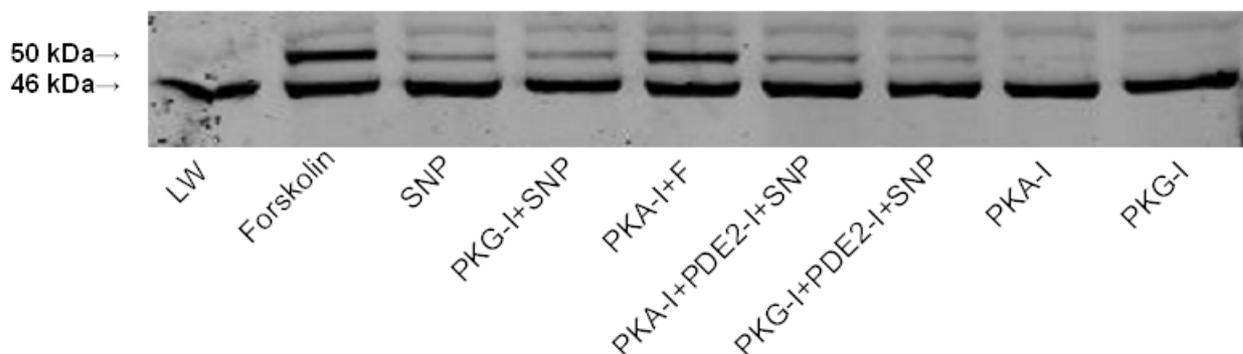


Abb. 17: Die Inhibition der Proteinkinasen A und G hatte geringe Auswirkungen auf das Phosphorylierungsprofil von VASP. Wurden in ruhenden Zellen die Proteinkinasen A oder G inhibiert (je 1 μM , 20 Minuten), so entsprach das Phosphorylierungsprofil von VASP dem Leerwert. Wurde nach 20-minütiger Inkubation mit dem PKA-Inhibitor (1 μM , 20 Minuten) Forskolin (1 μM , 20 Minuten) appliziert, war die 50 kDa-Bande von etwas geringerer Intensität als nach alleiniger Forskolin-Stimulation (1 μM , 20 Minuten). Wurde vor Stimulation mit SNP (10 μM , 20 Minuten) der PKG-Inhibitor (1 μM , 20 Minuten) appliziert, war die 50 kDa-Bande, verglichen mit der nach alleiniger SNP-Stimulation, etwas geringer ausgeprägt. Wurden sowohl die PKA (PKA-Inhibitor, 1 μM , 20 Minuten) als auch die PDE2 inhibiert (Byk190954 1 μM , 20 Minuten) und anschließend SNP (10 μM , 20 Minuten) appliziert, so entsprach das Bandenmuster dem nach alleiniger SNP-Stimulation. Wurden dagegen die PKG (PKG-Inhibitor, 1 μM , 20 Minuten) und die PDE2 inhibiert (Byk190954 1 μM , 20 Minuten), so resultierte die nachfolgende Stimulation mit SNP in einem Bandenmuster entsprechend dem nach PKG-Inhibitor/SNP-Doppelstimulation. Der gezeigte Blot ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

(LW=Leerwert; PDE2-I=PDE2-Inhibitor Byk190954; PKA-I=PKA-Inhibitor; PKG-I=PKG-Inhibitor; F=Forskolin)

Wurde vor SNP-Applikation die PKA beziehungsweise vor Forskolin-Applikation die PKG inhibiert, so entsprach das entstandene Bandenmuster dem nach alleiniger Stimulation mit SNP oder Forskolin (Daten nicht gezeigt).

4 Diskussion

In den durchgeführten Versuchen hatte eine Erhöhung der intrazellulären cAMP- und cGMP-Spiegel in HUVECs eine Stabilisierung der endothelialen Barriere hinsichtlich der Thrombin-induzierten Hyperpermeabilität, eine Alteration des Aktinzytoskeletts sowie eine Phosphorylierung von VASP an Serin¹⁵⁷ zur Folge.

4.1 Erhöhte cAMP- und cGMP-Spiegel reduzieren die Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität in HUVECs

Sowohl cAMP als auch cGMP vermochten die Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität, in unterschiedlichem Ausmass, zu reduzieren.

4.1.1 cAMP reduziert Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit hatte die Applikation des Adenylylzyklase-Aktivators Forskolin zunächst keine Veränderung der Filtrationsrate ruhender endothelialer Monolayer zur Folge. Bei nachfolgender Stimulation mit Thrombin war die induzierte Hyperpermeabilität auf etwa ein Achtel reduziert und in ihrer Dauer verkürzt.

Diese Beobachtung entspricht dem in der Literatur postulierten stabilisierenden Effekt von cAMP auf die endotheliale Barriere (Comerford, 2002; Hippenstiel, 2002; van Nieuw Amerongen, 2002; Bunday, 2006). cAMP reduziert die durch diverse Stimulantien (Thrombin, H₂O₂, Bakterientoxine) ausgelöste endotheliale Hyperpermeabilität (Suttorp (1), 1996; Ikeda, 1999; Comerford, 2002; Hippenstiel, 2002; van Nieuw Amerongen, 2002).

Über welche Mechanismen oder Signalwege cAMP die endotheliale Barriere stabilisiert, ist nicht abschließend geklärt (van Nieuw Amerongen, 2002). Diskutiert wird eine cAMP-abhängige Aktivierung der PKA, welche wiederum Schlüsselproteine des Zytoskeletts sowie der Zell-Kontakte phosphoryliert (Comerford, 2002). VASP ist eines der Zielproteine der PKA, es ist im Bereich der Adherens Junctions und der Focal Adhesions lokalisiert und beeinflusst die Barrierefunktion des Endothels (Comerford, 2002).

4.1.2 Einfluss von cGMP auf Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität

In den Versuchen zur Messung der hydraulischen Konduktivität induzierte die Stimulation der Endothelzellen mit cGMP-erhöhenden Substanzen (SNP, PDE2-Inhibitor Byk190954) keine Veränderung der basalen endothelialen Permeabilität. Nach

Vorinkubation mit Byk190954 oder SNP war die Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität jeweils auf etwa ein Viertel der Positivkontrolle reduziert, wobei der PDE2-Inhibitor dem NO-Donator überlegen war. Wurden die Endothelzellen sowohl mit Byk190954 als auch mit SNP vorinkubiert, so war die Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität auf gut ein Drittel reduziert. Ob die Doppelstimulation, verglichen mit den Einzelstimulationen, in einem weiteren Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration resultierte, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Die Ergebnisse legen jedoch die Überlegung nahe, dass cGMP zunächst einen protektiven Effekt auf die endotheliale Barriere ausübt, welcher ab einer bestimmten Konzentration, zumindest teilweise, wieder aufgehoben wird.

Es gibt Untersuchungen, welche darauf hindeuten, dass cGMP dosisabhängig die Barrierefunktion des Endothels reduziert (Varma, 2002; van Nieuw Amerongen, 2003; Chong, 2005; Surapisitchat, 2007). So stabilisierten erhöhte cGMP-Spiegel zunächst die endotheliale Barriere gegenüber Hyperpermeabilität-induzierenden Substanzen, ab einem Schwellenwert induzierte cGMP jedoch eine erhöhte endotheliale Permeabilität (Surapisitchat, 2007). Ursächlich wird bei niedrigen cGMP-Spiegeln eine PDE3A-Inhibition (die PDE3 ist definiert als cGMP-inhibierte cAMP-hydrolysierende PDE) mit konsekutiv erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegeln diskutiert, welche bei erhöhten cGMP-Spiegeln durch die hierdurch induzierte PDE2A-Aktivierung wieder umgekehrt wird (Surapisitchat, 2007). Diese Ergebnisse wurden durch Versuche an Endothelzellen der Mesenterien der Ratte und an HUVECs ermittelt (Surapisitchat, 2007).

Suttorp *et al.* wiesen jedoch keine erhöhte cAMP-Konzentration nach cGMP-erhöhenden Maßnahmen (SNP und der PDE2-Inhibitor EHNA) in Schweineendothelien nach, hier hatte die SNP-Applikation bei gleichzeitiger PDE2-Inhibition einen additiven Effekt bezüglich der Reduktion der H₂O₂-induzierten Hyperpermeabilität (Suttorp (2), 1996).

Andere Untersuchungen zeigten wiederum eine cGMP-abhängige Erhöhung der endothelialen Permeabilität ohne Schwellenwert an mesenterialen Venulen der Ratte (Chong, 2005).

Ein weiterer Hinweis auf einen Schwellenwert von cGMP bezüglich seiner Protektivität auf die endotheliale Permeabilität ergibt sich aus folgendem Zusammenhang: Die intrazellulären cGMP-Spiegel steigen unter anderem in Folge einer ansteigenden NO-Konzentration bei erhöhter NO-Synthetase-Aktivität (Förstermann, 1986; Moncada, 1989; Busse, 1990). Hohe NO-Konzentrationen steigern die Permeabilität, jedoch

scheinen nur leicht erhöhte NO-Konzentrationen anti-entzündlich zu wirken (Meyer, 1992). Diese Effekte könnten über die intrazelluläre cGMP-Konzentration vermittelt werden. Allerdings scheint die stabilisierende Wirkung geringer NO-Konzentrationen, zumindest teilweise, durch ein Abfangen freier Radikale bedingt zu sein (Meyer, 1992). Zusammenfassend wird der Einfluss von cGMP auf endotheliale Permeabilität kontrovers diskutiert. Die Wirkung von cGMP scheint abhängig von der untersuchten Gefäßprovinz und Spezies zu sein (Suttorp, 1993; Suttorp (2), 1996; Hippenstiel, 2002; van Nieuw Amerongen, 2002; Chong, 2005; Seybold, 2005; Surapisitchat, 2007). Die im Rahmen der vorgelegten Arbeit ermittelten Ergebnisse weisen außerdem auf einen Schwellenwert von cGMP bezüglich der Regulation der endothelialen Barriere hin. Diese These muss durch Konzentrationsbestimmungen von cGMP weiter untersucht werden. Auf Grund der in der Literatur beschriebenen widersprüchlichen Daten ist es wahrscheinlich, dass cGMP in unterschiedlichen Zelltypen verschiedene Effekte auf die Permeabilität ausübt .

