

# **Die Rolle von Intermedin in der Schrankenfunktion mikrovaskulärer koronarer Endothelzellen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität

Gießen

vorgelegt von Dominik Schuler

aus Heidelberg

Gießen 2010

**Aus dem Physiologischen Institut  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. rer. nat. K.-D. Schlüter**

**1. Gutachter: PD Dr. T. Noll**

**2. Gutachter: Prof. Dr. H. Tillmanns**

**Tag der Disputation: 17.12.2010**

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>V</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Endothel als Grenzschicht zwischen Blut und Gewebe.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Funktionen des Gefäßendothels .....	2
1.1.2 Die endotheliale Schrankenfunktion .....	3
1.1.3 Bedeutung des Zytoskeletts in Endothelzellen.....	4
<b>1.2 Der kontraktile Apparat von Endothelzellen .....</b>	<b>6</b>
1.2.1 Aufbau und Regulation des kontraktiven Apparates.....	6
1.2.2 Signaltransduktion im kontraktiven Apparat – cAMP/PKA Signalweg .....	6
<b>1.3 Intermedin .....</b>	<b>9</b>
1.3.1 Ein neues Protein .....	9
1.3.2 Synthese und Struktur von Intermedin.....	10
1.3.3 Vorkommen im Gewebe und Plasma.....	11
1.3.4 Rezeptor-Pharmakologie und -Expression.....	12
1.3.5 Rezeptor-Affinität .....	14
1.3.6 Hämodynamischer Effekt von Intermedin .....	15
1.3.7 Pathophysiologische Bedeutung von Intermedin .....	17
<b>2. FRAGESTELLUNG.....</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Material .....</b>	<b>20</b>
3.1.1 Chemikalien .....	20
3.1.2 Antikörper .....	21
3.1.3 Lösungen und Puffer .....	22
3.1.4 Versuchstiere.....	24
<b>3.2 Methoden.....</b>	<b>24</b>
3.2.1 Zellkultur: Isolierung von Ratten-Endothelzellen .....	24
3.2.2 Makromolekülpermeabilität von endothelialen Zellschichten .....	26
3.2.3 Gelelektrophoretische Methoden .....	28
3.2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	28
3.2.5 Western Blot-Verfahren .....	31
3.2.6 Immunologisches Nachweisverfahren .....	32
3.2.7 Indirekte Immunfluoreszenz .....	33
3.2.8 Nachweis von aktiviertem RhoA mittels pulldown-Assay .....	33
<b>4. ERGEBNISSE.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Wirkung von Intermedin auf die endotheliale Makromolekülpermeabilität .....</b>	<b>35</b>
<b>4.2 Einfluss von <math>\alpha</math>-CGRP<sub>8-37</sub> auf die Intermedin-induzierte Steigerung der Makromolekülpermeabilität .....</b>	<b>36</b>
<b>4.3 Wirkung von H89 auf die IMD-induzierte .....</b>	<b>37</b>
<b>4.4 Beteiligung von Rho am Intermedin-Signalweg.....</b>	<b>39</b>
<b>4.5 Wirkung von Intermedin auf die Kofilin-Phosphorylierung .....</b>	<b>42</b>
<b>4.6 Wirkung von Intermedin auf das endotheliale Zytoskelett.....</b>	<b>44</b>
<b>4.7 Wirkung von Intermedin auf die MYPT1-Phosphorylierung .....</b>	<b>44</b>

<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>47</b>
5.1 Intermedin steigert die endotheliale Permeabilität für Makromoleküle über einen CRLR / RAMP-Rezeptorkomplex .....	47
5.2 Die Intermedin-Wirkung auf die endotheliale Schranke wird über PKA vermittelt .....	49
5.3 Der Einsatz von RhoA- bzw. ROCK-Hemmern erhöht die Endothel-Permeabilität .....	50
5.4 Intermedin hemmt die Phosphorylierung von MYPT1.....	51
5.5 Intermedin destabilisiert das Aktinzytoskelett über Hemmung der LIM-Kinase .....	52
5.6 Klinischer Einfluss von Intermedin in Bezug auf die koronare Herzkrankheit .....	54
5.7 Ausblick .....	56
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>58</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>59</b>
<b>8. LITERATURNACHWEIS.....</b>	<b>60</b>
<b>9. ERKLÄRUNG .....</b>	<b>72</b>

## Abkürzungsverzeichnis

- Es wurde der 3-Buchstabencode für Aminosäuren verwendet.
- In der deutschen Sprache gebräuchliche Abkürzungen, physikalische Einheiten und von der IUPAC festgelegte Abkürzungen werden nicht gesondert aufgeführt.

% (vol/vol)	Volumenprozent
% (wt/vol)	Gewichtsprozent
$\alpha$ -CGRP (8-37)	calcitonin gene-related peptide receptor antagonist
AA/BA	Acrylamid / Bisacrylamid
ADM	Adrenomedullin
ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäure
ATF	aktivierender Transkriptionsfaktor
ATP	Adenosintriphosphat
AVP	atrioventrikuläres Peptid
BSA	bovines Serum Albumin
C2-Toxin	Clostridium botulinum C2-Toxin
C3T	Exoenzym C3-Transferase
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CDC42	Cell division control protein 42 homolog
cDNA	complementary DNA
CGRP	calcitonin gene-related peptid
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response elemente-binding protein
CRLR	calcitonin receptor-like receptor
CT	Calcitonin
CTR	calcitonin receptor
DAG	Diacylglycerol
DTT	Dithiothreitol
ECL	Electrochemistry Laboratory
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FCS	fötales Kälberserum

FSK	Forskolin
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethanolsulfonsäure
HRP	horseradish peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IP3	Inositoltrisphosphat
IMD	Intermedin
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MLC	leichte Myosinkette
MLCK	Myosin-Leichtketten-Kinase
MLCP	leichte Myosinketten-Phosphatase
MYPT1	Myosin-Phosphatase-bindende Untereinheit
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumflourid
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumorthovanadat
NCS	newborn calf serum
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Aktivität
PIP2	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTB1B	Protein-Tyrosin-Phosphatase
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAMP	Receptor activity-modifying protein
RCP	Receptor component protein
ROCK	Rho-assoziierte Kinase
SD	Standardabweichung

SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20
TEMED	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiozyanat
TRIS	Tris-Hydroxymethylaminomethan

## 1. Einleitung

Endothelzellen kleiden als ein einschichtiges Epithel die Innenfläche des gesamten kardiovaskulären Systems aus und bilden eine selektive Blut-Gewebe-Barriere. Diese Barrierefunktion dient der optimalen Versorgung mit Nährstoff und Sauerstoff bzw. dem Abtransport von Metaboliten und CO<sub>2</sub> des Gewebes. Dabei können die Stoffe auf zwei prinzipiell verschiedenen Wegen die Endothelzellschicht durchqueren: dem trans- und dem parazellulärem Weg. Dies geschieht sowohl über passive Prozesse, z.B. entlang eines Konzentrationsgradienten, als auch über aktiven Transport unter ATP-Verbrauch. Da nur kleine, ungeladene Moleküle, wie z.B. O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> sowie ungeladene polare Moleküle wie H<sub>2</sub>O durch die Zellmembran frei diffundieren können, dienen Ionenkanäle oder Trägerproteine den Endothelzellen für den transzellulären Transport. Der quantitativ wichtigste Weg für den Austausch von Makromolekülen stellen Lücken zwischen benachbarten Endothelzellen dar. Reguliert wird die Barrierefunktion durch intrazelluläre, endotheliale Signaltransduktion, die durch exogene Faktoren, wie z.B. vasoaktive Substanzen (Stickstoffmonoxid, NO) oder durch das Zusammenspiel von Peptiden, wie z.B. dem Angiotensin, Endothelin oder Adrenomedulin, ganz entscheidend beeinflusst werden kann.

Kürzlich ist gezeigt worden (Pfeil, Aslam et al. 2009), dass Intermedin, ein neues Mitglied der Calcitonin-Peptid-Familie, eine wichtige Rolle bei der Regulation der endothelialen Barrierefunktion spielt. Der Mechanismus über den Intermedin die Schrankenfunktion beeinflusst ist jedoch weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wird der molekulare Mechanismus der Intermedinwirkung auf die Barrierefunktion untersucht. Im Fokus stehen die Signaltransduktion, die Intermedin in Endothelzellen induziert sowie dessen Wirkung auf das Zytoskelett von mikrovaskulären koronaren Endothelzellen.

## 1.1 Das Endothel als Grenzschicht zwischen Blut und Gewebe

### 1.1.1 Funktionen des Gefäßendothels

Mit einer beim Menschen geschätzten Gesamtfläche von ca. 350 m<sup>2</sup> und einem Gesamtgewicht von etwa 10 kg kann das Endothel als ein eigenständiges Organ angesehen werden. Früher wurde angenommen, dass dem Endothel lediglich eine passive Siebfunktion zukommt. Heute weiß man, dass die Endothelzellen äußerst aktiv sind und eine Vielzahl von zentralen Funktionen ausüben (Pries, Kuebler 2006). Das Endothel nimmt eine Hauptfunktion in der Regulation des arteriellen Gefäßtonus (Dinh-Xuan, Pepke-Zaba et al. 1993) und des Stoffaustausches zwischen dem Intra- und Extravasalraum ein. Aufgrund seiner antithrombotischen und antikoagulatorischen Wirkung stellt es einen wesentlichen Faktor der Haemostase dar (Sumpio, Riley et al. 2002). Endothelzellen sind von ganz entscheidender Bedeutung bei der Bildung neuer Gefäße (Folkman, Klagsbrun 1987; Sumpio, Riley et al. 2002) und bei der Wundheilung. Sie sind aber auch erste Ziele akuter und chronischer Entzündungsprozesse (Cotran 1987; Hecker 1999; Ji, Jing et al. 2008). Die vielfältigen Funktionen des Endothels werden prinzipiell mittels dreier Mechanismen ausgeübt: Endothelzellen besitzen die Möglichkeit vasoaktive Substanzen, wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO), Prostazyklin und Endothelin, zu synthetisieren und diese bei Bedarf freizusetzen (Toborek, Kaiser 1999). Weiterhin enthalten Endothelzellen membranständige Enzyme, mit denen sie Einfluss auf die Konzentration im Blut zirkulierender Substanzen, wie z.B. Angiotensin I, ausüben können (Hecker 1999). Der von-Willebrand-Faktor, der eine zentrale Rolle in der Blutgerinnung spielt, wird in den Endothelzellen synthetisiert und aus diesen sezerniert (Vane, Botting 1994; Sumpio, Riley et al. 2002). Zur Vermittlung von Signalen an die Endothelzellen werden Rezeptoren benötigt. Diese werden ebenfalls von den Endothelzellen exprimiert, damit zum einen inflammatorische Mediatoren, wie z.B. Thrombin und Histamin, und zum anderen Wachstumsfaktoren und andere Mediatoren, wie Adrenalin, Adenosin, Adeninnukleotide und Peptide, binden können (Vanhoutte, Mombouli 1996). Auch über physikalisch-chemische Reize, wie Wandspannung (*shear stress*) und Hypoxie, werden Signale an die Endothelzellen weitergegeben. Als Folge können die Endothelzellen neue Substanzen synthetisieren bzw. ausschütten und/oder mit Veränderungen im Zytoskelett reagieren.

## Einleitung

Aufgrund dieser Tatsache ist es leicht zu verstehen, dass gestörte Endothelfunktionen oft Grundlage für die Entstehung chronischer kardiovaskulärer Erkrankungen, wie Bluthochdruck, Artherosklerose, Herzinfarkt und Schlaganfall sind, die heute in der Medizin ein großes Problem darstellen.

### 1.1.2 Die endotheliale Schrankenfunktion

Zur Hauptaufgabe des Gefäßendothels gehört die Bildung einer selektiven Barriere, die den kontrollierten Austausch von Flüssigkeiten, Makromolekülen und Blutzellen zwischen Gefäßlumen und Interstitium ermöglicht (Drenckhahn 1997; Bogatcheva, Verin 2009). Dieser Austausch kann transzellulär oder parazellulär erfolgen (Stevens, Garcia et al. 2000). Die Mehrzahl aller Gefäße besitzt eine kontinuierliche Schicht von Endothelzellen, welche durchlässig für Wasser, Ionen, Gase und kleinere Moleküle ist. Sie diffundieren durch die Endothelzellschicht über transzelluläre Wege. Als treibende Kraft stehen dabei zum einen der hydrostatische und kolloidosmotische Druck und zum anderen selektive Membrantransportproteine zur Verfügung. Darüber hinaus wird für bestimmte Proteine und Substanzen auch ein transendothelialer Weg über zytoplasmatische Vesikel und sogenannte „*Vesiculo-Vacuolar Organells (VVOs)*“ diskutiert (Michel 1996; Dvorak, Feng 2001; El-Fadaly, Kummer 2005). Im Rahmen einer Entzündung können auch große, vor allem hydrophile Moleküle sowie größere Flüssigkeitsmengen aus dem Gefäßlumen in das Gewebe übertreten. Diesen Vorgang bezeichnet man als parazelluläre Permeabilität, da die Moleküle über interendotheliale Spalten zwischen den normalerweise eng aneinander liegenden Endothelzellen in das Gewebe diffundieren. Die Bedeutung der Endothelzellen bei der Regulation der Interzellulärspalten konnte unter anderem mittels Elektronen- und Phasenkontrastmikroskopie und Permeabilitätsversuchen in verschiedenen Modellen kultivierter Endothelzellen gezeigt werden. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass Entzündungsmediatoren, wie Histamin, Thrombin und Serotonin, die Endothelzellen dazu veranlassen, interzelluläre Spalten von 0,1-1µm zu bilden, was den Zusammenbruch der endothelialen Permeabilitätsbarriere bedeutet (Garcia, Siflinger-Birnboim et al. 1986; Wu, Baldwin 1992; Moy, Winter et al. 2000).

### 1.1.3 Bedeutung des Zytoskeletts in Endothelzellen

Eine wichtige Rolle in der Regulation der Permeabilitätsbarriere spielt das Zytoskelett der Endothelzelle. Es besteht, wie das anderer Zellen, aus einem Gerüst aus Fasern, die das gesamte Zytosol der Zelle durchziehen und bis zur Plasmamembran reichen. Dabei sind drei Fasersysteme voneinander zu unterscheiden: Mikrofilamente (Aktinfilamente), Mikrotubuli und Intermediärfilamente (Gotlieb, Langille et al. 1991). Sie besitzen verschiedene wichtige Aufgaben und verleihen den Endothelzellen Form und Stabilität. Bei intrazellulären Transportvorgängen dienen sie als Leitstruktur für die zellulären Organellen. Große Bedeutung kommt ihnen bei der zellulären Kraftentwicklung zu, wobei hier vor allem die mit Myosin II-assoziierten Aktinfilamente die Grundlage für den kontraktilen Apparat der Zelle darstellen (Alberts 1997).