In den durchgeführten Versuchen hatte die alleinige Erhöhung der intrazellulären cAMP- oder cGMP-Spiegel jeweils keine Veränderung der basalen endothelialen Permeabilität im gewählten Untersuchungsmodell zur Folge. Zyklische Nukleotide scheinen jedoch die Endothelzellschicht gegenüber Hyperpermeabilität-auslösenden Agenzien zu stabilisieren (Hippenstiel, 2002). Die Reduktion der Thrombin-induzierten Hyperpermeabilität war nach Applikation von cAMP-erhöhenden Maßnahmen generell stärker ausgeprägt als nach Applikation von cGMP-erhöhenden Maßnahmen. Dies lässt sich als Hinweis dafür deuten, dass cAMP hinsichtlich seines protektiven Effekts auf die Integrität des Endothelzellverbandes cGMP überlegen ist.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Untersuchungen von Draijer *et al.*, in denen keine PKG in HUVECs nachgewiesen werden konnte und die Applikation eines cGMP-Analogons keinen Einfluss auf die Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität hatte (Draijer, 1995). Draijer *et al.* beschrieben jedoch eine PKG-Aktivität in humanen Endothelzellen anderen Ursprungs (Aorta, Arteria iliaca und Gefäße der Vorhaut). Hier konnte die Applikation eines cGMP-Analogons die Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität um etwa die Hälfte reduzieren (Draijer, 1995). Im Rahmen dieser Arbeit hatte die Inkubation mit cGMP-erhöhenden Substanzen zuverlässig eine Reduktion der Thrombin-induzierten Hyperpermeabilität zur Folge; cGMP erzielte in den verwendeten HUVECs eine zellbiologische Wirkung. Ob diese über die PKG vermittelt

wurde, ist nicht abschließend geklärt. Ob cGMP seine Wirksamkeit bezüglich der endothelialen Permeabilität, zumindest teilweise, auch über eine veränderte Signaltransduktion, die Aktivierung von Ionenkanälen oder Andere entfaltet, bleibt zu untersuchen (Suttorp (2), 1996).

4.2 Erhöhte intrazelluläre Nukleotidspiegel alterieren das Aktin-Zytoskelett in HUVECs

Die im Rahmen der vorgelegten Arbeit durchgeführte Stimulation konfluenter Endothelzellen mit Thrombin induzierte eine deutliche Zunahme an Stressfasern. Das DPB war schwer oder gar nicht abzugrenzen. Die Endothelzellen retrahierten sich und es waren große interzelluläre Lücken entlang aller Zellgrenzen zu erkennen. Diese typischen Thrombin-induzierten Veränderungen der Zellmorphologie (Garcia (1), 1995; Suttorp (1), 1996; Carbajal, 2000; Bogatcheva, 2002) waren zuverlässig reproduzierbar. Dabei ist zu beachten, dass in den Versuchen zur Messung der hydraulischen Konduktivität die maximale Permeabilität etwa 10 Minuten nach Thrombin-Stimulation erreicht war. Die Immunfluoreszenzbilder wurden aus technischen Gründen nach einer Thrombin-Stimulation von 15 Minuten durchgeführt, zu diesem Zeitpunkt war die hydraulische Konduktivität schon wieder rückläufig.

4.2.1 cAMP-erhöhende Maßnahmen stabilisieren das Aktin-Zytoskelett

In den Immunfluoreszenzversuchen beeinflusste die Erhöhung des cAMP-Spiegels die Morphologie des Zytoskeletts. Die Stimulation mit Forskolin induzierte eine Reduktion der Stressfasern sowie eine Verdichtung des DPB verglichen mit unstimulierten Zellen. Den Stressfasern wird eine Rolle bei der aktiven Kontraktion kontraktiler Zellen zugesprochen, ihre Abnahme könnte auf eine reduzierte Fähigkeit der Zellen zur Kontraktion hinweisen (Wong, 1986; Bussolino, 1987; Ehringer, 1999; Lee, 2003). Das DPB scheint für den Erhalt, die Lokalisation und die Funktion von Zell-Zell-Kontakten notwendig zu sein und die an der Formierung dieser Kontakte beteiligten Proteine mit dem Zytoskelett zu verankern (Wong, 1986; Dudek, 2001; Lee, 2003; Lee, 2005).

Die gleiche Dosis Forskolin induzierte in den Versuchen zur Messung der hydraulischen Konduktivität keine Veränderung der basalen Filtrationsrate. Hippenstiel *et al.* zeigten, dass ein Adrenomedullin-induzierter Anstieg der cAMP-Konzentration in HUVECs ebenfalls eine verminderte Ausbildung an Stressfasern und ein gut abgrenzbares DPB zur Folge hatte (Hippenstiel, 2002). Auch bei Hippenstiel *et al.* induzierte die

entsprechende Stimulation keine signifikante Veränderung der basalen Filtrationsrate gesealter Monolayer (Hippenstiel, 2002).

In den vorgestellten Versuchen reduzierte die Vorinkubation mit cAMP-erhöhenden Substanzen die durch Thrombin typischerweise induzierten morphologischen Veränderungen der Endothelzellen (Garcia (1), 1995). Das Zellbild der mit Forskolin oder Zardaverin (PDE3+PDE4-Inhibitor) und Thrombin stimulierten Zellen war im Vergleich zu ruhenden Zellen etwas unruhiger mit einer Zunahme an Stressfasern. Die Integrität des Zellverbandes blieb jedoch erhalten, das DPB war weiterhin gut zu diskriminieren und die Zahl und Größe der interzellulären Lücken blieben vergleichsweise gering. Die dezente Ausbildung von interzellulären Lücken könnte das morphologische Korrelat der geringen und temporären Erhöhung der hydraulischen Konduktivität nach vergleichbarer Stimulation sein. Entsprechende Beobachtungen machten Hippenstiel *et al.* nach Vorstimulation mit Adrenomedullin vor Thrombin-Applikation (Hippenstiel, 2002).

Die durch cAMP-erhöhende Maßnahmen induzierten Veränderungen der Aktinverteilung mit Abnahme an Stressfasern und Zunahme im Bereich des DPB weisen darauf hin, dass die Integrität der Zelle im Verband gefestigt und die Bereitschaft der Zelle zur Kontraktion vermindert wird (Wong, 1986; Bussolino, 1987; Ehringer, 1999; Dudek, 2001; Lee, 2003; Lee, 2005). Diese Veränderungen der Aktinverteilung könnten, zumindest teilweise, den protektiven Effekt von cAMP auf die Integrität von Endothelzellverbänden vermitteln (Ikeda, 1999; Comerford, 2002; Hippenstiel, 2002; Bunday, 2006).

Ob die morphologischen Veränderungen nach cAMP-erhöhenden Maßnahmen auf der Basis von Abbau und Neusynthese und/oder Umverteilung schon bestehender Aktinfilamente resultierten, wurde nicht im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

4.2.2 Veränderungen des Zytoskeletts nach cGMP-erhöhenden Maßnahmen

In den durchgeführten Versuchen induzierte die Applikation von cGMP-erhöhenden Substanzen morphologische Veränderungen des Aktinzytoskeletts in HUVECs. Das DPB erschien nach Stimulation mit SNP, Byk190954 oder 8br-cGMP prominenter als bei den Kontrollen. Stressfasern waren in den verschiedenen Stimulationsreihen etwas unterschiedlich stark ausgeprägt. Womit diese unterschiedliche, jedoch generell geringe Ausprägung an Stressfasern zusammenhängt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden. Möglich ist, dass die verschiedenen Substanzen unterschiedliche

intrazelluläre cGMP-Spiegel induzierten und die Höhe der cGMP-Konzentration in Zusammenhang mit der Zellantwort steht. So hatte eine Stimulation mit sowohl Byk190954 als auch SNP eine Zunahme an Stressfasern sowie des DPB zur Folge, die Stressfasern waren prominent, das DPB diffus verbreitert und es waren vereinzelt interzelluläre Lücken zu erkennen. cGMP scheint demnach ab einer bestimmten Konzentration vermehrt Stressfasern zu induzieren und die Kontraktionsbereitschaft der Zellen dadurch zu erhöhen. Der cGMP-Spiegel wurde in den verwendeten HUVECs allerdings nicht bestimmt, diese These sollte mit Hilfe weiterführender Versuche überprüft werden.

Alle durchgeführten Maßnahmen zur Erhöhung der zytosolischen cGMP-Spiegel verhinderten eine Retraktion der Zellen bei nachfolgender Stimulation mit Thrombin.

Die Vorinkubation mit Byk190954, SNP oder 8br-cGMP reduzierte die Thrombin-induzierte Zellantwort deutlich. Es traten zwar vermehrt Stressfasern und interendotheliale Lücken auf, aber eine Retraktion der Zellen blieb aus und die Integrität des Zellverbandes erhalten. Die morphologischen Veränderungen der HUVECs nach Applikation von sowohl Byk190954 als auch SNP und anschließender Thrombin-Stimulation waren deutlicher ausgeprägt, es fanden sich viele Stressfasern und große interzelluläre Lücken. Dies scheint erneut dafür zu sprechen, dass cGMP zunächst einen stabilisierenden Effekt auf den Endothelzellverband vermittelt, ab einem Schwellenwert die Kontraktionsbereitschaft der Zellen aber wieder zunimmt (Varma, 2002; van Nieuw Amerongen, 2003; Chong, 2005; Surapisitchat, 2007). Es ist denkbar, dass cGMP über eine Verdichtung des DPB die Endothelzellschicht stabilisiert. Gleichzeitig könnte cGMP ab einer gewissen Konzentration die Ausbildung von Stressfasern induzieren. Überwiegt letzteres, so überwiegen, entsprechend dem Tensegrity Modell, die zentripetal gerichteten Kräfte. Es kommt zur Retraktion der Zellen mit interzellulärer Lückenbildung (Ingber, 1993; Ingber, 1997).

Die morphologischen Veränderungen lassen sich mit den Permeabilitätsmessungen entsprechender Stimulationsreihen vereinbaren. So bewirkte die Vorstimulation mit sowohl Byk190954 als auch SNP die geringste Reduktion der Thrombin-induzierten Hyperpermeabilität in den Versuchen zur hydraulischen Konduktivität.

4.3 Erhöhte cAMP- und cGMP-Spiegel verändern das Phosphorylierungsprofil von VASP

In ruhenden, unstimulierten Zellen liegt >95 % von VASP in an Serin¹⁵⁷ unphosphorylierter Form vor (Comerford 2002).

Die Phosphorylierung von VASP an Serin¹⁵⁷ führt zu einer Verschiebung der Molekularmasse in der SDS-Page von 46 kDa zu 50 kDa (Butt, 1994; Halbrügge, 1989; Smolenski, 1998; Harbeck, 2000; Comerford, 2002). Verlängerte Phosphorylierungszeiten ergaben keine zusätzliche Gewichtszunahme von VASP in der SDS-Page, obwohl vermehrt Phosphat aufgenommen wurde (Harbeck, 2000).

In den durchgeführten Versuchen induzierte Thrombin eine geringe Phosphorylierung von VASP an Serin¹⁵⁷ in HUVECs.

4.3.1 cAMP-erhöhende Maßnahmen induzieren eine VASP-Phosphorylierung an Serin¹⁵⁷ in HUVECs

Alle verwendeten cAMP-erhöhenden Maßnahmen (Aktivierung der Adenylzyklase und Inhibition der cAMP-abbauenden Enzyme PDE3 und PDE4) führten zu einer deutlichen Signalzunahme der 50 kDa-Proteinbande im Western Blot. Dies entspricht der Phosphorylierung von VASP an Serin¹⁵⁷ (Butt, 1994; Bachmann, 1999; Comerford, 2002). Eine Stimulation der Endothelzellen mit Forskolin bei gleichzeitiger Blockade der PDE3 und/oder PDE4 hatte bezüglich der Phosphorylierung von VASP an Serin¹⁵⁷ einen additiven Effekt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die cAMP-Konzentration positiv mit der Phosphorylierung von VASP an Serin¹⁵⁷ korreliert und dass cAMP in hohen Konzentrationen in der Lage ist, VASP vollständig an Serin¹⁵⁷ zu phosphorylieren. Entsprechende Versuche zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Spiegel wurden nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Die in der Literatur vielfach postulierte PKA-Abhängigkeit der cAMP-vermittelten Phosphorylierung von VASP an Serin¹⁵⁷ (Halbrügge, 1990; Butt, 1994; Bachmann, 1999; Comerford, 2002) konnte im Rahmen dieser Arbeit nur bedingt nachvollzogen werden. In den durchgeführten Versuchen hatte die Inhibition der PKA vor Forskolin-Applikation, verglichen mit alleiniger Forskolin-Stimulation, nur eine minimale Reduktion der 50 kDa-Bande im Western Blot zur Folge. Es wäre zu erwarten gewesen, dass die Inhibition der PKA vor Forskolin-Applikation die VASP-Phosphorylierung verhindert.

Aszódi *et al.* wiesen in VASP-knock-out-Mäusen PKA-assoziierte Plättchenaggregationsstörungen nach. Auch dies ist so zu interpretieren, dass VASP

ein Substrat der PKA ist (Aszódi, 1999). Es sollten weitere Versuche zur Aktivitätsbestimmung der PKA in HUVECs erfolgen, um bestehende Diskrepanzen zu klären.

4.3.2 cGMP erhöht den Anteil von an Serin¹⁵⁷ phosphoriliertem VASP in HUVECs

In den hier dargestellten Versuchen war eine cGMP-induzierte Phosphorylierung von VASP an Serin¹⁵⁷ zu beobachten. Serin¹⁵⁷ ist jedoch nicht die bevorzugte Phosphorylierungsstelle von VASP für cGMP-abhängige Proteinkinasen (Harbeck, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit waren die cGMP-erhöhenden Maßnahmen den cAMP-erhöhenden Maßnahmen diesbezüglich unterlegen.

So entsprach bei Smolenski *et al.* die maximale SNP-induzierte Phosphorylierung von Serin¹⁵⁷ in humanen Thrombozyten nur etwa 50% der durch cAMP-Applikation induzierten Phosphorylierung dieser Aminosäure (Smolenski, 1998). Diese Dynamik ist vergleichbar mit den im Rahmen dieser Arbeit in HUVECs erhobenen Ergebnissen.

Auf der anderen Seite induzierte bei Draijer *et al.* die Applikation eines cGMP-Analogons keine Phosphorylierung von VASP in HUVECs (Draijer, 1995). Draijer *et al.* konnten keine PKG in HUVECs nachweisen (Draijer, 1995). Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde die PKG-Aktivität in den verwendeten HUVECs nicht bestimmt. Die Applikation von cGMP-erhöhenden Substanzen induzierte aber auch in dieser Versuchsreihe eine reproduzierbare zellbiologische Antwort der verwendeten Endothelzellen.

Im Western Blot führte die PKG-Inhibition vor Exposition gegenüber SNP nur zu einer minimalen Verringerung des 50 kDa-Signals verglichen mit der alleinigen SNP-Stimulation. Der in der Literatur beschriebene Weg der VASP-Phosphorylierung durch erhöhte cGMP-Spiegel läuft jedoch über die PKG, so dass eine PKG-Inhibition die cGMP-abhängige VASP-Phosphorylierung verhindern sollte (Halbrügge, 1990; Smolenski, 1998; Harbeck, 2000). Es ist denkbar, dass die cGMP-induzierte VASP-Phosphorylierung über eine Inhibition der PDE3 (per Definition eine cGMP-inhibierte cAMP-hydrolysierende PDE) und somit über cAMP läuft. Jedoch wiesen Suttorp *et al.* in ihren Endothelzellen nach cGMP-erhöhenden Maßnahmen, wie zum Beispiel der Applikation von SNP, keine erhöhten cAMP-Spiegel nach (Suttorp (2), 1996).

Die Beobachtung, dass in den durchgeführten Versuchen VASP trotz PKA-Inhibition cAMP-abhängig beziehungsweise trotz PKG-Inhibition cGMP-abhängig phosphoryliert

wurde, führt zu folgender Überlegung: Lassen sich systematische Fehler hinsichtlich der Untersuchungsmethode oder der Inhibitoren ausschließen, ist eine PKA-beziehungsweise PKG-unabhängige Phosphorylierung von VASP, welche dennoch durch zyklische Nucleotide induziert wird, in Betracht zu ziehen. Ein Versagen des Inhibitors konnte durch weitere Versuchsreihen (ELISA, Western Blot), welche im Rahmen anderer Arbeiten durchgeführt wurden, weitestgehend ausgeschlossen werden. Hier wurden in der Literatur beschriebene Effekte einer PKA-beziehungsweise PKG-Inhibition aus derselben Charge zuverlässig reproduziert. Dass cAMP die PKG und umgekehrt cGMP die PKA in mehr als nur geringem Maße aktiviert, ist nicht wahrscheinlich. Es konnte gezeigt werden, dass die cGMP-abhängige Phosphorylierung von VASP nicht über die PKA vermittelt wird (Draijer, 1995; Smolenski, 2000).

Letztlich ist bei dem derzeitigen Stand der Untersuchungen die Ursache der divergierenden Ergebnisse unklar.

4.4 Einfluss der VASP-Phosphorylierung auf die Stabilisierung der endothelialen Barriere

Die spezifischen Beziehungen zwischen VASP und dem Aktinzytoskelett sind noch nicht vollständig aufgeklärt, insbesondere hinsichtlich der VASP-Phosphorylierung sind noch viele Fragen offen. VASP wird eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zytoskeletts und somit der Zellform und -funktion zugesprochen (Harbeck, 2000; Comerford, 2002).

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen war zu beobachten, dass cAMP-beziehungsweise cGMP-erhöhende Maßnahmen in HUVECs eine vermehrte Phosphorylierung von VASP, eine Alteration des Aktinzytoskeletts, sowie eine Stabilisierung des Zellverbandes hinsichtlich Thrombin-induzierter Hyperpermeabilität induzierten. Diese Auswirkungen der zyklischen Nucleotide könnten in einem kausalen Zusammenhang stehen. So beschrieben Comerford *et al.* einen direkten Zusammenhang zwischen einer cAMP-abhängigen Phosphorylierung an Serin¹⁵⁷ von VASP und einer Entspannung des Zytoskeletts mit reduzierter endothelialer Permeabilität (Comerford, 2002).

VASP ist lokalisiert an Orten der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte sowie im Bereich der Stressfasern (Smolenski, 1998; Comerford, 2002). Die Interaktion von VASP mit seinen Liganden Profilin, Vinculin und Zyxin zeigte sich bei Harbeck *et al.* unabhängig von seinem Phosphorylierungsstatus (Harbeck, 2000).

Auf der anderen Seite demonstrierten Smolenski *et al.*, dass die Phosphorylierung von VASP dessen Dissoziation von den Orten der Zell-Zell-Kontakte zur Folge hatte. Dafür erschien es notwendig, dass alle 3 Phosphorylierungsstellen besetzt waren (Smolenski, 2000). Umgekehrt könnte ein Abfall der cAMP-Konzentration, und damit der PKA-Aktivität, die Ausbildung von Adhensionskomplexen und deren Verankerung mit Stressfasern induzieren (Bogatcheva, 2002).