Das Zytoskelett der Zelle hat nicht nur die Aufgabe der Stabilisierung, sondern auch die Verankerung benachbarter Zellen (Jamora, Fuchs 2002). Quervernetzte Membranproteine verbinden die einzelnen Aktinfilamente untereinander, integrale Proteine verbinden das Aktinnetzwerk mit der Plasmamembran. Über diese Kontaktstellen stehen die benachbarten Zellen in Verbindung. Man bezeichnet sie entweder als Zell-Zell-Verbindungen (Adhärenskontakte) oder als Zell-Matrix-Kontakte (Fokalkontakte). Aktivierte Endothelzellen können auf ihrer basalen Seite aussergewöhnlich lange Aktin-Myosin-Bündel, sogenannte Stressfasern, bilden. Diese spielen eine zentrale Rolle vor allem bei der Zellkontraktion und Zellmigration. Sie sind durch den Blutstrom verschiedenen physikalischen Kräften ausgesetzt. Mittels der Stressfasern und den Zell-Zell-Verbindungen besitzen sie die Möglichkeit einen stabilen Zellverband zu bilden und auf der Basalmembran gut zu haften. Untereinander sind die Aktinzytoskelette benachbarter Endothelzellen mechanisch über Adhärenskontakte, sogenannten *Adherens junctions* oder *Tight junctions*, miteinander verbunden (Toborek, Kaiser 1999). Alle Adhäsionsstrukturen sowohl bei Zelle-Zelle als auch bei Zelle-Matrix-Verbindungen sind grundsätzlich aus drei Teilen aufgebaut: einen Teil bilden die integralen Membranproteine. Hier unterscheidet man zwischen Integrinen an den Zell-Matrix-Kontakten, und vornehmlich VE-Cadherine an den endothelialen Zell-Zell-Kontakten. Weitere Strukturen sind die kontraktilen Aktin-Myosin-Bündeln und intrazellulären Adapterproteinen, die die integralen Membranproteine mit den Aktin-Myosin-Komplexen in der Zelle verbinden (Lodish 2001).

## Einleitung

Um den Austausch von Flüssigkeit und Molekülen zwischen Gefäßlumen und Interstitium zu ermöglichen, bedient sich das Endothel zweier Mechanismen, in denen das Zytoskelett eine zentrale Rolle spielt. Interendotheliale Spaltbildung kann entweder über den Zerfall von Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakten und/oder über eine Aktivierung des kontraktiven endothelialen Zytoskeletts erfolgen (Yuan 2002; Bogatcheva, Dudek et al. 2003; Borbiev, Verin et al. 2003).

Endothelzellen in normalem konfluenten Zustand bestehen aus einem engen peripheren Band aus Aktin-Mikrofilament-Fibrillen und Stressfasern (Ettenson, Gotlieb 1992). Man geht davon aus, dass das periphere Aktin eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion spielt. Aktin, welches den Hauptteil des Zytoskeletts bildet, existiert in zwei verschiedenen Formen: das filamentäre F-Aktin und das monomere G-Aktin (Haugland, You et al. 1994). Das Verhältnis beider Formen in Endothelzellen ist dabei ausgeglichen. F-Aktin stellt innerhalb der Zelle eine dynamische Struktur dar, da es kontinuierlich polymerisiert und depolymerisiert wird. Die Aktin-Mikrofilamente bestehen aus zwei sphärischen G-Aktin Monomeren, die sich um sich selbst winden. Polymerisation von F-Aktin findet unter ATP-Bindung statt. Eine Hydrolyse der ATP-Bindung fördert hingegen die Depolymerisierung.

Reguliert wird diese Bildung von Stressfasern durch Rho (Lee, Gotlieb 2002). C2-Toxin und Cytochalasin D induzieren den Zerfall des Aktinzytoskeletts und bewirken dadurch den Verlust von endothelialen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten sowie eine Loslösung der Zelle von der Unterschicht (Schnittler, Wilke et al. 1990). Die Hemmung der Aktin-Polymerisation durch Cytochalasin D führt zu einer Depolymerisation des Aktins (Goeckeler, Wysolmerski 1995; Mehta, Tirupathi et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass eine Stimulierung von Endothelzellen mit Thrombin zu einer Neuverteilung der Aktin-Mikrofilamente führt (Gotlieb 1990). Dabei kommt es zu einer Abnahme des peripheren Aktins und einer Zunahme der zentralen Mikrofilamente.

## 1.2 Der kontraktile Apparat von Endothelzellen

### 1.2.1 Aufbau und Regulation des kontraktilem Apparates

Obwohl Endothelzellen nicht als Muskelzellen bezeichnet werden, verfügen sie wie glatte Muskelzellen, über einen kontraktilem Apparat. Dieser besteht aus Aktin, Myosin II, Tropomyosin und  $\alpha$ -Aktinin. Aktin und Myosin sind zum überwiegenden Teil in der Nähe der Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Adhäsion lokalisiert. Die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration spielt eine zentrale Rolle in der Weitenregulation der Interzellulärspalten (Schnittler, Wilke et al. 1990; Klingenberg 2004). Ganz analog zu Skelettmuskelfasern oder Glattmuskelzellen kommt es bei der Kontraktion des Gefäßendothels zu einem teleskopartigen aneinandergleiten der Aktin- und Myosinfilamente. Allerdings erfolgen der Vorgang der Filamentverschiebung und die nötige ATP-Spaltung durch die Myosin-ATPase viel langsamer als bei der schnellen Skelettmuskulatur.

### 1.2.2 Signaltransduktion im kontraktilem Apparat – cAMP/PKA Signalweg

Ein ganz zentraler Signalweg bei der Regulation der endothelialen Schrankenfunktion wird über die zytosolische Konzentration des sekundären Botenstoffes zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) vermittelt. Manöver, die zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels in den Endothelzellen der mikrovaskulären koronaren Strombahn führen, lösen eine Steigerung der Makromolekülpermeabilität aus (Hempel, Noll et al. 1996).

cAMP ist ein second messenger, der überall im Körper vorkommt. Seine Aufgabe ist unter anderem, extrazelluläre Signale an intrazellulär gelegene Effektor-Proteine weiterzuleiten. Die Synthese von cAMP erfolgt durch die Adenylatzyklase, welche über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert wird. Ein zentrales Effektorprotein ist die Proteinkinase A (PKA), welche ein Schlüsselenzym bei der Aktivierung anderer Proteine darstellt. cAMP bindet dazu an die regulatorischen Untereinheiten der PKA, was zu einer Dissoziation der katalytischen Untereinheiten führt. Diese wiederum sind dann in der Lage ihre Zielproteine zu aktivieren, indem sie deren Serin-Reste phosphorylieren. PKA aktiviert weitere sogenannte *downstream targets*, welche

## Einleitung

ihrerseits eine Veränderung im Metabolismus, der Signal-Weiterleitung oder Apoptose bewirken.

Vorherige Arbeiten der Arbeitsgruppe konnten bereits an kultivierten mikrovaskulären koronaren Endothelzellen von Ratten zeigen, dass der cAMP/PKA Signalweg gegensätzliche Effekte auf die Regulation der Barrierefunktion hat (Bindewald K., Neumann J. 2004). Zum einen bewirkt PKA eine Inaktivierung des kontraktile Apparates, was die Abdichtung der Endothelschranke begünstigt. Zum anderen provoziert der cAMP/PKA-Signalweg den Zerfall von zellulären Adhäsionskomplexen. Letzterer Effekt überwiegt und bewirkt den Anstieg der Endothelpermeabilität.

In vielen Zellen führt ein Anstieg der cAMP-Konzentration auch zu einer Aktivierung der Transkription von spezifischen Zielgenen, die eine regulatorische Sequenz, cAMP response element (CRE), enthalten. Die PKA trägt das Signal zum Zellkern und phosphoryliert dort einen Transkriptionsfaktor (CREB oder ATF), was die Aktivierung des Zielgens induziert. Die Phosphorylierung von CREB und ATF kann deshalb auch als ein endogener Parameter zur Bestimmung der PKA-Aktivität herangezogen werden.

Ebenfalls zu der Gruppe der PKA-Zielproteine gehören die Rho-GTPasen. Diese sind Mitglieder der RAS-Superfamilie, den monomeren 20 – 30 kDa großen GTP-bindenden Proteinen. Hauptaufgabe der Rho-GTPasen ist die Regulierung des Aktinzytoskeletts. RhoA agiert dabei z.B. als molekularer Schalter, indem es zwischen aktiviertem GTP-gebundenen und deaktiviertem GDP-gebundenen Zustand wechselt. Im aktivierten Zustand ist RhoA in der Lage mit Zielmolekülen zu interagieren und dadurch weitere Signalwege zu starten. Intrinsische GTPase-Aktivität lässt RhoA wieder in seinen inaktivierten Zustand zurückkehren und beendet dadurch die Signaltransduktion.

Das Exoenzym C3-Transferase (C3T) ist eine ADP-Ribosyltransferase, die selektiv RhoA-, RhoB- und RhoC-Proteine ribosyliert und dadurch inaktiviert. Im Gegensatz dazu ist die Affinität gegenüber anderen Mitgliedern der Rho-Familie, wie CDC42 oder Rac 1, sehr gering. Deshalb stellt C3T ein sehr potentes Mittel dar, um den RhoA-Signalweg spezifisch zu hemmen.

Die Serin/Threonin-Kinase ROCK ist ein Effektorprotein von RhoA und spielt beim RhoA-induzierten Aufbau von Stressfasern und Fokaladhäsionsstrukturen eine

## Einleitung

entscheidende Rolle (Bishop, Hall 2000). ROCK wird durch RhoA in seiner GTP-gebundenen Form aktiviert. Wird es Rho-unabhängig aktiviert, imitiert es die Wirkung von Rho A - ein Hinweis dafür, dass Rho-induzierte Änderungen im Aktin-Zytoskelett über ROCK vermittelt werden (Leung, Chen et al. 1996).

Zwei Enzyme sind von zentraler Bedeutung für die Aktivität des kontraktile Apparates der Endothelzellen (Goeckeler and Wysolmerski 1995): die  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin abhängige Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) und die Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP). Sie regulieren den Phosphorylierungszustand der leichten Myosinkette (MLC) und damit den Kontraktionszustand des Aktin-Zytoskeletts. Phosphorylierte MLC ihrerseits aktiviert die Myosin II-ATPase, was die Kontraktion des Aktinzytoskeletts zur Folge hat.

In der Regulation der beiden Schlüsselenzyme spielen wiederum zwei Signalwege eine bedeutende Rolle: Aktivierung von RhoA/Rock bewirkt eine Hemmung der MLCP. Es ist gezeigt worden, dass Mediatoren wie z.B. Thrombin über diesen Weg die MLC-Dephosphorylierung drosseln und damit die kontraktile Aktivierung der Endothelzellen steigert (Essler et al. 1998; van Nieuw Amerongen et al. 1998).

Zum anderen bewirkt ein Anstieg von cAMP eine Hemmung der MLCK und eine Aktivierung der MLCP. Die Phosphorylierung von MLC nimmt in dem Zusammenhang ab. Es ist gezeigt worden, dass Agonisten, die die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöhen, die isometrische Kraftentwicklung sowohl von glatten Muskelzellen als auch von Endothelzellen reduzieren (Word, Casey et al. 1991; Mcdaniel, Rembold et al. 1994; Noll, Schafer et al. 2000; Noll, Schäfer et al. 2000)

Bisherige Studien an glatten Muskelzellen, die die Wirkung von cAMP auf die MLCK-Hemmung untersuchten, konzentrierten sich hauptsächlich auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -senkenden Effekt. Es ist gut belegt, dass cAMP seine MLCK-inaktivierende Wirkung über Senkung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels ausüben kann (Somlyo, Somlyo 1994). Dies wird durch verschiedene Mechanismen erreicht. So ist z.B. cAMP in der Lage die Stimulation der Phospholipase C zu blockieren. Dies verhindert die Bildung von Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ).  $\text{IP}_3$  kann folglich nicht von der Plasmamembran zum endoplasmatischen Retikulum diffundieren und dort die  $\text{IP}_3$ -abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle öffnen.

Zwei Substrate von ROCK, MLC und die regulatorische Myosin-bindende Untereinheit (MYPT1) der MLCP, nehmen bei der Regulation der Anordnung der

## Einleitung

Aktin-Myosin-Filamente eine Schlüsselposition ein. MYPT1 wird ROCK-abhängig an der Aminosäure Threonin (Thr) 850, welche als Bindungsstelle fungiert, phosphoryliert (Kawano, Fukata et al. 1999; Härtel, Rodewald et al. 2007). Phosphorylierung von MYPT1 führt zu einer Deaktivierung der MLC-Phosphatase (Ichikawa, Ito et al. 1996). Folge ist eine zunehmende MLC-Phosphorylierung und konsekutiv eine Zellkontraktion (Sward, Dreja et al. 2000).

Ein weiteres Zielprotein von ROCK ist die LIM-Kinase 2 (LIMK2). ROCK phosphoryliert direkt Thr 505 im aktiven Zentrum von LIMK2 und stimuliert dadurch dessen Aktivierung. Aktivierte LIMK2 wiederum ist in der Lage Kofilin zu phosphorylieren und damit zu inaktivieren (Moriyama, Iida et al. 1996). Kofilin ist ein kleines Aktin-depolymerisierendes Protein (Bamburg 1999), das ein wichtiges Effektorprotein im Zusammenhang mit der Reorganisation des Aktinzytoskeletts darstellt (Sumi, Matsumoto et al. 2001). Kofilin bindet an die Aktin-ADP-Untereinheit von F-Aktin und sorgt dabei für eine Depolymerisierung am Minusende des Filaments (Bamburg 1999), was zu einer Aktin-Destabilisierung führt.

## 1.3 Intermedin

### 1.3.1 Ein neues Protein

Intermedin (IMD) ist ein neues Mitglied der Calcitonin / *Calcitonin-gene-related peptide* (CGRP)-Familie. 1983 entdeckte man, dass das Calcitonin-Gen der Ratte zwei unterschiedlich lange Aminosäureketten kodiert: Calcitonin, bestehend aus 32 Aminosäuren und CGRP, bestehend aus 37 Aminosäuren. Die Peptid-Superfamilie wurde mit der Entdeckung von Amylin, einem Peptid mit der identischen Größe von CGRP, welches aus Amyloid-Ablagerungen im Pankreasgewebe von Diabetikern entnommen wurde (Rink, Beaumont et al. 1993) und Adrenomedullin (ADM), bestehend aus 52 Aminosäuren, welches aus einem menschlichen Phäochromozytom entnommen wurde (Kitamura, Kangawa et al. 1993), erweitert.