Unabhängig vom Phosphorylierungsstatus war die Bindung von Profilin-G-Aktin-Komplexen an VASP (Harbeck, 2000). Loureiro *et al.* vermuteten, dass die Phosphorylierung der Ena/VASP-Proteine die Aktivität der EVH2-Domäne blockiert, die anderen beiden Domänen aber nicht beeinträchtigt (Loureiro, 2002). VASP könnte sich demnach unabhängig von seinem Phosphorylierungsstatus durch Bindung an seine Liganden an Orten der Zelladhäsion und erhöhter Aktinaktivität lokalisieren und Profilin-G-Aktin-Komplexe bereithalten (Kwiatkowski, 2003).

Aszódi *et al.* fanden in VASP-knock-out Mäusen Hinweise darauf, dass VASP eine grundlegende Rolle bei der Inhibition der Aktinpolymerisation in Thrombozyten und damit bei der Thrombozytenaggregation zukommt. Die Thrombozytenaggregation wurde durch die Phosphorylierung von VASP noch stärker inhibiert, was ebenfalls auf eine Funktionseinschränkung der EVH2-Domäne hinweist (Aszódi, 1999).

VASP stabilisierte in den von Kwiatkowski *et al.* durchgeführten Versuchen eigenständig neu synthetisierte Aktinfilamente beziehungsweise medierte die Aktinsynthese über das G-Aktin bindende Protein Profilin (Kwiatkowski, 2003). Die Phosphorylierung von VASP hatte die verminderte Bindung seiner EVH2-Domäne an G-Aktin zur Folge und inhibierte seine Fähigkeit zur Aktinnukleation (Harbeck, 2000; Walders-Harbeck, 2002). Die VASP-abhängige Aktinpolymerisation wurde umgekehrt durch seine Dephosphorylierung induziert (Harbeck, 2000). Durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von VASP scheint die Aktinpolymerisation regulatorisch beeinflusst zu werden (Harbeck, 2000; Loureiro, 2002). Auch hatte die Phosphorylierung von VASP eine verminderte Aktin-Bündelung zur Folge (Harbeck, 2000).

Dies führt zu der Überlegung, dass die Phosphorylierung von VASP die Neubildung von Aktinfilamenten hemmt und somit, auch in Belastungssituationen, die Anzahl kontraktile Filamente gering hält (Loureiro, 2002).

Umgekehrt könnte VASP, als struktureller und funktioneller Bestandteil des Zytoskeletts, in seiner unphosphorylierten Form für den Erhalt eines parazellulären Flüssigkeits- und Stoffaustauschs mitverantwortlich sein (Comerford, 2002).

Da sich VASP nicht im Bereich des DPB anreichert, scheint die cAMP- und cGMP-induzierte Verdichtung des DPB nicht VASP-abhängig zu sein. Über welche Mechanismen die zyklischen Nukleotide die Ausbildung des DPB verstärken, ist bisher nicht bekannt.

In der vorgelegten Arbeit wurde nur die Phosphorylierung von VASP an Serin¹⁵⁷ untersucht. Eine Funktionsveränderung von VASP durch Phosphorylierung seiner anderen beiden Phosphorylierungsstellen ist jedoch wahrscheinlich (Harbeck, 2000). So zeigten Harbeck *et al.*, dass die Phosphorylierung von murinem VASP an Serin²³⁵ (entspricht Serin²³⁹ in humanem VASP) eine stärkere Reduktion der Aktinnukleation zur Folge hatte als seine Phosphorylierung an Serin¹⁵³ (entspricht Serin¹⁵⁷ in humanem VASP; Harbeck, 2000). Auch war in murinen Zellen die Bündelung der Aktinfasern nach zusätzlicher Phosphorylierung von Serin²³⁵ weit stärker reduziert als nach alleiniger Serin¹⁵³-Phosphorylierung (Harbeck, 2000). Eine erhöhte cAMP-Konzentration bewirkte dabei zunächst eine Phosphorylierung an Serin¹⁵³, erst längere Phosphorylierungszeiten bewirkten eine Phosphorylierung der anderen beiden Phosphorylierungsstellen an murinem VASP (Harbeck, 2000).

Auf der anderen Seite identifizierten Loureiro *et al.* die N-terminale Phosphorylierungsstelle von Mena als den Hauptort der Regulation durch Phosphorylierung in Fibroblasten, welche in VASP Serin¹⁵⁷ entspricht (Loureiro, 2002).

Es sollten weiterführende Versuche erfolgen, in denen die Phosphorylierung von VASP an Serin²³⁹ und Threonin²⁷⁸ bei der Beurteilung der Zellfunktion berücksichtigt wird.

Ob cAMP über einen alternativen, PKA-unabhängigen Weg in der Lage ist, in humanen Endothelzellen VASP an Serin¹⁵⁷ zu phosphorylieren, muss ebenfalls noch untersucht werden. So beschrieben Chitaley *et al.* eine PKA- und PKG-unabhängige, jedoch PKC-abhängige Phosphorylierung von VASP an Serin¹⁵⁷ in vaskulären glatten Muskelzellen (Chitaley; 2004). Entsprechende Versuche mit einer Inhibition der Proteinkinase C wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Zu beachten ist, dass Thrombin über verschiedene intrazelluläre Signalwege endotheliale Hyperpermeabilität induziert. cAMP ist in der Lage, in diese und andere Signalwege regulierend einzugreifen, und somit die Thrombin-induzierte Permeabilität auf verschiedenen Ebenen zu reduzieren.

Unter anderem induziert Thrombin die Dissoziation der Catenine weg von den Zell-Zell-Kontakt-vermittelnden Cadherinen und erhöht auf diese Weise die parazelluläre Permeabilität (Bogatcheva, 2002). Eine Erhöhung der cAMP-Konzentration reduzierte die Thrombin-vermittelte Umverteilung der Catenine weg von den Adherens Junctions und stabilisierte somit die Endothelbarriere. Umgekehrt führte eine Blockade der PKA auch ohne Thrombin-Stimulation zu einer Dissoziation der Catenine weg von den Adherens Junctions und somit zu einer Erhöhung der endothelialen Permeabilität (Bogatcheva, 2002).

Die cAMP-abhängige Stabilisierung der Zellintegrität wird außerdem über eine Beeinflussung der Myosin-Leichtkette (MLC) vermittelt. Forskolin und verschiedene cAMP-Analoga konnten die Thrombin-induzierte Phosphorylierung der MLC verhindern (Garcia (3), 1995). Dies reduzierte ebenfalls die Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität (Garcia (3), 1995).

Die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) wird cAMP-abhängig phosphoryliert. Die Kinaseaktivität der MLCK wird durch ihre Phosphorylierung reduziert (Lum, 1994, Garcia, 1997). Dies hat eine verminderte Phosphorylierung der MLC zur Folge, welche konsekutiv in ihrer nicht-kontraktilen Form vorliegt.

Des Weiteren besteht ein Zusammenhang zwischen erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegeln und der Inhibition von Rho (Essler, 2000; Qiao, 2003). Rho führt über Rho-Kinase sowohl durch direkte Phosphorylierung der MLC als auch durch Hemmung der Myosin-Leichtketten-Phosphatase zu einem Anstieg von phosphorylierter MLC. Eine Inhibition von Rho hätte somit ebenfalls eine reduzierte Anzahl kontraktionsfähiger Proteine zur Folge. So kann cAMP direkt oder indirekt über Rho durch Beeinflussung der MLC seinen protektiven Effekt hinsichtlich der endothelialen Permeabilität entfalten. Bei Hippenstiel *et al.* hatte eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration in HUVECs nach Adrenomedullin-Stimulation eine verminderte MLC-Phosphorylierung zur Folge, dies ging mit einer Stabilisierung der Endothelzellschicht einher (Hippenstiel, 2002).

Hippenstiel *et al.* zeigten, dass eine Inhibition der Rho-Proteine RhoA, Rac und Cdc42 in Schweineendothelien ein Versagen der Barrierschicht bewirkte (Hippenstiel, 1997). Die alleinige Inaktivierung von RhoA scheint jedoch die Barrierefunktion zu verbessern (van Nieuw Amerongen, 2000).

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass das Rho-Protein Rac-1 für den Erhalt der endothelialen Barrierefunktion einiger Zelllinien eine Rolle spielt (Waschke, 2006;

Baumer, 2008; Schlegel, 2008). Es scheint, dass cAMP PKA-abhängig in den Rac-1 Signalweg eingreift und dass erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel eine Inaktivierung von Rac-1, zum Beispiel durch *Clostridium sordellii* Letales Toxin, verhindert (Waschke, 2004). Jedoch zeigten van Nieuw Amerongen *et al.* dass die Aktivität von Rac in HUVECs nicht durch eine Thrombin-Stimulation beeinflusst wurde (van Nieuw Amerongen, 2000).

Zu welchen Anteilen cAMP die Endothelbarriere über eine Phosphorylierung von VASP, eine direkte Festigung der Adherens Junctions, eine Beeinflussung der Rho-Proteine oder andere Effektoren gegenüber Thrombin oder anderen Stimulantien stabilisiert, ist bislang nicht geklärt.

Die verschiedenen Mechanismen und Signalwege schließen sich jedoch nicht gegenseitig aus. Im Gegenteil ist es wahrscheinlich, dass die oben diskutierten Wirkungsweisen neben anderen, zum Teil noch unerforschten Mechanismen, Teile eines komplexen Regulationssystems sind. Auf diese Weise ist eine feingradige Regulation der endothelialen Permeabilität möglich und ein Funktionieren dieses für den Gesamtorganismus so wichtigen Zelltyps auch in Situationen veränderter Belastung gewährleistet (van Nieuw Amerongen, 2002).

4.5 Fazit

Die durchgeführten Versuche weisen auf einen Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung von VASP, morphologischen Veränderungen des Zytoskeletts und der funktionellen Dichtigkeit der endothelialen Barriere sowie ihrer Beeinflussbarkeit durch zyklische Nukleotide hin.

Ob die beobachteten Auswirkungen zyklischer Nukleotide in einem kausalen Zusammenhang stehen oder Effekte sich überschneidender Signalwege sind, bleibt noch zu untersuchen.

In allen präsentierten Versuchsreihen war cAMP cGMP bezüglich der untersuchten Merkmale überlegen. In den Versuchen zur Messung der hydraulischen Konduktivität hatte cAMP verglichen mit cGMP eine stärkere Reduktion der Thrombin-induzierten Hyperpermeabilität zur Folge. In den Immunfluoreszenzbildern zeigte sich nach cAMP-erhöhenden Maßnahmen eine ausgeprägtere Verdichtung des DPB, eine stärkere Abnahme an Stressfasern sowie eine geringere Thrombin-induzierte Retraktion der Zellen als nach cGMP-erhöhenden Maßnahmen. Im Western Blot induzierte cAMP eine stärkere Phosphorylierung von VASP als cGMP.

Die Konzentration der PKG in HUVECs ist sehr gering, die Konzentration der PKA ist dagegen relativ hoch. Daher bleibt die Überlegung, ob die cGMP-vermittelte Wirkung auf Grund der niedrigen PKG-Konzentration geringer ist als die cAMP-vermittelte Wirkung.

Schwierig sind die Ergebnisse nach Doppelstimulation mit dem PDE2-Inhibitor Byk190954 und SNP in den Versuchen zur Messung der hydraulischen Konduktivität und Immunfluoreszenz zu werten. Der Einfluss von cGMP auf die endotheliale Permeabilität wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Ob eine leichte Erhöhung der cGMP-Konzentration protektiv wirkt und eine stärkere Erhöhung diesen Effekt wieder aufhebt, und welche weiteren Vorgänge bei der Interpretation dieser Daten zu beachten sind, ist nicht abschließend geklärt.

Im Widerspruch zur Literatur stehen die geringen Auswirkungen der PKA-beziehungsweise PKG-Inhibition auf die Phosphorylierung von VASP. Ob die Phosphorylierung von VASP nicht in allen Zelltypen oder nur unter bestimmten Voraussetzungen PKA- beziehungsweise PKG-abhängig ist, bleibt zu untersuchen.

Dass die Abnahme der interzellulären Lückenbildung und damit der Permeabilität bei erhöhten Konzentrationen der zyklischen Nukleotide durch eine Alteration des Zytoskeletts zu Stande kommt, wurde von verschiedenen Autoren beschrieben (Schnittler, 1990; Ingber, 1997; Guo, 2006; Kanthou, 2006). VASP, als struktureller und funktioneller Bestandteil des Zytoskeletts, könnte an dessen Regulation beteiligt sein.

Die im Vergleich zu cAMP geringere Fähigkeit von cGMP die endotheliale Barriere zu stabilisieren, könnte, zumindest teilweise, in seiner geringeren Fähigkeit zur Phosphorylierung von VASP an Serin¹⁵⁷ begründet sein. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass es für cGMP verschiedene intrazelluläre Effektoren (wie Ionen-Kanäle, Proteinkinasen, PDEs) gibt, während für cAMP neben der PKA bislang kaum weitere Effektoren beschrieben wurden (Draijer, 1995; Yuan, 2002). Erhöhte cGMP-Spiegel beeinflussen somit eine Vielzahl von Signalwegen, welche gegenteilige Effekte bezüglich der Permeabilität vermitteln könnten.

Wäre ein direkter Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung von VASP und einer verbesserten Zellintegrität gegeben, so stellte dies prinzipiell eine Möglichkeit zur Manipulation der endothelialen Permeabilität dar. Damit wäre bei einer Vielzahl von mit akuten und chronischen Entzündungen einhergehenden Erkrankungen eine spezifische Angriffsfläche für Medikamente gegeben. Da Struktur und Funktion des Zytoskeletts jedoch einer Vielzahl von Regulationsmechanismen unterliegen, welche heute in ihrer

Dimension und Wirkungsart noch nicht erfasst sind, bleibt eine alleinige Manipulation von VASP nach heutigem Kenntnisstand ohne praktischen Nutzen.

Generell ist zu bedenken, dass die in der Literatur beschriebenen Daten an unterschiedlichen *in vitro* und *in vivo* Modellen erhoben wurden. Ein Vergleich der Daten ist dadurch nur eingeschränkt möglich.

5 Zusammenfassung

Endotheliale Hyperpermeabilität ist ein Hauptmerkmal der Entzündung. Viele andere Erkrankungen, wie Infektionskrankheiten, Karzinome, Atherosklerose, Diabetes, Sepsis oder Verbrennungen gehen ebenfalls mit einer Störung der endothelialen Barriere einher. Eine Stabilisierung dieser Grenzschicht in den jeweiligen Organsystemen könnte den Verlauf dieser Erkrankungen deutlich verbessern. Es sind eine Vielzahl von Substanzen bekannt, welche die endotheliale Barriere stabilisieren oder auch destabilisieren, dennoch steht die Erforschung der Therapiemöglichkeiten der endothelialen Hyperpermeabilität noch an ihrem Anfang (van Nieuw Amerongen, 2002). Ein Zusammenhang zwischen dem Funktionszustand des Zytoskeletts und der Integrität der endothelialen Barriere ist allgemein anerkannt. Die grundlegende Struktur und Biochemie von Aktin, als Bestandteil des Zytoskeletts, wurde intensiv erforscht. Die Mechanismen, welche die Aneinanderlagerung, Organisation, Funktion sowie Um- und Abbau des Aktinzytoskeletts regulieren, sind jedoch nur in ihrem Ansatz erforscht.

Die vorgelegte Arbeit hatte zum Ziel, die protektiven Auswirkungen der zyklischen Nukleotide auf die endotheliale Barriere in HUVECs zu analysieren, die dabei entstehenden Veränderungen des Aktinzytoskeletts zu beschreiben und einen möglichen Zusammenhang zwischen diesen zellulären Veränderungen und dem Strukturprotein VASP zu beurteilen.

Eine Erhöhung der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP in HUVECs hatte eine Stabilisierung der endothelialen Barriere zur Folge, die Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität wurde deutlich reduziert. Dies ging mit einer reduzierten Ausbildung von Stressfasern und interendothelialen Lücken nach Thrombin-Applikation einher.

VASP wird eine Rolle bei der Vermittlung von Form und Funktion der Zelle und ihrem Verband zugesprochen. cAMP- und cGMP-erhöhende Maßnahmen hatten eine Phosphorylierung von VASP zur Folge. Die Reduktion der endothelialen Hyperpermeabilität durch erhöhte Spiegel zyklischer Nukleotide korrelierte positiv mit der vermehrten Phosphorylierung von VASP. Ob die Stabilisierung der endothelialen Barriere direkt durch die Phosphorylierung von VASP bedingt ist oder inwieweit parallel laufende cAMP- und cGMP-abhängige Prozesse dafür verantwortlich sind, ist weiterhin Gegenstand der Forschung.

Weiterführende Experimente mit Hilfe von Überexpression und Gendeletion von VASP sollten erfolgen, um die Rolle von VASP in der endothelialen Permeabilitätsregulation zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

Aguda AH, Burtnick LD, Robinson RC: The state of the filament.

EMBO Rep. 2005; 6: 220-226

Aktories K, Jakobs KH: Ni-mediated inhibition of human platelet adenylate cyclase by thrombin.

Eur J Biochem. 1984; 145: 333-338

Alexander JS, Zhu Y, Elrod JW, *et al.*: Reciprocal regulation of endothelial substrate adhesion and barrier function.

Microcirculation. 2001; 8: 389-401

Alexander JS, Elrod JW: Extracellular matrix, junctional integrity and matrix metalloproteinase interactions in endothelial permeability regulation.

J Anat. 2002; 200: 561-574

Amano M, Ito M, Kimura K, *et al.*: Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase).

J Biol Chem. 1996; 271: 20246-20249

Aszódi A, Pfeifer A, Ahmad M, *et al.*: The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function.

EMBO J. 1999; 18: 37-48

Bachmann C, Fischer L, Walter U, Reinhard M: The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation.

J Biol Chem. 1999; 274: 23549-23557

Baker DA, Kelly JM: Structure, function and evolution of microbial adenylyl and guanylyl cyclases.

Mol Microbiol. 2004; 52: 1229-1242

Baumer Y, Burger S, Curry FE, Golenhofen N, Drenckhahn D, Waschke J: Differential role of Rho GTPases in endothelial barrier regulation dependent on endothelial cell origin.

Histochem Cell Biol. 2008; 129: 179-191

Bear JE, Loureiro JJ, Fibova I, Fässler R, Wehland J, Gertler FB: Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins.

Cell. 2000; 101: 717-728

Bender AT, Beavo JA: Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use.

Pharmacol Rev. 2006; 58: 488-520

Bentley JK, Beavo JA: Regulation and function of cyclic nucleotides.

Curr Opin Cell Biol. 1992; 4: 233-240

Bogatcheva NV, Garcia JG, Verin AD: Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability.

Biochemistry (Mosc). 2002; 67: 75-84

Brindle NP, Holt MR, Davies JE, Price CJ, Critchley DR: The focal-adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) binds to the proline-rich domain in vinculin.

Biochem J. 1996; 318: 753-757

Brodie GN, Baenziger NL, Chase LR, Majerus PW: The effects of thrombin on adenylyl cyclase activity and a membrane protein from human platelets.

J Clin Invest. 1972; 51: 81-88

Broman MT, Kouklis P, Gao X, *et al.*: Cdc42 regulates adherens junction stability and endothelial permeability by inducing alpha-catenin interaction with the vascular endothelial cadherin complex.