Calcitonin hemmt den Knochenabbau. ADM und CGRP spielen eine wichtige Rolle in der endokrinen und neurokrinen Regulation der Homöostase des vaskulären und respiratorischen Systems. Amylin hingegen ist wichtig zur Aufrechterhaltung des optimalen Glukose-Metabolismus.

## Einleitung

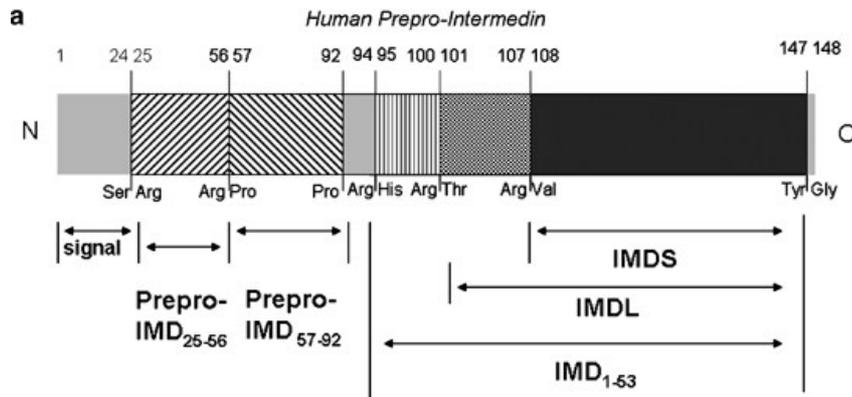
Roh et al. untersuchten die Genomsequenzen von Mensch, Säugetieren und wirbellosen Tieren und entdeckten dabei ein neues Peptid, welches in der Aminosäuresequenz eine Homologie von < 20% gegenüber der der bereits bekannten Mitglieder der Peptidfamilie aufwies. Aufgrund der auffällig starken Produktion des neu entdeckten Peptids innerhalb des intermediären Hypophysenlappens nannte die Gruppe es „Intermedin“ (Roh, Chang et al. 2004).

Zur gleichen Zeit verglichen Ogoshi et al. die cDNA-Bibliothek einer Ratte mit der cDNA vom Kugelfisch. Dabei entdeckten sie ein Peptid, bestehend aus 47 Aminosäuren, welches eine Übereinstimmung von 33% gegenüber Adrenomedullin aufwies, und daher als „Adrenomedullin 2“ bezeichnet wurde (Ogoshi, Inoue et al. 2003). Spätere Untersuchungen, in denen die Vorläuferproteine von IMD und Adrenomedullin 2 miteinander verglichen wurden, ergaben, dass es sich um dieselben Peptide handelte.

### 1.3.2 Synthese und Struktur von Intermedin

Die Gensequenz für das aus 148 Aminosäuren bestehende Intermedin-Vorläuferprotein liegt beim Menschen auf dem distalen Arm von Chromosom 22q3. Aminosäurepaare finden sich bei Arg100-Thr101 und Arg107-Val108 (siehe Abb. 1.1). Durch proteolytische Spaltung an diesen Orten sowie eine zusätzliche Spaltung an Tyr147-Gly148 und einer Amidierung der Aminosäure am C-Terminus erhält man eine lange Form des Peptids, bestehend aus 47 Aminosäuren (IMD<sub>1-47</sub>) und eine kurze Form, bestehend aus 40 Aminosäuren (IMD<sub>8-47</sub>). Der Vergleich orthologer Intermedine ergab, dass zwar der Ort der N-terminalen Basenspaltung zwischen den unterschiedlichen Arten variiert, die Spaltung von Arg107-Val108 aber erhalten geblieben ist. Diese Tatsache weist auf eine wichtige physiologische Rolle der kurzen Intermedin-Form hin (Roh, Chang et al. 2004). Yang et al. entdeckten kurz danach eine weitere Spaltung im Intermedin-Vorläuferprotein der Ratte (Arg92-His93), welche auf das Vorhandensein einer weiteren, größeren Intermedin-Form hinweist: IMD<sub>1-53</sub>. Dieses Peptid besitzt genauso wie die beiden anderen IMD-Formen biologische Aktivität (Yang, Qi et al. 2005).

## Einleitung



**Abb. 1.1** Schematische Darstellung des humanem Intermedin-Vorläuferprotein und dessen Fragmente nach Prozessierung an den angezeigten Spaltstellen nach (Bell, McDermott 2008)

### 1.3.3 Vorkommen im Gewebe und Plasma

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass IMD in unterschiedlichen Organen synthetisiert wird. Roh et al. konnten das neue Protein mittels PCR-Analyse vor allem in der Hypophyse und im Gastrointestinaltrakt von unterschiedlichen Spezies nachweisen (Roh, Chang et al. 2004). Taylor et al. fanden IMD ebenfalls in Lunge, Nieren, Thymus, Gastrointestinaltrakt und Gehirn von Ratten. Höchste Konzentrationen wurden im Magen und den Nieren gemessen (Taylor, Bagley et al. 2005). Untersuchungen am Herzen und an den Nieren von Mäusen ergaben den Nachweis von IMD sowohl in den Endothelzellen der Koronararterien als auch den Glomeruli und Vasae rectae (Takei, Hyodo et al. 2004), was die Vermutung zuließ, dass IMD eine Rolle in der Kreislaufregulation spielen könnte. Die Verteilung von IMD im menschlichen Körper verhält sich ähnlich wie die bei Säugetieren. Höchste Konzentrationen befinden sich im Hypothalamus und der Hypophyse, den Tubuluszellen der Nieren und den Myokardzellen, vor allem des linken Ventrikels. Immunhistochemische Analysen im Endokard oder perikardialem Fettgewebe ergaben hingegen keinen IMD-Nachweis (Takahashi, Kikuchi et al. 2006).

Morimoto et al. 2007 entwickelten einen für IMD spezifischen Antikörper mit höherer Sensibilität. Mit Hilfe des neu entwickelten Antikörpers konnten sie zusätzlich IMD in den Adipozyten des menschlichen Perikards, den Endothelzellen der Perikardvenen, den Nierenarteriolen und dem Gefäßendothel der glatten Muskulatur in

## Einleitung

Herzkoronararterien nachweisen. Hierbei ergaben die Konzentrationen für den linken Ventrikel des Herzens  $0.251 \pm 1.18$  pmol/g und die Plasmakonzentration  $24.7 \pm 1.78$  pmol/l Nassgewicht (Morimoto, Satoh et al. 2007).

Das hohe Vorkommen von IMD im Hypothalamus und der Hypophyse lässt eine Beteiligung an der Regulation von Durst sowie Wasser- und Elektrolythaushalt vermuten (Taylor, Bagley et al. 2005). Die Anwesenheit des Peptids im Magen und Darm spricht für eine Funktion als Neurotransmitter oder parakriner Mediator der gastrointestinalen Regulation (Roh, Chang et al. 2004). Der Ursprung des Plasma-Intermedins ist unklar, vermutet wird eine Sekretion durch die Hypophyse. Hohe IMD-Konzentrationen im renalen Tubulussystem könnten im Zusammenhang mit der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes und dem Blutkreislaufvolumen stehen.

### 1.3.4 Rezeptor-Pharmakologie und -Expression

Die biologische Aktivität der Calcitonin / CGRP-Peptid-Superfamilie wird über zwei miteinander eng verwandte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR, engl. *G-protein coupled receptor*) vermittelt: dem *Calcitonin receptor* (CTR) und dem *Calcitonin receptor-like receptor* (CRLR). Beide Rezeptoren sind Zelloberflächen-Rezeptoren, die ein durch Liganden-Bindung erfolgtes Signal über ein gebundenes Guaninnukleotid-bindendes Protein (G-Protein) übermitteln. Zwischen beiden Rezeptoren besteht sowohl bei der Ratte als auch beim Menschen eine Homologie der Aminosäuren-Sequenz von 50% bzw. 54%. Calcitonin entfaltet seine Wirkung durch Bindung an den CTR. Die dem Calcitonin verwandten Peptide (CGRP, ADM) hingegen benötigen eines von drei sogenannte „*receptor-activity-modifying proteins*“ (RAMP), um am Rezeptor binden zu können (Fischer, Muff et al. 2002).

RAMPs sind Chaperone, die für die funktionelle Expression des CRLR an der Zelloberfläche benötigt werden. Sie bestimmen die Art der Glykosidierung und die pharmakologischen Eigenschaften des Rezeptors. RAMP1 ist ein Protein, bestehend aus 148 Aminosäuren (AS), mit einem Signal-Peptid aus 26 AS am N-terminalen Ende, einer extrazellulären Domäne aus etwa 90 AS, einer einzelnen transmembranen Domäne aus 20 AS und einem Schwanz, bestehend aus 10 AS, am C-terminalen Ende (Fischer, Muff et al. 2002). Ein weiteres sogenanntes *receptor component protein* wird für die CRLR-vermittelte Signaltransduktion benötigt. Es ist

## Einleitung

ein 148 AS langes intrazelluläres Protein und stellt die dritte Komponente des Rezeptor-Komplexes dar (Prado, Evans-Bain et al. 2002).

Entscheidend für die Interpretation der physiologischen Rolle von IMD ist unter anderem auch das Wissen über die zelluläre Expression des Rezeptor-Proteins sowie der RAMPs. Der CRLR wird überall im Körper gebildet, überwiegend jedoch im zentralen Nervensystem, dem Kardiovaskulärsystem, der Lunge, dem Gastrointestinaltrakt und dem Immun- und endokrinen System (Hagner, Stahl et al. 2002; Cottrell, Roosterman et al. 2005).

CRLR befinden sich überall im Gefäßsystem, wobei die Häufigkeit des Rezeptors auffälligerweise mit Zunahme des Gefäßlumens abnimmt. Weiter scheint der CRLR auf das Gefäßendothel beschränkt zu sein. Im venösen System findet man höhere Konzentrationen von CRLR als im arteriellen, abgesehen vom respiratorischen System, wo sich das Verhältnis umgekehrt verhält (Hagner, Stahl et al. 2002). Ebenfalls konnten CRLR-Rezeptoren in den Endothelzellen, der glatten Gefäßmuskulatur (Totsune, Takahashi et al. 2000), im Vorhof, im Ventrikel (Cueille, Pidoux et al. 2002) und in den Kardiomyozyten (Autelitano, Ridings 2001; Pan, Jiang et al. 2006) nachgewiesen werden.

RAMP1, -2 und -3 finden sich in den Endothelzellen von Aorta (Muff, Leuthauser et al. 1998). Nagae, Mukoyama et al. wiesen nach, dass die Familie der RAMP-Gene in fast in allen Gewebearten vorkommt (2000). Allerdings scheint bei der Häufigkeit der drei RAMPs eine gewisse Gewebespezifität zu bestehen. RAMP1 ist vor allem im Gehirn, epididymalen Fettgewebe, Thymus, in der Milz und Aorta nachzuweisen. RAMP2 befindet sich hauptsächlich in Lunge, Milz, Fettgewebe, Aorta, Herz und Niere. RAMP3-Konzentrationen sind auffällig hoch in den Nieren, abgesehen davon aber auch in kleinerem Ausmaß in Lunge, Fettgewebe und Gehirn zu finden. Da das Vorkommen von RAMP3 insgesamt geringer als das der beiden anderen RAMPs ist, lässt sich vermuten, dass RAMP1 und RAMP2 eine größere physiologische Rolle spielen. RAMP3 hingegen scheint eine wichtigere Rolle in Lungen- und Nierengewebe zu spielen (Nagae, Mukoyama et al. 2000) und geht in aortalen Endothelzellen leichter Bindungen mit dem CRLR ein als RAMP1 und RAMP2 (Muff, Leuthauser et al. 1998).

## Einleitung

Die Untersuchung menschlichen Gewebes ergab ebenfalls eine weite, vergleichbar starke Verbreitung aller drei RAMP-Proteine (Mclatchie, Fraser et al. 1998). Auffällig ist unter anderem die hohe Konzentration aller drei RAMPs im kardialen Gewebe. Insgesamt lässt sich im Bezug auf das kardiovaskuläre System sagen, dass die Verbreitung sowohl von Rezeptoren als auch der Rezeptorkomponenten die Verteilung der einzelnen Peptide der Peptid-Superfamilie widerspiegeln. CGRP-Bindung ist auffällig oft in Intima und Media von kleineren Blutgefäßen, Herzklappen, Vorhof- und Ventrikulgewebe zu finden (Bell, Mcdermott 1995). ADM kommt vorherrschend in Gefäßendothel, besonders von Mikrogefäßen, vor (Ishimitsu, Ono et al. 2006).

### 1.3.5 Rezeptor-Affinität

Abhängig davon, mit welchem der drei RAMPs der CRLR einen Komplex bildet, entstehen unterschiedlich starke Rezeptoraffinitäten der einzelnen Peptid-Familienmitglieder. Komplexbildung mit RAMP1 führt zu einer starken CGRP-Affinität. Adrenomedullin bindet leichter an CRLR-Komplexe mit RAMP2 oder RAMP3.

**Tabelle. 1.2:**

<b>Ligand</b>	<b>Rezeptor</b>	<b>RAMP</b>
CT	CTR	–
CGRP und Amylin	CTR	1
Amylin	CTR	3
CGRP	CRLR	1
ADM	CRLR	2
ADM and CGRP	CRLR	3

Liganden-Spezifität des CTR, des CRLR und der CRLR/RAMP-Komplexe.