Circ Res. 2006; 98: 73-80

Bundey RA, Insel PA: Adenylyl cyclase 6 overexpression decreases the permeability of endothelial monolayers via preferential enhancement of prostacyclin receptor function. *Mol Pharmacol.* 2006; 70: 1700-1707

Busse R, Mülsch A: Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1990; 275: 87-90

Bussolino F, Camussi G, Aglietta M, *et al.*: Human endothelial cells are target for platelet-activating factor. I. Platelet-activating factor induces changes in cytoskeleton structures. *J Immunol.* 1987; 139: 2439-2446

Butt E, Abel K, Krieger M, *et al.*: cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:14509-14517

Carbajal JM, Gratrix ML, Yu CH, Schaeffer RC Jr: ROCK mediates thrombin's endothelial barrier dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000; 279: 195-204

Carlier MF: Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Adv Biophys.* 1990; 26: 51-73

Chen J, Braet F, Brodsky S, *et al.*: VEGF-induced mobilization of caveolae and increase in permeability of endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 282: 1053-1063

Chen J, Lopez JA: Interactions of platelets with subendothelium and endothelium. *Microcirculation.* 2005; 12: 235-246

Chitaley K, Chen L, Galler A, Walter U, Daum G, Clowes AW: Vasodilator-stimulated phosphoprotein is a substrate for protein kinase C.

FEBS Lett. 2004; 556: 211-215

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.

J Trauma. 2005; 59: 302-307

Clauss M, Sunderkötter C, Sveinbjörnsson B, *et al.*: A permissive role for tumor necrosis factor in vascular endothelial growth factor-induced vascular permeability.

Blood. 2001; 97: 1321-1329

Comerford KM, Lawrence DW, Synnestvedt K, Levi BP, Colgan SP: Role of vasodilator-stimulated phosphoprotein in PKA-induced changes in endothelial junctional permeability.

FASEB J. 2002; 16: 583-585

Cooper JA, Buhle EL Jr, Walker SB, Tsong TY, Pollard TD: Kinetic evidence for a monomer activation step in actin polymerization.

Biochemistry. 1983; 22: 2193-2202

Cooper JA, Del Vecchio PJ, Minnear FL, *et al.*: Measurement of albumin permeability across endothelial monolayers in vitro.

J Appl Physiol. 1987; 62: 1076-1083

Crone C: Modulation of solute permeability in microvascular endothelium.

Fed Proc. 1986; 45: 77-83

Czabanka M, Peter C, Martin E, Walther A: Microcirculatory endothelial dysfunction during endotoxemia--insights into pathophysiology, pathologic mechanisms and clinical relevance.

Curr Vasc Pharmacol. 2007; 5: 266-275

Del Vecchio PJ, Siflinger-Birnboim A, Shepard JM, Bizios R, Cooper JA, Malik AB: Endothelial monolayer permeability to macromolecules.

Fed Proc. 1987; 46: 2511-2515

Dewey CF Jr, Bussolari SR, Gimbrone MA Jr, Davies PF: The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress.

J Biomech Eng. 1981; 103: 177-185

Draijer R, Vaandrager AB, Nolte C, de Jonge HR, Walter U, van Hinsbergh VW: Expression of cGMP-dependent protein kinase I and phosphorylation of its substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein, in human endothelial cells of different origin.

Circ Res. 1995; 77: 897-905

Dramsi S, Cossart P: Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton.

Annu Rev Cell Dev Biol. 1998; 14: 137-166

Dudek SM, Garcia JG: Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability.

J Appl Physiol. 2001; 91: 1487-1500

Dvorak AM, Kohn S, Morgan ES, Fox P, Nagy JA, Dvorak HF: The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasation.

J Leukoc Biol. 1996; 59: 100-115

Ehringer WD, Edwards MJ, Miller FN: Mechanisms of alpha-thrombin, histamine, and bradykinin induced endothelial permeability.

J Cell Physiol. 1996; 167: 562-569

Ehringer WD, Yamany S, Steier K, *et al.*: Quantitative image analysis of F-actin in endothelial cells.

Microcirculation. 1999; 6: 291-303

Ehringer WD, Wang OL, Haq A, Miller FN: Bradykinin and α -thrombin increase human umbilical vein endothelial macromolecular permeability by different mechanisms. *Inflammation*. 2000 ; 24: 175-193

Escoubet B, Dosne AM: Vascular endothelium. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1979 ; 21: 419-431

Essayan DM: Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 108:671-680

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

Farand P, Hamel M, Lauzier F, Plante GE, Lesur O: Review article: organ perfusion/permeability-related effects of norepinephrine and vasopressin in sepsis. *Can J Anaesth*. 2006; 53: 934-946

Feng D, Nagy JA, Pyne K, Hammel I, Dvorak HF, Dvorak AM: Pathways of macromolecular extravasation across microvascular endothelium in response to VPF/VEGF and other vasoactive mediators. *Microcirculation*. 1999; 6: 23-44

Förstermann U, Mülsch A, Böhme E, Busse R: Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circ Res*. 1986; 58: 531-538

Francis SH, Corbin JD: Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1999; 36: 275-328

Francis SH, Turko IV, Corbin JD: Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function.

Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 2001; 65: 1-52

Franke RP, Gräfe M, Schnittler H, Seiffge D, Mittermayer C, Drenckhahn D: Induction of human vascular endothelial stress fibres by fluid shear stress.

Nature. 1984; 307: 648-649

Gabbiani G, Gabbiani F, Heimark RL, Schwartz SM: Organization of actin cytoskeleton during early endothelial regeneration in vitro.

J Cell Sci. 1984; 66: 39-50

Garcia JG, Patterson C, Bahler C, Aschner J, Hart CM, English D: Thrombin receptor activating peptides induce Ca²⁺ mobilization, barrier dysfunction, prostaglandin synthesis, and platelet-derived growth factor mRNA expression in cultured endothelium.

J Cell Physiol. 1993; 156: 541-549

Garcia JG (1), Pavalko FM, Patterson CE: Vascular endothelial cell activation and permeability responses to thrombin.

Blood Coagul Fibrinolysis. 1995; 6: 609-626

Garcia JG (2), Schaphorst KL: Regulation of endothelial cell gap formation and paracellular permeability.

J Investig Med. 1995; 43: 117-126

Garcia JG (3), Davis HW, Patterson CE: Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation.

J Cell Physiol. 1995; 163: 510-522.

Garcia JG, Lazar V, Gilbert-McClain LI, Gallagher PJ, Verin AD: Myosin light chain kinase in endothelium: molecular cloning and regulation.

Am J Respir Cell Mol Biol. 1997; 16: 489-494

Gertler FB, Niebuhr K, Reinhard M, Wehland J, Soriano P: Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics.

Cell. 1996; 87: 227-239

Gotlieb AI, Wong MK, Boden P, Fone AC: The role of the cytoskeleton in endothelial repair.

Scanning Microsc. 1987; 1: 1715-1726

Gotlieb AI: The endothelial cytoskeleton: organization in normal and regenerating endothelium.

Toxicol Pathol. 1990; 18: 603-617

Gov NS, Gopinathan A: Dynamics of membranes driven by actin polymerization.

Biophys J. 2006; 90: 454-469

Guo XH, Huang QB, Chen B, *et al.*: Advanced glycation end products induce actin rearrangement and subsequent hyperpermeability of endothelial cells.

APMIS. 2006; 114: 874-883

Halbrügge M, Friedrich C, Eigenthaler M, Schanzenbächer P, Walter U: Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators.

J Biol Chem. 1989; 265:3088-3093

Halbrügge M, Walter U: Analysis, purification and properties of a 50,000-dalton membrane-associated phosphoprotein from human platelets.

J Chromatogr. 1990; 521: 335-543

Hanoune J, Defer N: Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms.

Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2001; 41: 145-174

Harbeck B, Hüttelmaier S, Schluter K, Jockusch BM, Illenberger S: Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interactions with actin.

J Biol Chem. 2000; 275: 30817-30825

Higgs HN, Pollard TD: Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins.

Annu Rev Biochem. 2001; 70: 649-676

Hill CS, Wynne J, Treisman R: The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF.

Cell. 1995; 81: 1159-1170

Hippenstiel S, Tannert-Otto S, Vollrath N, *et al.*: Glucosylation of small GTP-binding Rho proteins disrupts endothelial barrier function.

Am J Physiol. 1997; 272: 38-43

Hippenstiel S, Krüll M, Ikemann A, Risau W, Clauss M, Suttorp N: VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells.

Am J Physiol. 1998; 274: 678-684

Hippenstiel S, Witzenrath M, Schmeck B, *et al.*: Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability.

Circ Res. 2002; 91: 618-625

Hippenstiel S, Suttorp N: Interaction of pathogens with the endothelium.

Thromb Haemost. 2003; 89: 18-24

Hirase T, Staddon JM, Saitou M, *et al.*: Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells.

J Cell Sci. 1997; 110: 1603-1613

Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W: Atomic model of the actin filament.

Nature. 1990; 347: 44-49

Houslay MD, Kolch W: Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling.

Mol Pharmacol. 2000; 58: 659-668

Hüttelmaier S, Harbeck B, Steffens O, Messerschmidt T, Illenberger S, Jockusch BM: Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP.

FEBS Lett. 1999; 451: 68-74

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.

Proc Natl Acad Sci USA. 1987; 84: 9265-9269

Ikeda K, Utoguchi N, Makimoto H, Mizuguchi H, Nakagawa S, Mayumi T: Different reactions of aortic and venular endothelial cell monolayers to histamine on macromolecular permeability: role of cAMP, cytosolic Ca²⁺ and F-Actin.

Inflammation. 1999; 23: 87-97

Ingber DE: Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton.

J Cell Sci. 1993; 104: 613-627

Ingber DE: Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction.

Annu Rev Physiol. 1997; 59: 575-599

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria.

J Clin Invest. 1973; 52: 2745-2756

Kadl A, Leitinger N: The role of endothelial cells in the resolution of acute inflammation.

Antioxid Redox Signal. 2005; 7: 1744-1754

Kalnins VI, Subrahmanyam L, Gotlieb AT: The reorganization of cytoskeletal fibre systems in spreading porcine endothelial cells in cultures.

Eur J Cell Biol. 1981; 24: 36-44

Kanthou C, Kranjc S, Sersa G, Tozer G, Zupanic A, Cemazar M: The endothelial cytoskeleton as a target of electroporation-based therapies.

Mol Cancer Ther. 2006; 5: 3145-3152

Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, *et al.*: A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1.

Science. 1998; 282: 2275-2279

Kobińska M, Gorczyca WA: Particulate guanylyl cyclases: multiple mechanisms of activation.

Acta Biochim. Pol. 2000; 47: 517-528

Krause M, Bear JE, Loureiro JJ, Gertler FB: The Ena/VASP enigma.

J Cell Sci. 2002; 115: 4721-4726

Kwiatkowski AV, Gertler FB, Loureiro JJ: Function and regulation of Ena/VASP proteins.

Trends Cell Biol. 2003; 13: 386-392

Lal AA, Korn ED, Brenner SL: Rate constants for actin polymerization in ATP determined using cross-linked actin trimers as nuclei.

J Biol Chem. 1984; 259: 8794-8800

Lambrechts A, Kwiatkowski AV, Lanier LM, *et al.*: cAMP-dependent protein kinase phosphorylation of EVL, a Mena/VASP relative, regulates its interactions with actin and SH3 domains.

J Biol Chem. 2000; 275: 36143-36151

Lampugnani MG, Corada M, Caveda L, *et al.*: The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin).

J Cell Biol. 1995; 129: 203-217

Langer H, May AE, Bültmann A, Gawaz M: ADAM 15 is an adhesion receptor for platelet GPIIb-IIIa and induces platelet activation.

Thromb Haemost. 2005; 94: 555-561

Lee JS, Gotlieb AI: Microtubule-actin interactions may regulate endothelial integrity and repair.

Cardiovasc Pathol. 2002; 11: 135-140

Lee TY, Gotlieb AI: Microfilaments and microtubules maintain endothelial integrity.

Microsc Res Tech. 2003; 60:115-127

Lee HZ, Yeh FT, Wu CH: The effect of elevated extracellular glucose on adherens junction proteins in cultured rat heart endothelial cells.

Life Sci. 2004; 74: 2085-2096

Lee JS, Gotlieb AI: Microtubules regulate aortic endothelial cell actin microfilament reorganization in intact and repairing monolayers.

Histol Histopathol. 2005; 20: 455-465

Li S, Huang NF, Hsu S: Mechanotransduction in endothelial cell migration.

J Cell Biochem. 2005; 96: 1110-1126

Lin PS, Sung SJ, Gladding J: Effect of tumour necrosis factor, heat, and radiation on the viability and microfilament organization in cultured endothelial cells.

Int J Hyperthermia. 1992; 8: 667-677

Liu L, Rodgers GM: Characterization of an inducible endothelial cell prothrombin activator.

Blood. 1996; 88: 2989-2994

Loureiro JJ, Rubinson DA, Bear JE, Baltus GA, Kwiatkowski AV, Gertler FB: Critical roles of phosphorylation and actin binding motifs, but not the central proline-rich region, for Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) function during cell migration.

Mol Biol Cell. 2002; 13: 2533-2546.

Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, *et al.*: Guanylyl cyclases and signalling by cyclic GMP.

Pharmacol Rev. 2000; 52: 375-414

Lugnier C: Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents.

Pharmacol Ther. 2006; 109: 366-398

Lum H, Malik AB: Regulation of vascular endothelial barrier function.

Am J Physiol. 1994; 267: 223-241

Lum H, Roebuck KA: Oxidant stress and endothelial cell dysfunction.

Am J Physiol Cell Physiol. 2001; 280: 719-741

Malek AM, Izumo S: Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress.

J Cell Sci. 1996; 109: 713-726

Malik AB, Lynch JJ, Cooper JA: Endothelial barrier function.

J Invest Dermatol. 1989; 93: 62-67

Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K: Phosphodiesterases in the vascular system.

J Smooth Muscle Res. 2003; 39: 67-86

Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, *et al.*: Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system.

Mol Pharmacol. 2003; 64: 533-546

McDonald DM, Thurston G, Baluk P: Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation.

Microcirculation. 1999; 6: 7-22

Mehta D, Malik AB: Signaling mechanisms regulating endothelial permeability.

Physiol Rev. 2006; 86: 279-367

Meyer DJ Jr, Huxley VH: Capillary hydraulic conductivity is elevated by cGMP-dependent vasodilators.

Circ Res. 1992; 70: 382-391

Michel CC, Neal CR: Openings through endothelial cells associated with increased microvascular permeability.

Microcirculation. 1999; 6: 45-54

Minshall RD, Tiruppathi C, Vogel SM, Malik AB: Vesicle formation and trafficking in endothelial cells and regulation of endothelial barrier function.

Histochem Cell Biol. 2002; 117: 105-112

Minshall RD, Malik AB: Transport across the endothelium: regulation of endothelial permeability.

Handb Exp Pharmacol. 2006; 176: 107-144

Mitchell JA, Förstermann U, Warner TD, *et al.*: Endothelial cells have a particulate enzyme system responsible for EDRF formation: measurement by vascular relaxation.

Biochem Biophys Res Commun. 1991; 176: 1417-1423

Moore TM, Brough GH, Babal P, Kelly JJ, Li M, Stevens T: Store-operated calcium entry promotes shape change in pulmonary endothelial cells expressing Trp1.

Am J Physiol. 1998; 275: 574-582

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication.

Biochem Pharmacol. 1989; 38: 1709-1715

Naik MU, Naik UP: Junctional adhesion molecule-A-induced endothelial cell migration on vitronectin is integrin alpha v beta 3 specific.

J Cell Sci. 2006; 119: 490-499

Niebuhr K, Ebel F, Frank R, *et al.*: A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family.

EMBO J. 1997; 16: 5433-5444

van Nieuw Amerongen GP, van Delft S, Vermeer MA, Collard JG, van Hinsbergh VWM: Activation of RhoA by Thrombin in Endothelial Hyperpermeability: Role of Rho Kinase and Protein Tyrosine Kinase.

Circ Res. 2000; 87: 335-340

van Nieuw Amerongen GP, van Hinsbergh VW: Targets for pharmacological intervention of endothelial hyperpermeability and barrier function.

Vascul Pharmacol. 2002; 39: 257-272

Omori K, Kotera J: Overview of PDEs and their regulation.

Circ Res. 2007; 100: 309-327

Plopper G, Ingber DE: Rapid induction and isolation of focal adhesion complexes.

Biochem Biophys Res Commun. 1993; 193: 571-578

Price CJ, Brindle NP: Vasodilator-stimulated phosphoprotein is involved in stress-fibre and membrane ruffle formation in endothelial cells.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000; 20: 2051-2056

Pries AR, Kuebler WM: Normal endothelium.

Handb Exp Pharmacol. 2006; 176:1-40

Pyriochou A, Papapetropoulos A: Soluble guanylyl cyclase: more secrets revealed.

Cell Signal. 2005; 17: 407-413

Qiao J, Huang F, Lum H: PKA inhibits RhoA activation: a protection mechanism against endothelial barrier dysfunction.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2003; 284: 972-980

Reinhard M (1), Jouvenal K, Tripier D, Walter, U: Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein).

Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92:7956-7960

Reinhard M (2), Giehl K, Abel K, et al.: The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins.

EMBO J. 1995; 14:1583-1589

Reinhard M, Rüdiger M, Jockusch BM, Walter U: VASP interaction with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs.

FEBS Lett. 1996; 399: 103-107

Reinhard M, Jarchau T, Walter U: Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins.

Trends Biochem. Sci. 2001; 26: 243-249

Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A: The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling.

Cell. 1992; 70: 401-410

Ridley AJ: Rho GTPases and cell migration.

J Cell Sci. 2001; 114: 2713-2722

Rodgers GM, Shuman MA: Prothrombin is activated on vascular endothelial cells by factor Xa and calcium.

Proc Natl Acad Sci USA. 1983; 80: 7001-7005

de Rooij J, Rehmann H, van Triest M, Cool RH, Wittinghofer A, Bos JL: Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs.

J Biol Chem. 2000; 275: 20829-20836

Rubin LL: Endothelial cells: adhesion and tight junctions.

Curr Opin Cell Biol. 1992; 4: 830-833

Rumbaut RE, Slaff DW, Burns AR: Microvascular thrombosis models in venules and arterioles in vivo.

Microcirculation. 2005; 12: 259-274

Sandoval R, Malik AB, Nagvi T, Mehta D, Tiruppathi C: Requirement for Ca²⁺ signaling in the mechanism of thrombin-induced increase in endothelial permeability.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001; 280: 239-247

Schafer DA, Cooper JA: Control of actin assembly at filament ends.

Annu Rev Cell Dev Biol. 1995; 11: 497-518

Schäfer A, Burkhardt M, Vollkommer T, *et al.*: Endothelium-dependent and -independent relaxation and VASP serines 157/239 phosphorylation by cyclic nucleotide-elevating vasodilators in rat aorta.

Biochem Pharmacol. 2003; 65: 397-405

Schlegel N, Burger S, Golenhofen N, Walter U, Drenckhahn D, Waschke J: The role of VASP in regulation of cAMP- and Rac 1-mediated endothelial barrier stabilization.

Am J Physiol Cell Physiol. 2008; 294: 178-188

Schnittler H, Franke RP, Drenckhahn D: Role of the endothelial actin filament cytoskeleton in rheology and permeability.

Z Kardiol. 1989; 6: 1-4

Schnittler HJ, Wilke A, Gress T, Suttorp N, Drenckhahn D: Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium.

J Physiol. 1990; 431: 379-401

Sept D, McCammon JA: Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation.

Biophys J. 2001; 81: 667-674

Setiadi H, Mc Ever RP: Signal-dependent distribution of cell surface P-selectin in clathrin-coated pits affects leucocyte rolling under flow.