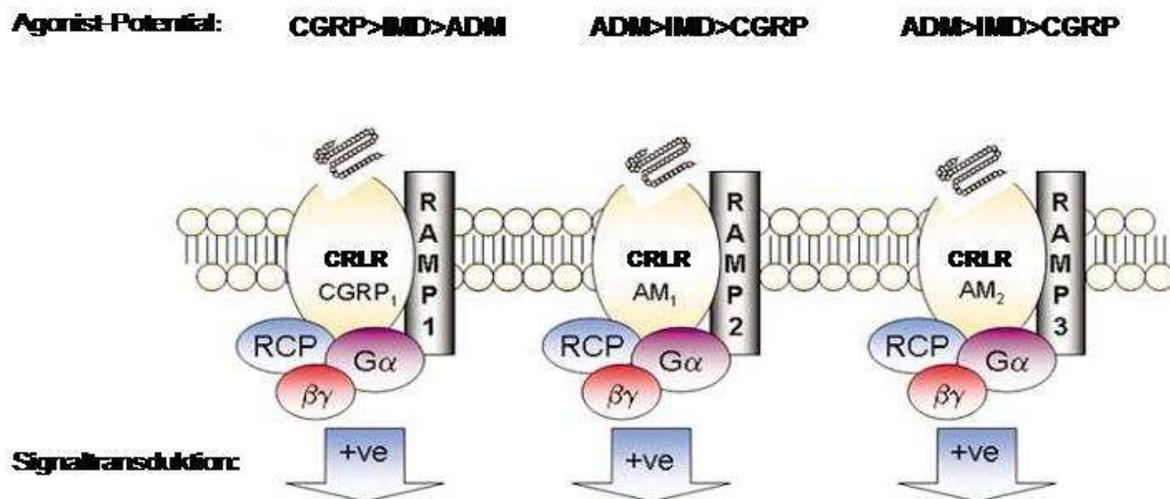
CTR = calcitonin receptor; CT = calcitonin; CGRP = calcitonin gene related peptide;

AM = Adrenomedullin; CRLR = calcitonin receptor-like receptor

(Fischer, Muff et al. 2002)

## Einleitung

IMD hingegen ist ein nicht-selektiver Agonist des CRLR/RAMP-Rezeptor-Komplexes (Roh, Chang et al. 2004).



**Abb. 1.3:** CGRP, ADM, und IMD teilen sich die gleiche Familie von G-Protein-assoziierten Rezeptoren, die sich durch die Bindung zwischen dem *Calcitonin-Receptor-Like Receptor* (CRLR) und einem der drei *receptor activity-modifying protein* (RAMPs) bilden. Für eine optimale Signaltransduktion ist ebenfalls ein *receptor component protein* (RCP) erforderlich. Pharmakologische Eigenschaften und mögliche Signalmechanismen eines jeden der drei Rezeptor-Subtypen sind angedeutet.  $G\alpha$  = heterotrimeres G-Protein;  $\beta\gamma$  = Beta- und Gamma-Untereinheiten. Aus: Bell and McDermott 2008

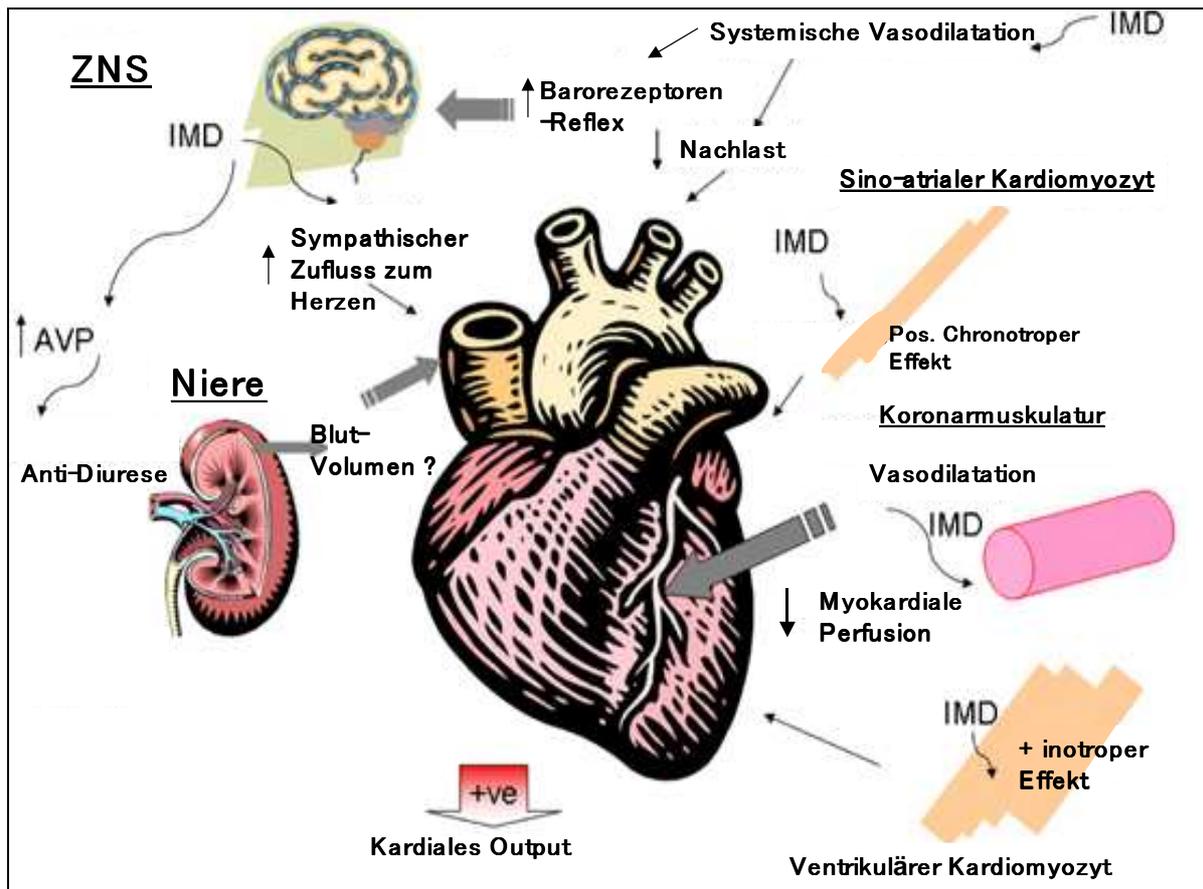
### 1.3.6 Hämodynamischer Effekt von Intermedin

In den vergangenen Jahren wurden bereits einige Studien an Tieren durchgeführt, die den Effekt von IMD auf den mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) und die Herzfrequenz untersucht haben. Die intravenöse Applikation von IMD bewirkt einen deutlichen Abfall des MAP (Chang, Roh et al. 2004; Kobayashi, Liu et al. 2004; Roh, Chang et al. 2004; Pan, Yang et al. 2005; Taylor, Bagley et al. 2005; Fujisawa, Nagai et al. 2006; Ren, Yang et al. 2006; Fujisawa, Nagai et al. 2007). Am isoliert-perfundierten Rattenherz steigert IMD die Herzfrequenz, was für eine direkt chronotrope Wirkung spricht (Pan, Yang et al. 2005). Die stärkste hypotensive Wirkung wird 15 Minuten nach Applikation erreicht, eine Wirkungsabschwächung tritt nach 45 Minuten ein. Die hypotensive Wirkung von  $IMD_{1-47}$  übertrifft die von  $IMD_{1-53}$  und AM (Ren, Yang et al. 2006). Ein Hinweis dafür, dass die kurze IMD-Form die stärkere biologische Aktivität besitzt.

## Einleitung

IMD erhöht ebenfalls die Auswurfleistung des Herzens und senkt den totalen peripheren Widerstand. Die prozentuale Verteilung der kardialen Auswurfleistung verändert sich nach IMD-Applikation zu Gunsten von Leber, Nieren und Dünndarm. IMD erhöht zusätzlich zu den genannten Organen die Blutflussrate in Herz und Milz. In Mesenterium und Skelettmuskulatur ist eine Abnahme der Blutflussrate durch IMD zu beobachten (Fujisawa, Nagai et al. 2007). Der auffällig starke Anstieg der Blutflussrate in den Nieren lässt sich wahrscheinlich durch die hohe IMD-Konzentration im Nierengewebe erklären. Insgesamt lässt sich aufgrund der Tatsache, dass IMD zwar den MAP senkt, aber die Blutflussrate in bestimmten Organen dennoch steigert, darauf schließen, dass IMD die Blutgefäße dilatiert (Fujisawa, Nagai et al. 2006).

IMD erhöht die Sympathikus-Aktivität in den Nieren. Sinuaortale Denervierung hat auf diese gesteigerte Sympathikusaktivität nur geringen Einfluss. Dies lässt darauf schließen, dass Herzfrequenz und die Sympathikusaktivität nicht unter einem direkten IMD-Einfluss stehen, sondern dass die Steigerung beider Faktoren eine reflektorische Antwort auf die hypotensive Wirkung des Peptids darstellt (Fujisawa, Nagai et al. 2006). Yang et al. 2005 wiesen nach, dass die Perfusion von isolierten Rattenherzen mit IMD<sub>8-47</sub> kontinuierlich die Herzkontraktilität verbessert und die Koronararterien dilatiert. Dies ist ein Hinweis auf eine positiv inotrope Wirkung (Yang, Qi et al. 2005). Wird IMD hingegen intrazerebroventrikulär statt intravenös verabreicht, hat es einen gegenteiligen Effekt auf die Hämodynamik. Es kommt in diesem Fall zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg von MAP und Herzfrequenz (Taylor, Bagley et al. 2005; Ren, Yang et al. 2006).



**Abb. 1.4:** Direkte und indirekte Wirkungen von Intermedin (IMD) auf das kardiovaskuläre System. IMD übt direkt chronotrope und inotrope Wirkungen auf das Herz aus. Die vasodilatatorische Wirkung auf die Koronargefäße verstärkt die myokardiale Perfusion und erhöht dadurch indirekt die Kontraktilität. Die systemische Vasodilatation senkt die Nachlast und aktiviert die Barorezeptoren. Dies führt zu einer Aktivierung des Sympathikus, was ebenfalls die Kontraktilität steigert. Die zentrale IMD-Wirkung und die lokale Wirkung auf die Nieren steigert das Blutvolumen, welches wiederum den venösen Rückfluss und den kardialen Auswurf beeinflusst. Aus: Bell and McDermott 2008.

### 1.3.7 Pathophysiologische Bedeutung von Intermedin

Die Funktion von IMD im Organismus ist noch nicht vollständig geklärt. Da die dem IMD verwandten Peptide ADM und CGRP wichtige Rollen in der endokrinen und neurokrinen Regulation der Gewebemöostase sind, vermutet man bei IMD ähnliche Aufgaben.

Ratten, die chronisch mit Isoprenalin behandelt wurden, entwickelten eine Hypertrophie des Myokards, welches verstärkt IMD bildet (Pan, Yang et al. 2005). Kardiomyozyten, die unter Stickstoffmonoxid-Mangel leiden, bilden verstärkt ADM, IMD und RAMPs. Unter Normalisierung des Blutdrucks sinkt die Konzentration von ADM, RAMP2 und RAMP3 wieder. IMD und RAMP1 bleiben hingegen erhöht, was für eine Regulation unabhängig vom Blutdruck spricht. Stattdessen scheint die

## Einleitung

Bildung von IMD und RAMP1 innerhalb des Myokards direkt durch oxidativen Stress induziert zu sein (Bell, Zhao et al. 2007). Dies weist auf eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit Herzerkrankungen hin, die durch oxidativen Stress hervorgerufen werden.

In gesunden Rattenherzen hat IMD keinen Einfluss auf die Proteinsynthese, es verhindert jedoch die Proteinsynthese in Kardiomyozyten als Antwort auf einen hypertrophischen Stimulus (Pan, Yang et al. 2005). Man vermutet, dass IMD eine wichtige Funktion in der Gegenregulation von hypertrophem Wachstum einnimmt. Die Herzen von Ratten mit kongestiver Herzinsuffizienz wurden auf verstärkte IMD-Bildung untersucht. Deutliche Anstiege von IMD mRNA wurden im Vorhof, rechtem Ventrikel und sowohl im nicht infarzierten als auch im infarzierten Gewebe des linken Ventrikels gefunden (Hirose, Totsune et al. 2008).

Bisher zielte die überwiegende Zahl der Untersuchungen auf die Analyse von IMD-Wirkungen auf Kardiomyozyten und Glattmuskelzellfunktionen ab. Über direkte Wirkungen von Intermedin auf koronare Endothelzellen und die endotheliale Schrankenfunktion ist bisher nichts bekannt.

## 2. Fragestellung

Der aktuelle Stand der Forschung legt nahe, dass Intermedin eine wichtige Rolle als Regulator des kardiovaskulären Systems spielt. Diese vorliegende Arbeit befasst sich mit der Wirkung von IMD auf die Schrankenfunktion speziell des koronaren Gefäßendothels der Ratte unter physiologischen Bedingungen. Es wird vermutet, dass IMD die Makromolekülpermeabilität des mikrovaskulären koronaren Endothels erhöht und damit die pathophysiologische Entwicklung bei koronarer Herzkrankheit beeinflusst. Im Einzelnen wurde folgenden Fragen nachgegangen.