J Cell Biol. 2003; 163: 1385-1395

Seybold J, Thomas D, Witzenrath M, *et al.*: Tumor necrosis factor-alpha-dependent expression of phosphodiesterase 2: role in endothelial hyperpermeability.

Blood. 2005; 105: 3569-3576

Shasby DM, Shasby SS, Sullivan JM, Peach MJ: Role of endothelial cell cytoskeleton in control of endothelial permeability.

Circ Res. 1982; 51: 657-661

Shin HY, Bizios R, Gerritsen ME: Cyclic pressure modulates endothelial barrier function. Endothelium. 2003; 10: 179-187

Shuster CB, Herman IM: The mechanics of vascular cell motility.

Microcirculation. 1998; 5: 239-257

Smirnov VN, Antonov AS, Antonova GN, *et al.*: Effects of forskolin and phorbol-myristate-acetate on cytoskeleton, extracellular matrix and protein phosphorylation in human endothelial cells.

J Mol Cell Cardiol. 1989; 21: 3-11

Smolenski A, Bachmann C, Reinhard K, *et al.*: Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody.

J Biol Chem. 1998; 273: 20029-20035

Smolenski A, Poller W, Walter U, Lohmann SM: Regulation of human endothelial cell focal adhesion sites and migration by cGMP-dependent protein kinase I.

J Biol Chem. 2000; 275: 25723-25732

Stevens T, Garcia JG, Shasby DM, Bhattacharya J, Malik AB: Mechanisms regulating endothelial cell barrier function.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2000; 279: 419-422

Strukova S: Blood coagulation-dependent inflammation. Coagulation-dependent inflammation and inflammation-dependent thrombosis.

Front Biosci. 2006; 11: 59-80

Sugama Y, Tiruppathi C, Offakidevi K, Andersen TT, Fenton JW 2nd, Malik AB: Thrombin-induced expression of endothelial P-selectin and intercellular adhesion molecule-1: a mechanism for stabilizing neutrophil adhesion.

J Cell Biol. 1992; 119: 935-944

Sun HQ, Kwiatkowska K, Yin HL: Actin monomer binding proteins.

Curr Opin Cell Biol. 1995; 7: 102-110

Sun H, Breslin JW, Zhu J, Yuan SY, Wu MH: Rho and ROCK signaling in VEGF-induced microvascular endothelial hyperpermeability.

Microcirculation. 2006; 13: 237-247

Surapisitchat J, Jeon KI, Yan C, Beavo JA: Differential regulation of endothelial cell permeability by cGMP via phosphodiesterases 2 and 3.

Circ Res. 2007; 101: 811-818

Suttorp N, Weber U, Welsch T, Schudt C: Role of phosphodiesterases in the regulation of endothelial permeability in vitro.

J Clin Invest. 1993; 91: 1421-1428

Suttorp N (1), Ehreiser P, Hippenstiel S, *et al.*: Hyperpermeability of pulmonary endothelial monolayer: protective role of phosphodiesterase isoenzymes 3 and 4.

Lung. 1996; 174: 181-194

Suttorp N (2), Hippenstiel S, Fuhrmann M, Krüll M, Podzuweit T: Role of nitric oxide and phosphodiesterase isoenzyme II for reduction of endothelial hyperpermeability.

Am J Physiol. 1996; 270: 778-785

Takai Y, Sasaki T, Matozaki T: Small GTP-binding proteins.

Physiol Rev. 2001; 81: 153-208

Temmesfeld-Wollbrück B, Hocke AC, Suttorp N, Hippenstiel S: Adrenomedullin and endothelial barrier function.

Thromb Haemost. 2007; 98: 944-951

Thurston G, Turner D: Thrombin-induced increase of F-actin in human umbilical vein endothelial cells.

Microvasc Res. 1994; 47: 1-20

Trichet L, Sykes C, Plastino J: Relaxing the actin cytoskeleton for adhesion and movement with Ena/VASP.

J Cell Biol. 2008; 181: 19-25

van Troys M, Dewitte D, Goethals M, Carlier MF, Vandekerckhove J, Ampe C: The actin binding site of thymosin beta 4 mapped by mutational analysis.

EMBO J. 1996; 15: 201-210

Varma S, Breslin JW, Lal BK, Pappas PJ, Hobson RW 2nd, Durán WN: p42/44MAPK regulates baseline permeability and cGMP-induced hyperpermeability in endothelial cells.

Microvasc Res. 2002; 63: 172-178

Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR: Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation.

Cell. 1991; 64: 1057-1068

Walders-Harbeck B, Khaitlina SY, Hinssen H, Jockusch BM, Illenberger S: The vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes actin polymerisation through direct binding to monomeric actin.

FEBS Lett. 2002; 529: 275-280.

Walter U, Eigenthaler M, Geiger J, Reinhard M: Role of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and their common substrate VASP in the regulation of human platelets.

Adv Exp Med Biol. 1993; 344: 237-249

Waschke J, Drenckhahn D, Adamson RH, Barth H, Curry FE: cAMP protects endothelial barrier functions by preventing Rac-1 inhibition.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004; 287: 2427-2433

Waschke J, Burger S, Curry FR, Drenckhahn D, Adamson RH: Activation of Rac-1 and Cdc42 stabilizes the microvascular endothelial barrier.

Histochem Cell Biol. 2006; 125: 397-406

Welch MD, Mullins RD: Cellular control of actin nucleation.

Annu Rev Cell Dev Biol. 2002; 18: 247-288

Wójciak-Stothard B, Ridley AJ: Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability.

Vascul Pharmacol. 2002; 39: 187-199

Wong AJ, Pollard TD, Herman IM: Actin filament stress fibers in vascular endothelial cells in vivo.

Science. 1983; 219: 867-869

Wong MK, Gotlieb AI: Endothelial cell monolayer integrity. I. Characterization of dense peripheral band of microfilaments.

Arteriosclerosis. 1986; 6: 212-219

Wong MK, Gotlieb AI: The reorganization of microfilaments, centrosomes, and microtubules during in vitro small wound reendothelialization.

J Cell Biol. 1988; 107: 1777-1783

Wu MH: Endothelial focal adhesions and barrier function.

J Physiol. 2005; 569: 359-366

Wu CC, Li YS, Haga JH, *et al.*: Directional shear flow and Rho activation prevent the endothelial cell apoptosis induced by micropatterned anisotropic geometry.

Proc Natl Acad Sci USA. 2007; 104: 1254-1259

Yin W, Ghebrehiwet B, Weksler B, Peerschke EI: Classical passway complement activation on human endothelial cells.

Mol Immunol. 2007; 44: 2228-2234

Yuan SY: Protein kinase signaling in the modulation of microvascular permeability.
Vascul Pharmacol. 2002; 39: 213-223

Zimmerman RS, Trippodo NC, MacPhee AA, Martinez AJ, Barbee RW: High-dose atrial natriuretic factor enhances albumin escape from the systemic but not the pulmonary circulation.

Circ Res. 1990; 67: 461-468

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---------------------------------------|
| Abb | Abbildung |
| AK | Antikörper |
| ARDS | Adult Respiratory Distress Syndrome |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Byk | PDE2-Inhibitor Byk 190954 |
| bzw | beziehungsweise |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| cGMP | zyklisches Guanosinmonophosphat |
| COCO-Region | Coiled-coil-Region |
| DPB | dense peripheral band |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGF | Epidermal Growth Factor |
| EHNA | Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenin |
| EVH1 | Ena-VASP-homology-1 |
| EVH2 | Ena-VASP-homology-2 |
| F | Forskolin |
| FAB | F-Aktin bindende Region |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| F-Aktin | filamentäres Aktin |
| G-Aktin | globuläres Aktin |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| H ₂ O | Wasser |
| HUVEC | Human Umbilical Vein Endothelial Cell |
| I | Inhibitor |
| Ig | Immunglobulin |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-trisphosphat |
| konj | konjugiert |
| LW | Leerwert |
| min | Minuten |
| MLC | Myosin-Leichtkette |
| MLCK | Myosin-Leichtketten-Kinase |
| PDE | Phosphodiesterase |

| | |
|------------------|--|
| PFA | Paraformaldehyd |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| PIP5K | Phosphatidylinositol 4-phosphat 5-Kinase |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKC | Proteinkinase C |
| PKG | Proteinkinase G |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| Rho-Protein | Ras homologous protein |
| ROK | Rho-Kinase |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-Page | Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese |
| Ser | Serin |
| SNP | Natrium Nitroprussid |
| TEMED | N, N, N', N'-Tetramethyldiamin |
| Thr | Threonin |
| TRIS | Tris(Hydroxymethyl)aminomethan |
| TLM | thymosin-β4-like motif |
| VASP | Vasodilator stimuliertes Phosphoprotein |
| VE-Cadherin | Vaskuläres endotheliales Cadherin |
| VEGF | vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor |
| WB | Western Blot |

Erklärung

„Ich, Anna Katharina Starzacher, erkläre an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Zyklische Nukleotid-abhängige Phosphorylierung von Vasodilator-stimuliertem Phosphoprotein (VASP) an Serin¹⁵⁷ und deren Einfluss auf das Zytoskelett humaner Endothelzellen“

von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde. Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Die Arbeit stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. N. Suttrop für die Betreuung und Förderung. Herrn Prof. Dr. Stefan Hippenstiel danke ich ganz besonders für seine Geduld, mich immer wieder in inhaltlichen, organisatorischen und technischen Fragen zu beraten und mich zu motivieren. Dr. Philippe N'Guessan, Dr. Dirk Thomas, Alexander Bürger, Kerstin Möhr, Doris Stoll und Valerie Johnston und allen anderen, die mich moralisch sowie mit Rat und Tat im Labor unterstützt haben.

Meinen Eltern, Sibylle und Karl Starzacher, sowie meinen Geschwistern und Großmüttern für ihre moralische Unterstützung und anhaltende Motivation.

Ich danke all denen, die mich in den vergangenen Jahren auf ganz unterschiedliche Weise unterstützt haben.