1. Welche Wirkung hat IMD auf die Barriere-Funktion der mikrovaskulären Endothelzellen?
2. Über welche Rezeptor-vermittelte Signalkaskade beeinflusst IMD die endotheliale Schrankenfunktion, und welche Rolle spielen die beiden Schlüsselenzyme Rho A und ROCK im Signalweg von Intermedin?
3. Welchen Einfluss hat IMD auf das Aktinzytoskelett?
4. Welche Beteiligung hat MYPT1 am IMD-Signalweg?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

Acrylamid-Pulver	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	SERVA, Heidelberg
Basismedium <sup>®</sup> Satz M199	PromoCell, Heidelberg
Benzonase <sup>®</sup>	Calbiochem, Bad Soden
Bisacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromophenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
C3T	Cytoskeleton, USA
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Calyculin A	Calbiochem, Bad Soden
á-CGRP <sub>(8-37)</sub> (Ratte)	Bachem, Weil am Rhein, Schweiz
<i>Complete</i> <sup>®</sup> Hemmer Cocktail	Roche, Mannheim
Diethylether	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol	Amersham Pharmacia, UK
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
EGTA	Boehringer, Mannheim
Einweg-Zellschaber	Becton Dickinson, Heidelberg
FCS PAA	Pasching, Österreich
Gentamycin	Gibco BRL, Eggenstein
Glycerol (100%)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
H89	Calbiochem, Bad Soden
HBSS PAA	Pasching, Austria
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Intermedin	Bachem, Weil am Rhein, Schweiz
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesium Chlorid	Fluka, Schweiz

## Material und Methoden

â-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Millipore Wasser	Millipore, Eschborn
Natriumbikarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schuell, Dassel
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
PMSF	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S Lösung	SERVA, Heidelberg
Rhotekin-Rho-binding-domain	Upstate, Charlottesville, USA
Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
See Blue <sup>®</sup>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Super signal-west <sup>®</sup> (ECL Lösung)	Thermofischer Niederlassung
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton X-100	SERVA, Heidelberg
Trypsin-EDTA	Gibco-BRL, Eggenstein
Tween 20	Amersham Pharmacia, UK
Y27632	Calbiochem, Bad Soden

### 3.1.2 Antikörper

#### Primärantikörper:

Phospho-CREB (Kaninchen, IgG-HRP, polyklonal)	Cell Signaling, Houston, USA
Phospho-Cofilin (Kaninchen IgG, polyklonal)	Upstate, Charlottesville, USA
Phospho-MYPT850 (Kaninchen IgG polyklonal)	Upstate, Charlottesville, USA
RhoA (Maus IgG monoklonal)	Santa Cruz Biotechnology, HD
Vinculin (Maus IgG monoklonal)	Sigma, Steinheim

## Material und Methoden

Sekundär-Antikörper (Peroxidase (HRP)-gekoppelt):

Anti Maus IgG	BD Bioscience, Heidelberg
Anti Maus IgM	Sigma, Steinheim
Anti Kaninchen IgG	Upstate, Charlottesville, USA

### 3.1.3 Lösungen und Puffer

#### 2x-SDS Probenpuffer

Tris.HCl	250 mM
Glycerol	20 %(wt/vol)
SDS	4 % (wt/vol)
DTT	1 mM (wt/vol)
Mercaptoethanol <sup>®</sup>	5 % (vol/vol)
Cantharidin	10 $\mu$ M
Bromophenol Blue	0.001 % (wt/vol)

#### TBS Tween (TBST)

1x TBS	1000 ml
Tween 20	1 ml (0.1%, vol/vol)

#### 10x TBS Puffer

Tris / HCl (pH 7.4)	100 mM
NaCl	1,6 M

#### 10x PBS

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1 M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17 mM
NaCl	1.37 M
KCl	27 mM

## Material und Methoden

### **Lysis-Puffer (Immunhistochemie)**

Tris/HCl pH 7.4)	50 mM
NaCl	150 mM
Triton X-100	1 % (vol/vol)
Nonidet P - 40	0.5 % (vol/vol)
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
NaF	20 mM
Na-orthovanadate	1.5 mM
DTT	10 mM
PMSF	0.5 mM
Complete® Protease Hemmer Cocktail	

### **RhoA pulldown assay**

#### **Lysis-Puffer**

HEPES	25mM
NaCl	150 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
EDTA	1 mM
NaF	10 mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	2 mM
DTT	5 mM
Tritone-X100	0.5% (vol/vol)
Glycerol	2 % (vol/vol)
PMSF	0.5 mM
Complete® Protease Hemmer Cocktail	

#### **Wasch-Puffer**

Tris/HCl (pH 7.4)	25mM
Triton X-100	1% (vol/vol)
NaCl	150 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
PMSF	0.5 mM
Complete® Protease Hemmer Cocktail	

### 3.1.4 Versuchstiere

Für die Versuche wurden koronare Endothelzellen aus 200 – 250 g schweren und ca. 3 Monate alten, männlichen Wistar-Ratten isoliert. Die Tiere stammen aus der Zucht des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen. Im Tierstall war der freie Zugang zu Wasser und fester Nahrung (Standardfuttermittel Altromin®) jederzeit gewährleistet. Die Haltung der Tiere entspricht dem “*Guide for Care and Use of Laboratory Animals*” (NIH publication No.85-23).

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur: Isolierung von Ratten-Endothelzellen

Nährmedium:	M199 CO <sub>2</sub> ; 352 ml + 20 % Mix (NCS / FCS) + 2 % Penicillin / Streptomycin
Präparationsmedium:	Powell-Medium, pH 7.4 NaCl (85 mmol/l) KCl (2,6 mmol/l) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,2 mmol/l) MgCl <sub>2</sub> * H <sub>2</sub> O (1,2 mmol/l) NaHCO <sub>3</sub> (25 mmol/l) Hepes (25 mmol/l) Glucose (11 mmol/l)
Kollagenase Typ II:	250 µl (Konz. 0,1 g/ml Powellmedium)
Trypsin:	250 µl (Konz. 20 mg/ml Powellmedium → sterilfiltriert)
CaCl <sub>2</sub> (100 mM)	
Präparationsutensilien:	großes Uhrglas, Trichter, Unterlage für Chopper, Bauchdeckenschere, feine Schere, 2 Kapselpinzetten, 2 Krokodilklemmen

## Material und Methoden

Die Inbetriebnahme der Langendorff–Perfusionsanlage gehört zu den wichtigsten vorbereitenden Maßnahmen. Das zirkulierende Wasser in den Glasmänteln muss auf eine Temperatur von 37°C aufgeheizt werden. Der für die Perfusion vorhandene Kreislauf wird mit Aqua Bidest und anschließend mit Powell-Medium gespült. Es folgt das Befüllen der Anlage mit 80 ml Powell-Medium, das blasenfrei zirkulieren muss und während der gesamten Versuchsdauer mit Carbogen begast wird. Beträgt die Temperatur des Powell-Mediums im Perfusionskreislauf ebenfalls 37°C, kann mit der Präparation begonnen werden.

Die Versuchstiere werden mit Isofluran kurzzeitig narkotisiert und anschließend mittels Genickbruch durch Abknicken des Kopfes nach hinten mit plötzlichem Ruck getötet. Über eine dorsolaterale Thorakotomie wird der Brustkorb weiträumig eröffnet und das gesamte Herz-Lungen-Paket vorsichtig exzidiert. In einer Petrischale mit 4°C kalter physiologischer Kochsalzlösung werden Blut- und Gewebereste entfernt, die Lungen direkt am Hauptbronchus abgetrennt und anschließend die Trachea zusammen mit dem Ösophagus abpräpariert. Die Aorta wird möglichst distal mit der Pinzette gefasst und kurz hinter dem Abgang des Truncus anonymus durchtrennt.

Das Herz wird nun über den Aortenstumpf an dem Polyethylen-Konus der Langendorff-Anlage retrograd perfundiert. Mit einer Flussgeschwindigkeit von ca. 1 Tropfen pro s werden die Koronarien und die Herzkammern mit 40 ml Powell-Medium gespült. Anschließend wird der Perfusionskreislauf geschlossen, 10 ml einer Kollagenase-Stammlösung (s.u.) infundiert und für ca. 25 min rezirkulierend perfundiert. Über eine Peristaltikpumpe wird eine Flussrate von 1,5 ml pro min aufrechterhalten.

Kollagenase-Stammlösung:	Kollagenase 20 mg
	Powell-Medium 10 ml
	CaCl <sub>2</sub> (100 mmol/l) 12,5 µl

Nach der Enzymperfusion wird das Herz in eine Petrischale überführt, mit einem Skalpell von Vorhöfen, großen Gefäßen und Bindegewebe freipräpariert und in ca. 5 mm große Stücke zerschnitten. Es folgt die zweimalige mechanische Zerkleinerung des Ventrikelgewebes mit dem *Tissue Chopper* (Schnittbreite: 0,7 mm).

Für den jetzt folgenden Nachverdau wird der Zellbrei in ein mit 30 ml Perfusionsmedium gefülltes Teflongefäß überführt. Während des zehnmütigen

## Material und Methoden

Vorganges wird unter permanenter Carbogenbegasung durch kontinuierliches Auf- und Abpipettieren der Suspension eine zunehmende Auflösung des Gewebeverbundes erreicht.

Nach Beendigung des Nachverdaus wird die Zellsuspension durch eine Nylongaze (Porengröße 200  $\mu\text{m}$ ) filtriert und anschließend 3 min lang bei 400 U/min zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich Gewebetrümmer und Zelldetritus befinden, wird vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml Powell-Medium mit einem  $\text{CaCl}_2$ -Anteil von 200  $\mu\text{mol/l}$  aufgenommen. Diese Suspension wird für 2 min bei 400 U/min zentrifugiert. Das so gewonnene Zellpellet wird erneut in Powell-Medium mit einem  $\text{CaCl}_2$ -Anteil von 400  $\mu\text{mol/l}$  aufgenommen und zu einer homogenen Suspension aufgeschüttelt. Diese wird gleichmäßig in vorbereitete Reagenzgläser, die zu 2/3 mit Powell-Medium befüllt wurden, dekantiert. Die Reagenzgläser werden für 1 min bei 300 U/min zentrifugiert, die Endothelzellen befinden sich im Überstand.

### 3.2.2 Makromolekülpermeabilität von endothelialen Zellschichten

Zur Messung der endothelialen Zellschicht wurde ein Zweikammersystem, bestehend aus einem luminalen und einem abluminalen Kompartiment verwendet. Die Volumina der Kompartimente betragen 2,5 ml luminal bzw. 9,5 ml abluminal. Beide Kompartimente waren durch eine poröse Filtermembran getrennt, auf welcher die Endothelzellen bis zur Konfluenz kultiviert wurden.

In beiden Kompartimenten befand sich als Basismedium eine modifizierte Tyrode-Lösung (150 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1,3 mM  $\text{Ca}^{2+}\text{Cl}_2$  und 30 mM N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure; pH 7,4, 37°C) ergänzt durch 2% (V/V) hitzeinaktiviertes NCS (10 Minuten bei 55°C). Ein Rührfisch im abluminalen Kompartiment sorgte für die nötige Durchmischung, und es bestand keine hydrostatische Druckdifferenz zwischen den beiden Kompartimenten.

Die endotheliale Permeabilität wurde mittels Spektrophotometer (Specord 10, Zeiss Jena, Deutschland) bestimmt.

Gemessen wurde die Konzentration von Trypanblau-markiertem Albumin, welches zusätzlich in das luminale Kompartiment gegeben wurde (60  $\mu\text{M}$ ) und durch die Filtermembran in das abluminale Kompartiment diffundierte. Dazu wurde ein Teil

## Material und Methoden

des abluminalen Kompartimentes rezirkulierend über eine Druckflussküvette des Photometers gepumpt. Zur Vermeidung von Messartefakten wurde ein Zwei-Wellenlängen-Modus verwendet (Wellenlänge zur Messung von Trypanblau: 600 nm, versus Kontrollwellenlänge: 720 nm). Die Konzentration des Albumins im luminalen Kompartiment wurde alle 10 Minuten bestimmt und blieb während eines Experimentes nahezu konstant.

Der Albuminfluß ( $F$ , angegeben in mol / (sec x cm<sup>2</sup>)) durch die Endothelzellschicht mit der Fläche ( $S$ ) wurde bestimmt durch den Anstieg der Albuminkonzentration ( $d[A]_2$ ) während des Zeitintervalls ( $dt$ ) im abluminalen Kompartiment mit dem Volumen ( $V$ ):

$$F = \frac{d[A]_2 / dt \cdot V}{S} \quad (I)$$

Der Permeabilitätskoeffizient ( $P$  [cm/s]) der Kombination aus Zellschicht und Filtermembran wurde wie folgt berechnet:

$$P = \frac{F}{([A]_1 - [A]_2)} \quad (II)$$

wobei  $[A]_1$  und  $[A]_2$  die Albuminkonzentrationen im luminalen und abluminalen Kompartiment darstellen. Da die treibende Kraft ( $[A]_1 - [A]_2$ ) im Laufe des Experimentes praktisch konstant blieb, entsprechen die relativen Veränderungen von ( $F$ ) denen des Permeabilitätskoeffizienten ( $P$ ).

Die Polykarbonatfiltereinsätze mit den konfluenten Zellen wurden zunächst in die Permeabilitätskammern überführt und die basale Permeabilität der *Monolayer* für 20 min registriert.

### 3.2.3 Gelelektrophoretische Methoden

Probenvorbereitung:

Die Endothelzellen wurden ihrem Versuchsplan entsprechend isoliert, kultiviert und behandelt. Nach einmaligem Waschen mit HBSS wurden die Zellen mit 150 µl 2x-Laemmli-Puffer lysiert. Diesem waren kurz zuvor 50 U/ml Benzonase®, 10 mM DTT und 2 mM MgCl<sub>2</sub> zugegeben worden. Nun konnten die Zellen mittels eines Einmalschabers von der Kulturschale abgeschabt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt werden. Die vollständige Denaturierung der Proteine wurde durch 5-minütige Inkubation bei 95°C herbeigeführt. Die Proben standen nun zur sofortigen Verwendung zur Verfügung (s. Kap 4.6.2) oder konnten bei -20°C gelagert werden.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

Laemmli-Puffer:

Tris/HCl (pH 6.8)	250 mmol/l
Glycerin	20 %
SDS	4%
Â-Mercaptoethanol	5 %
Bromphenolblau	0,001%
DTT	1 mM
Cantharidin	10 µM

### 3.2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Das anionische Detergens SDS bindet an Proteine und überdeckt dadurch deren Eigenladung. Durch die Erhitzung der Proben werden die Proteine denaturiert, die Zugabe von Merkaptoethanol und DTT bricht zudem Disulfidbrücken. Die SDS-Protein-Komplexe verschiedener Proteine unterscheiden sich dadurch nur noch in ihrer Größe voneinander. Nun können die negativ geladenen Proteine bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld durch ein Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

## Material und Methoden

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde mittels eines modifizierten, diskontinuierlichen Verfahrens durchgeführt (Laemmli 1970). Zunächst wurden die zum Aufbau der Gelkammer benötigten Materialien gründlich gereinigt und mit 70%igem Ethanol entfettet. Das Gel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen. Hierfür wurde der Spalt zwischen den Platten auf jeder Seite durch einen *Spacer* begrenzt. Nach unten wurde der Spalt mit einem Gummischlauch abgedichtet. Dieser Schlauch wurde nun mit Zug auch entlang der *Spacer* gespannt, so dass der Spalt rundherum abgedichtet wurde. Zuletzt wurden die Platten mit Klammern an der Kammer befestigt. Nun konnte das Trenngel bis auf 2/3 der Höhe gegossen und mit Aqua Bidest überschichtet werden. Nach ca. zwei Stunden war das Trenngel vollständig polymerisiert. Nachdem das Wasser entfernt worden war, konnte nun das Sammelgel obenauf gegossen werden, der Gelkamm zur Formung der Taschen wurde sofort anschließend eingesetzt. Nach einer weiteren Stunde konnten der Gummischlauch sowie der Gelkamm entfernt und die Gelkammer in ein Gefäß mit Laufpuffer gestellt werden. Schließlich wurde die Kammer auch oben mit Laufpuffer befüllt, wobei darauf zu achten war, dass die Gele oben und unten gut bedeckt waren. Nachdem die Taschen mit Puffer ausgespült und alle Luftblasen entfernt worden waren, konnten die Gele mit den Proben beladen werden. Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins wurden 10%ige oder 12,5%ige Gele im Verhältnis Acrylamid/Bisacrylamid 30/1 verwendet. Die untenstehenden Angaben beziehen sich jeweils auf eine Menge, die zur Herstellung von zwei Gelen benötigt wurde.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden Hoch- und Niedrigmolekulargewichts-Marker verwendet. Die SDS-Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 40 Volt über Nacht durchgeführt. Der Lauf wurde zumeist kurz nach dem Auslaufen der Bromphenolblau-Lauffront gestoppt.

<u>Trenngel:</u>	10 %:	12,5 %:
AA (40 %) / Bisacr.(2 %)	10 ml (30:1)	12,5 ml (100:1)
Trenngelpuffer	7,5 ml	7,5 ml
aqua bidest	12,5 ml	10,0 ml
APS 10% (wt/vol)	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
TEMED	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l
SDS 10% (wt/vol)	300 $\mu$ l	300 $\mu$ l

## Material und Methoden

### Trenngelpuffer:

Tris/HCl (pH 8,8)                      1,5 mol/l

### Sammelgel 6%:

AA/BA (30:1)                              4 ml  
Sammelgelpuffer                          5 ml  
aqua bidest                                 10,4 ml  
APS 10% (vol/vol)                        250  $\mu$ l  
TEMED                                        25  $\mu$ l  
SDS 10 % (wt/vol)                        200  $\mu$ l

### Sammelgelpuffer:

Tris/HCl (pH 6,8)                        0,5 M

Die Elektrophoresekammer wird mit Laufpuffer befüllt und anschließend eine Spannung von 200 mV angelegt.

### Laufpuffer:

Glycin                                        192 mM  
Tris/HCl                                      24,8 mM  
SDS    1 %

### 3.2.5 Western Blot-Verfahren

Die in den Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine wurden im Semi-Dry-Verfahren elektrophoretisch auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Dazu wurden pro Gel neun Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran in einer dem Gel entsprechenden Größe zugeschnitten.

Folgende Puffer wurden für das Westernblot-Verfahren verwendet:

Anodenpuffer I (pH 10,4):

300 mM Tris/HCl, 20% (vol/vol) Methanol

Anodenpuffer II (pH 10,4):

30 mM Tris/HCl, 20% (vol/vol) Methanol

Kathodenpuffer (pH 9,4):

25 mM Tris/HCl, 40 mM 6-Aminohexansäure, 20% (vol/vol) Methanol

Je drei Filterpapiere wurden mit Kathodenpuffer, Anodenpuffer I oder Anodenpuffer II getränkt. Die Nitrozellulose-Membran wurde ebenfalls in Anodenpuffer II geschwenkt.

Zunächst wurden die mit Anodenpuffer I getränkten Filterpapiere luftblasenfrei auf die angefeuchtete Anode gelegt. Auf diese kamen dann die drei in Anodenpuffer II getränkten Filterpapiere zu liegen. Es folgte die Nitrozellulosemembran, auf welche das Polyacrylamidgel nach Entfernung des Sammelgels aufgelegt wurde. Die drei in Kathodenpuffer getränkten Filterpapiere und die feuchte Kathode der Blotkammer schlossen den Sandwichtaufbau ab. Der Proteintransfer erfolgte bei konstanter Stromstärke von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  für 90 Minuten bei Raumtemperatur.

### 3.2.6 Immunologisches Nachweisverfahren

Zur Kontrolle des vollständigen Proteintransfers auf die Nitrozellulosemembran wurde zunächst eine reversible Färbung mit Ponceau S durchgeführt. Dafür wurden die Membranen kurz in Ponceau S geschwenkt, wodurch die transferierten Proteine unspezifisch rot gefärbt wurden. Durch Schwenken in Aqua bidest. wurde der Membranhintergrund anschließend so weit entfärbt, dass die Proteinbanden gut sichtbar wurden und dokumentiert werden konnten. Der Farbstoff konnte anschließend durch Waschen in TBST-Puffer wieder vollständig entfernt werden.

Nach erfolgtem Proteintransfer konnten die zu untersuchenden Proteine mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Membranen zunächst 60 Minuten in 3% BSA in TBS-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen. Nach einmaligem Waschen in TBS-Puffer wurden die Membranen in 20 ml der jeweiligen Primär-Antikörper-Lösung (Zusammensetzung: Primär-Antikörper im Mischverhältnis wie unten angegeben plus 3% BSA in TBS-Puffer) wahlweise über Nacht bei 4°C oder für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Membranen dreimal für 10 Minuten in TBS-Puffer gewaschen. Um die Antigen-Antikörperbindung zu detektieren, wurden die Membranen anschließend mit den entsprechenden an HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörpern (Zusammensetzung: Sekundär-Antikörper im Mischverhältnis wie unten angegeben plus 3% BSA in TBS-Puffer) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. HRP katalysiert die Chemilumineszenzreaktion des Luminols.

Zum Nachweis der unterschiedlichen Proteine wurden folgende Antikörper verwendet:

Antikörper	Mischverhältnis AK : BSA
Anti-Phospho-CREB	1:1000
Anti-Vinculin	1:2000
Anti-RhoA	1:1000
Anti-Kofilin	1:1000
Anti-Phospho-MYPT850	1:1000

## Material und Methoden

Anschließend wurden die Membranen dreimal für 10 Minuten in TBS-Puffer gewaschen. Zur Detektion der Proteine wurden die Membranen kurz in ECL-Reagenz geschwenkt und die Peroxidasereaktion gestartet. Die dadurch entstehende Chemilumineszenz wurde mit einer Digitalkamera registriert und mit Hilfe der *Quantity One*<sup>®</sup> Analysesoftware quantifiziert.

### 3.2.7 Indirekte Immunfluoreszenz

Im Rahmen der Versuchsvorbereitung wurden *Coverslips* (25 mm Durchmesser) mit Endothelzellen beimpft und nach 2 Tag Inkubation im Brutschrank in die Experimente eingesetzt. Im Anschluss an die Experimente wurden die Endothelzellschichten zunächst mit 37°C temperiertem PBS gewaschen und anschließend mit Paraformaldehyd (3%tig) für 20 min fixiert. Im nächsten Schritt wurden die fixierten Zellen für 10 min bei Raumtemperatur mit 0,2%-igem TRITON x 100 permeabilisiert. Überflüssiges TRITON wurde danach durch dreimaliges Waschen à 10 min mit PBS entfernt.

Die gewaschenen Zellen wurden im letzten Schritt mit verdünntem Phalloidin –TRITC gefärbt. Phalloidin ist das Toxin des weißen Knollenblätterpilzes. Es bindet spezifisch an den Schnittstellen zwischen F-Aktin Untereinheiten. Tetramethyl-Rhodamin-Isothiozyanat (TRITC) ist ein Derivat des Rhodamins. In Konjugation mit Phalloidin dient es als Fluoreszenzfarbstoff der Visualisierung der F-Aktin-Untereinheiten im konfokalen Mikroskop. Die Deckgläschen wurden nach Phalloidin-Gabe 1 Stunde lang im Dunkeln inkubiert und anschließend, ebenfalls im abgedunkelten Raum, 3x mit PBS gewaschen. Die gefärbten Zellen wurden anschließend mit Einbettmedium und einem Objektträger für die Fluoreszenzmikroskopie eingebettet und über Nacht getrocknet. Zum Schutz vor weiterer Austrocknung wurden die Präparate mit Nagellack abgedichtet und im Dunkeln bei 4°C gelagert. Die Auswertung erfolgte im konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Zeiss, Jena).

### 3.2.8 Nachweis von aktiviertem RhoA mittels pulldown-Assay

Der Assay wurde nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass Rhotekin nur mit dem aktivierten GTP-gebundenen RhoA binden. Dadurch lässt sich eine Aussage über den Aktivierungszustand von RhoA machen.

## Material und Methoden

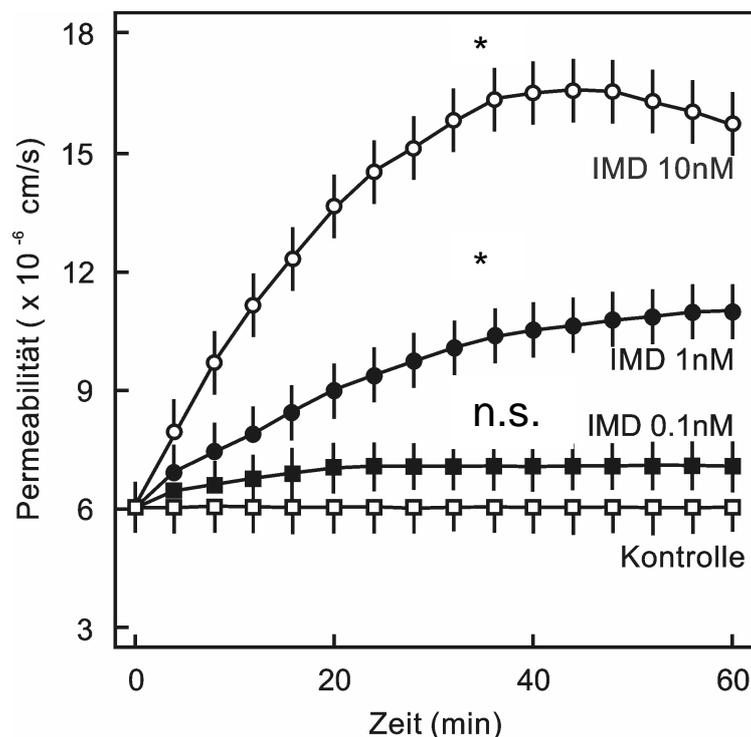
Die Endothelzellen wurden wie angegeben in Gegenwart von IMD inkubiert, anschließend mit eiskaltem PBS gewaschen und in einem 600 µl Cocktail aus Lysis-Puffer inkubiert. Im Anschluss an das Zellernten wurde das Zelllysat durch Aspiration über eine 26G-Nadel 4-5x Kanüle homogenisiert. Die Ansätze wurden bei 14,000 U/min für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert, um nicht lösliche Zelltrümmer zu sedimentieren. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation des Überstandes in einer Säule mit 10 µg Rhotekin-RBD-Kügelchen bei 4°C für 40 Minuten. Die Kügelchen wurden anschließend vier Mal in einem Puffer-Cocktail gewaschen, für 5 Minuten mit 40µl 2x SDS Probenpuffer auf 95°C erhitzt und auf ein 12,5%-iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über Nacht. Das RhoA wurde im Western Blot mit Hilfe eines spezifischen Anti-RhoA-Antikörpers nachgewiesen. Die RhoA-Aktivität wurde aus der Korrelation zwischen GTP-gebundendem RhoA und dem Gesamt-RhoA im Lysat bestimmt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Wirkung von Intermedin auf die endotheliale Makromolekülpermeabilität

In einer ersten Versuchsreihe wurde überprüft, ob IMD in dem verwendeten Endothelzellkultur-Modell einen Effekt auf die Makromolekülpermeabilität besitzt. Dabei wurde IMD<sub>1-53</sub> verwendet, welches ein höheres Wirkpotential als die Kurzform hat (Yang, Qi et al. 2005; Ren, Yang et al. 2006).

Wie in Abb. 4.1. gezeigt, löst IMD<sub>1-53</sub> bereits bei einer Konzentration von 1 nM eine signifikante Steigerung der Makromolekülpermeabilität aus. Bei einer Konzentration von 10 nM IMD<sub>1-53</sub> zeigte sich schon nach kurzer Inkubationszeit ein deutlicher Permeabilitätsanstieg. Bei einer Konzentration von 0,1 nM steigert IMD hingegen die Permeabilität nicht signifikant im Vergleich zu der Kontrolle. Die Endothelzellen der Kontrollgruppe zeigten über den gesamten Zeitraum des Versuchsverlaufs keine Zunahme der Makromolekülpermeabilität.



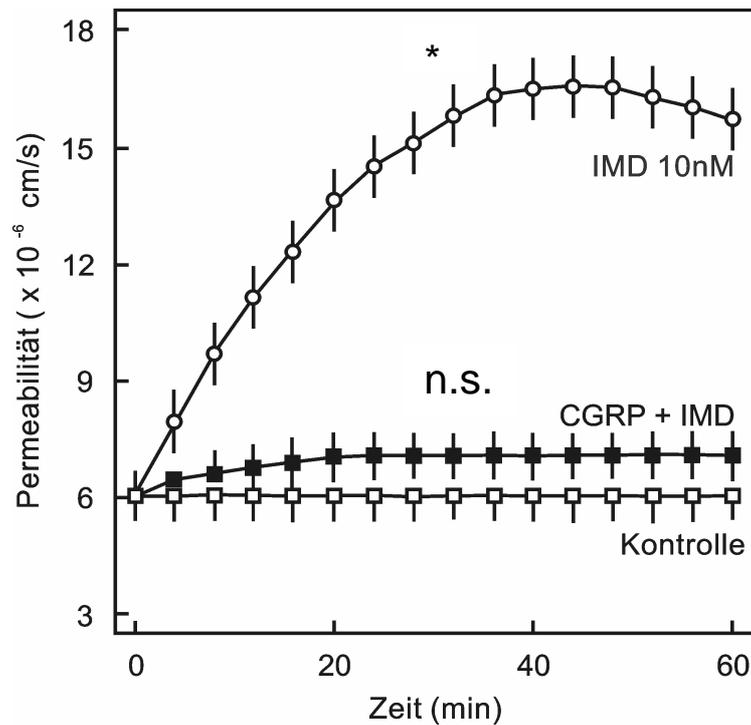
**Abb. 4.1:** Wirkung von Intermedin auf die Makromolekülpermeabilität von mikrovaskulären koronaren Endothelzellschichten der Ratte. Die Zellen wurden in Gegenwart von 0,1, 1, und 10 nM IMD<sub>1-53</sub> inkubiert. Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SD von 5 Experimenten unabhängiger Zellpräparationen. \* $P < 0.05$  vs. Kontrolle, n.s.: nicht signifikant verschieden von der Kontrolle.

## **4.2 Einfluss von $\alpha$ -CGRP<sub>8-37</sub> auf die Intermedin-induzierte Steigerung der Makromolekülpermeabilität**

Um zu überprüfen, ob IMD seine Permeabilitäts-steigernde Wirkung über einen CGRP-Rezeptor ausübt, wurde ein pharmakologischer Hemmstoff eingesetzt.  $\alpha$ -CGRP<sub>8-37</sub> ist ein kompetitiver Antagonist von CGRP (Hirata, Mitaka et al. 1996), der sich von CGRP durch das Fehlen der ersten 7 Aminosäuren unterscheidet. Antagonisiert wird die Wirkung am CGRP<sub>1</sub>-Rezeptor, der sich aus dem CRLR-Rezeptor und dem RAMP<sub>1</sub> zusammensetzt. Es wurde gezeigt, dass  $\alpha$ -CGRP<sub>8-37</sub> dadurch die CGRP-induzierte Aktivierung der Adenylatzyklase in der Plasmamembran von Leberzellen von Ratten hemmt (Chiba, Yamaguchi et al. 1989), sowie die Wirkung von Adrenomedullin, dem IMD verwandten Peptid, antagonisiert (Escott, Brain 1993).

Die nur mit IMD<sub>1-53</sub> stimulierten Zellen zeigten den aus den vorherigen Versuchen bekannten starken Anstieg der Permeabilität für Albumin. Vorinkubation der Zellen mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -CGRP<sub>8-37</sub> hingegen verhinderte vollständig den IMD-induzierten Permeabilitätsanstieg (Abb.4.2).

## Ergebnisse

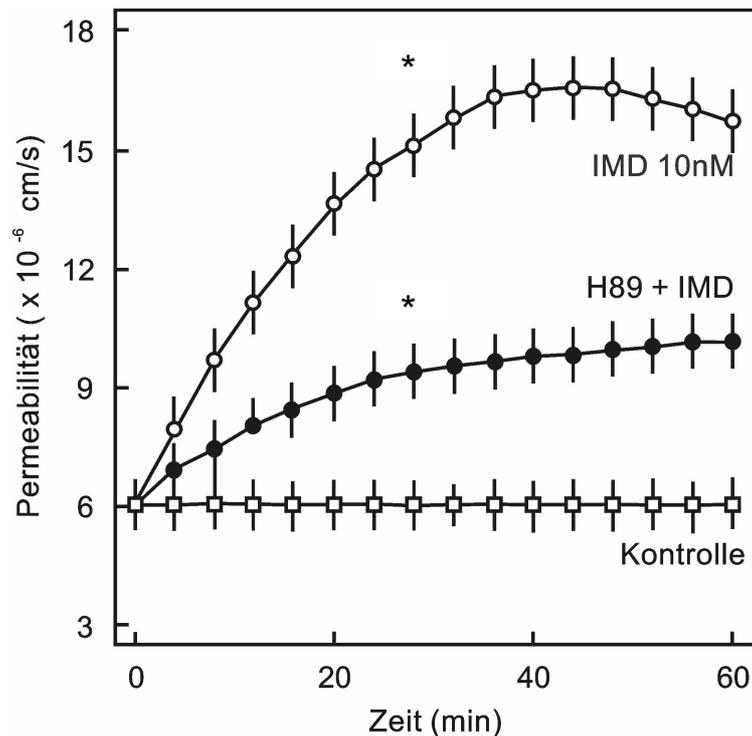


**Abb. 4.2:** Einfluss von  $\alpha$ -CGRP<sub>8-37</sub>, einem kompetitiven Antagonisten von CGRP, auf den Permeabilitätseffekt von Intermedin. Die Endothelzellen wurden in einer ersten Versuchsgruppe mit Intermedin (IMD; 10 nM) über eine Dauer von 60 min inkubiert (○), eine zweite Versuchsgruppe wurde zunächst für 30 min mit  $\alpha$ -CGRP<sub>8-37</sub> inkubiert und anschließend mit IMD<sub>1-53</sub> stimuliert (■). Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SD von 5 Experimenten unabhängiger Zellpräparationen. \* $P < 0.05$  vs. Kontrolle, n.s.: nicht signifikant verschieden von der Kontrolle (□).

### 4.3 Wirkung von H89 auf die IMD-induzierte Permeabilitätssteigerung

Im folgenden Schritt wurde untersucht, ob IMD seine Wirkung auf die Permeabilität über die Proteinkinase A (PKA) vermittelt. Dabei wurde die PKA pharmakologisch mit H89 (1  $\mu$ M), einem PKA-Antagonisten, gehemmt und die Wirkung auf die IMD-induzierte Permeabilitätsantwort bestimmt. Wie in Abb. 4.4 dargestellt, bewirkt H89 schon nach 20 Minuten eine deutliche Reduktion der IMD-induzierten Permeabilitätssteigerung. Dieses Ergebnis legt nahe, dass IMD die Permeabilität über die Aktivierung von PKA steigert.

## Ergebnisse

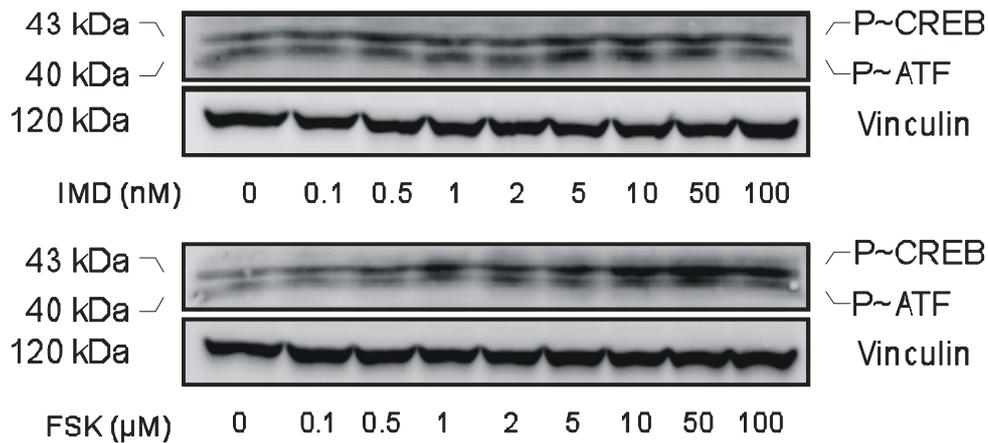


**Abb. 4.3:** Wirkung von H89 auf die IMD-induzierte Permeabilitätssteigerung. H89 ist ein potenter Hemmer der Proteinkinase A. Die Endothelzellen wurden mit 10 nM  $IMD_{1-53}$  inkubiert ( $\circ$ ). Eine zweite Versuchsgruppe wurde gleichzeitig mit  $IMD_{1-53}$  und H89 behandelt ( $\bullet$ ). Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SD von 5 Experimenten unabhängiger Zellpräparationen. \* $P < 0.05$  vs. Kontrolle ( $\square$ ).

Gestützt wird diese Vermutung durch die Western Blot-Analyse einer weiteren Versuchsreihe. Hierbei machte man sich die Eigenschaften zweier endogenen Substrate der PKA, dem *cAMP response element-binding protein* (CREB) und dem aktivierenden Transkriptionsfaktor (ATF), zu Nutze. Beide stellen einen geeigneten Parameter dar, um die PKA-Aktivität zu messen. Wie Abb 4.4 zeigt, steigert  $IMD_{1-53}$  die Phosphorylierung von CREB und ATF konzentrationsabhängig. Dabei ist bereits bei einer Konzentration von 0,5 nM eine signifikante Steigerung der CREB- bzw. ATF-Phosphorylierung zu beobachten. Diese Ergebnisse zeigen, dass IMD in den mikrovaskulären koronaren Endothelzellen den PKA-Signalweg aktiviert.

In einer Vergleichsgruppe wurde die Adenylatzyklase direkt mit Forskolin (FSK) inkubiert, um den intrazellulären Spiegel von cAMP zu steigern. FSK zeigt eine ähnlich starke Wirkung wie IMD auf die CREB- bzw. ATF-Phosphorylierung, jedoch bei einer 500fach höheren Konzentration. Dieses Ergebnis legt nahe, dass IMD analog zu FSK seine Wirkung über den cAMP/PKA-Signalweg ausübt (Abb. 4.4).

## Ergebnisse

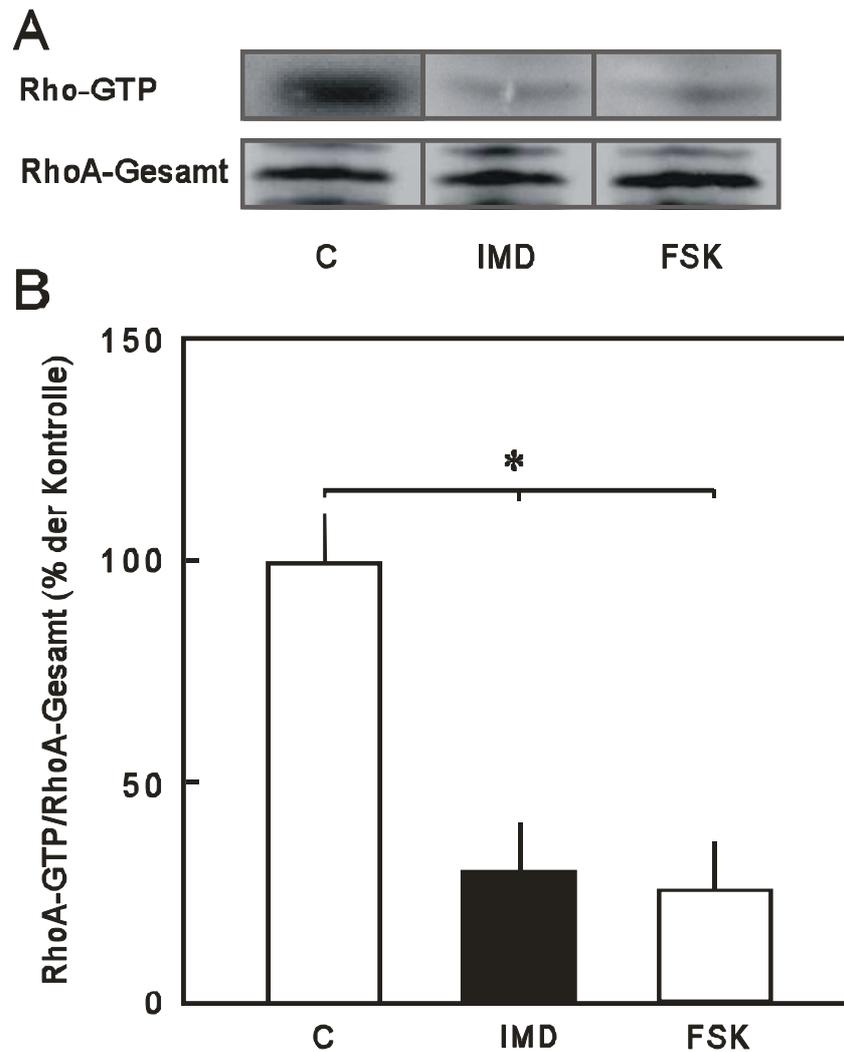


**Abb. 4.4:** Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Intermedin (IMD) oder Forskolin (FSK), einem direkten Aktivator der Adenylatzyklase, auf die Phosphorylierung von CREB und ATF, zwei PKA-abhängigen Transkriptionsfaktoren. Repräsentativer Westernblot von CREB bzw. ATF-Phosphorylierung in  $IMD_{1-53}$ - (oben) oder FSK-stimulierten Endothelzellen (unten). Die Endothelzellen wurden jeweils für 30 min in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen an  $IMD_{1-53}$  oder FSK inkubiert. Als Ladungskontrolle diente Vinculin. Repräsentativer Western Blot von 3 weiteren Blots unabhängiger Experimente und Zellpräparationen.

### 4.4 Beteiligung von Rho am Intermedin-Signalweg

RhoA ist ein bekanntes Zielprotein, über welches PKA die Schrankenfunktion der Endothelzellen moduliert. Um eine mögliche Beteiligung von RhoA am IMD-Signalweg zu überprüfen, wurde die Aktivität von RhoA mittels *Pulldown Assay* untersucht. Abb. 4.5 zeigt, dass unter den basalen Kulturbedingungen RhoA-abhängige Signalmechanismen bereits stimuliert sind. Die Zugabe von 10 nM IMD bewirkt jedoch eine Abnahme der RhoA-Aktivität. Um den Effekt von IMD in Relation zu einer direkten Aktivierung der Adenylatzyklase setzen zu können, wurde eine Vergleichsgruppe von Endothelzellen mit FSK inkubiert. Dabei zeigt sich, dass die direkte Aktivierung der Adenylatzyklase, die gleiche Wirkung auf die RhoA-Aktivierung hat wie IMD.

## Ergebnisse

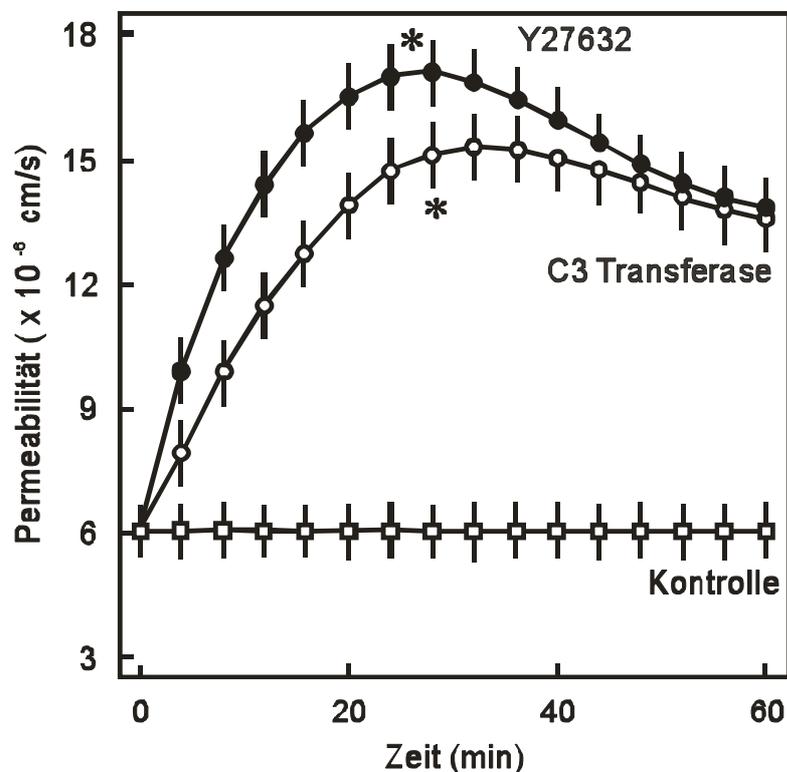


**Abb. 4.5:** Wirkung von Intermedin (IMD) und Forskolin (FSK) auf die RhoA-Aktivität (A) Repräsentativer Westernblot von Rho. Die Zellen wurden in Gegenwart von IMD (10 nM) oder FSK (5  $\mu$ M) für 30 Minuten inkubiert. Als Ladungskontrolle diente RhoA-total. (B) Densitometrische Analyse der Westernblots. Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SD von 3 Experimenten unabhängiger Zellpräparationen. \* $P < 0.05$  vs. Kontrolle.

## Ergebnisse

Das Ergebnis aus dem RhoA-Assay gab Anlass zur Untersuchung, welche Rolle RhoA im IMD-Signalweg zukommt.

Im Permeabilitätsversuch zeigt die Zugabe von C3-Transferase (2 µg/ml), einem spezifischen RhoA-Hemmer, eine Steigerung der Permeabilität. Dies bedeutet, dass die RhoA-Hemmung mit einer Permeabilitätserhöhung einhergeht. Untermuert wird diese Behauptung durch den Befund eines weiteren Experimentes: Y27632, ein selektiver Hemmstoff des RhoA-Effektors ROCK, löst ebenfalls eine Steigerung der Permeabilität aus. Folglich haben die Hemmung von RhoA oder ROCK die gleiche Wirkung auf die Permeabilität wie IMD (Abb.4.6).



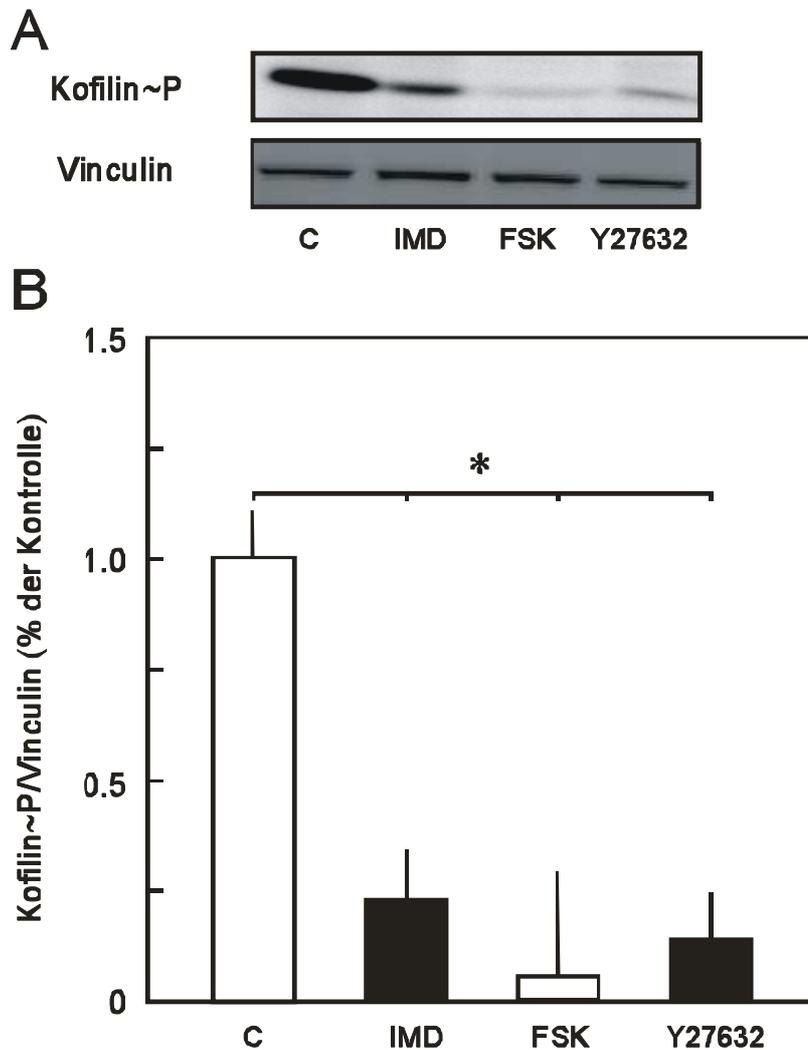
**Abb. 4.6:** Effekt von C3-Transferase, einem Hemmstoff von RhoA, bzw. Y27632, einem Hemmstoff von ROCK, auf die Permeabilität koronarer Endothelzellenschichten. Die Zellen wurden in Gegenwart von 2 mg/ml C3-Transferase (○) bzw. 10 µM Y27632 (●) inkubiert. Angegeben ist der Mittelwert ± SD von 3 Experimenten unabhängiger Zellpräparationen. \*P<0.05 vs. Kontrolle (□).

#### **4.5 Wirkung von Intermedin auf die Kofilin-Phosphorylierung**

Kofilin ist ein Aktin-bindendes Protein und ist an der Regulation des Auf- und Abbaus des Aktinzytoskeletts beteiligt. Es wird über den RhoA/ROCK/Lim-Kinase-Signalweg phosphoryliert. Dadurch wird die Assemblierung von Aktinfasern gesteigert. In seinem dephosphorylierten Zustand steigert es die Disassemblierung von Aktinfasern. In der folgenden Versuchsreihe wurde die Wirkung von IMD auf die Kofilinaktivität untersucht. Dazu wurde der Phosphorylierungsgrad von Kofilin mittels Western Blot überprüft. Wie in Abb.4.7 gezeigt, liegt Kofilin in Endothelzellen bereits unter basalen Bedingungen phosphoryliert vor. Dies bedeutet, dass Kofilin unter den basalen Kulturbedingungen die Assemblierung von F-Aktin begünstigt. Zugabe von IMD (10 nM) führt zu einer Reduktion der Kofilin-Phosphorylierung und steigert damit die Disassemblierung von F-Aktin. FSK, der direkte Aktivator der Adenylatzyklase, hat die gleiche Wirkung wie IMD auf die Kofilin-Phosphorylierung, allerdings erst ab einer 500fach höheren Konzentration (5  $\mu$ M). Auch der Einsatz von Y27632, einem ROCK-Hemmstoff, bewirkt eine Dephosphorylierung von Kofilin.

Diese Daten weisen darauf hin, dass ROCK die Endothelzellschrankenfunktion über den Phosphorylierungszustand von Kofilin reguliert. Um eine dem IMD ähnliche Wirkung zu erreichen wird eine 1000fach höhere Konzentration an Y27632 benötigt (10  $\mu$ M).

## Ergebnisse

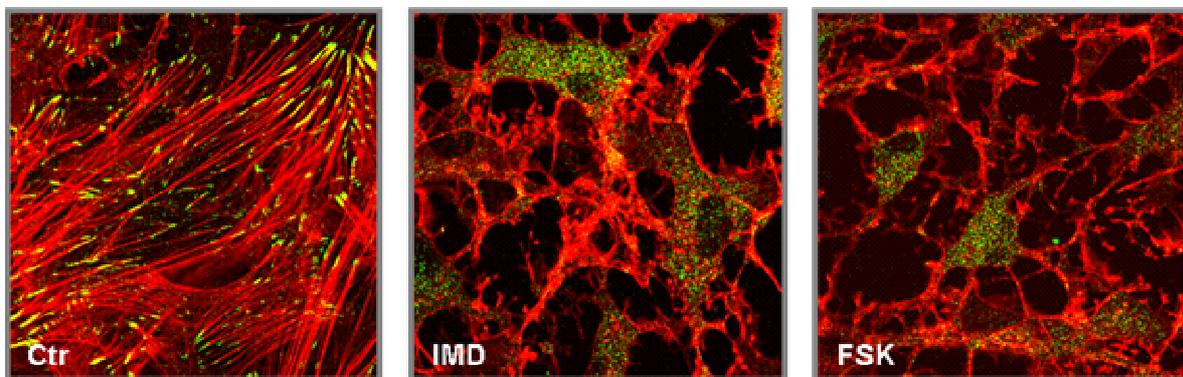


**Abb. 4.7:** Wirkung von Intermedin (IMD), Forskolin (FSK) und Y27632 auf die Kofilin-Phosphorylierung.

(A) Repräsentativer Western Blot. Endothelzellen wurden für 30 min in Gegenwart von Intermedin (IMD; 10 nM), Forskolin (FSK; 5  $\mu$ M) oder Y27632 (10  $\mu$ M) inkubiert. Vinculin diente als Ladungskontrolle. (B) Densitometrische Analyse der Westernblots. Dargestellt ist die Phospho-Kofilin-Konzentration der mit IMD, FSK bzw. Y27632 stimulierten Zellen im Verhältnis zur Kontrollgruppe (Angaben in %). Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SD von 3 Experimenten unabhängiger Zellpräparationen. \* $P < 0.05$  vs. Kontrolle.

#### 4.6 Wirkung von Intermedin auf das endotheliale Zytoskelett

Im Folgenden wurde die Wirkung von IMD auf das Aktinzytoskelett untersucht. Subkonfluente Kulturen mikrovaskulärer koronarer Endothelzellen zeigen unter basalen Kulturbedingungen eine Vielzahl von Aktinstressfasern, die die Zellen durchziehen und häufig in Vinculin-reichen fokalen Adhäsionsplaques enden (s. Abb. 4.8). Die Zugabe von IMD<sub>1-53</sub> oder FSK für 30 min bewirkte eine fast vollständige Zerstörung des Aktinzytoskeletts. Einzelne Stressfasern waren nicht mehr identifizierbar.



**Abb. 4.8:** Einfluss von Intermedin (IMD) auf das Aktinzytoskelett. Dargestellt sind repräsentative immunhistochemische Bilder des Aktinzytoskeletts. Semikonfluente mikrovaskuläre koronare Endothelzellen wurden für 30 Minuten in Gegenwart von Intermedin (IMD<sub>1-53</sub>; 10 nM) oder Forskolin (FSK; 5µM) inkubiert. (Ctr) nicht behandelte Kontrolle.

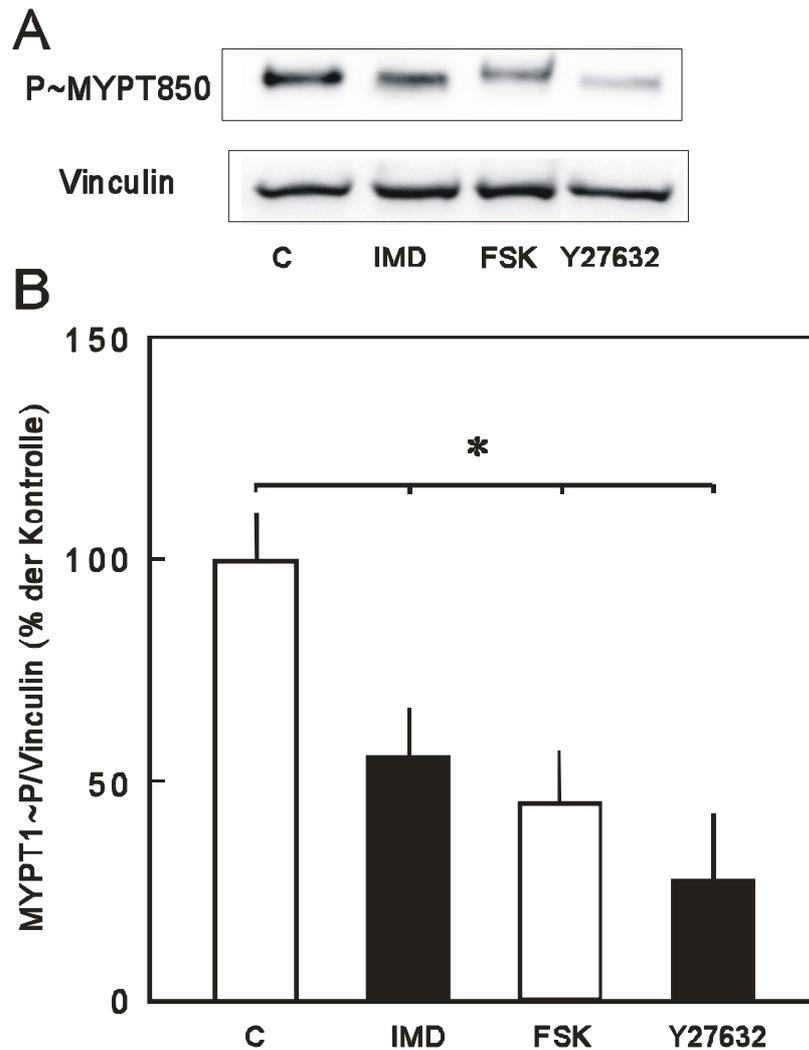
#### 4.7 Wirkung von Intermedin auf die MYPT1-Phosphorylierung

Neben dem Zytoskelett könnte auch der Aktivierungszustand des endothelialen kontraktiven Apparates durch IMD beeinflusst werden, da die Funktion beider Strukturen durch PKA reguliert wird. Bei der PKA-abhängigen Regulation des kontraktiven Apparates spielt die Aktivität der Myosinleichtketten-Phosphatase (MLCP) eine wesentliche Rolle, indem sie die Phosphorylierung der kleinen regulatorischen Untereinheit des Myosins, die Myosinleichtkette, beeinflusst. Die Aktivität der MLCP ihrerseits wird durch Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit MYPT1 an Thr 695 gehemmt. Folge ist die Zunahme der MLC-Phosphorylierung mit konsekutiver Zellkontraktion.

## Ergebnisse

Um den Einfluss von IMD auf MLCP zu bestimmen, wurde die Phosphorylierung von MYPT1 mittels Westernblot untersucht. Zugabe von IMD<sub>1-53</sub> bewirkte eine deutliche Abnahme der MYPT1-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle. Dies ist ein Hinweis darauf, dass IMD über Hemmung der MLCP den kontraktilen Apparat aktiviert. Wurde die Adenylatzyklase der Zellen mittels FSK (5 µM) direkt stimuliert, so sank die MYPT1-Phosphorylierung auf ein ähnlich niedriges Niveau ab. Auch Hemmung von ROCK durch Y27632 in vergleichbar hohen Konzentrationen (10 µM) bewirkte eine noch deutlichere Abnahme von MYPT1-Myptphosphorylierung (Abb. 4.9).

## Ergebnisse



**Abb. 4.9:** Wirkung von  $IMD_{1-53}$ , FSK oder Y27632 auf die MYPT1-Phosphorylierung.

(A) Repräsentativer Westernblot der MYPT1-Phosphorylierung. Die Endothelzellen wurden für 30 Minuten in Gegenwart von Intermedin ( $IMD_{1-53}$ ; 10 nM), Forskolin (FSK; 5  $\mu$ M) oder Y27632 (10  $\mu$ M) inkubiert. Als Ladungskontrolle diente Vinculin. (B) Densitometrische Analyse der MYPT1-Westernblots. Die MYPT1-Phosphorylierung in Gegenwart von IMD, FSK bzw. Y27632 wurde im Verhältnis zur Kontrollgruppe angegeben. Das MYPT1~P/Vinculin-Verhältniss der Kontrollen wurden auf 100 % gesetzt. Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SD von 4 Experimenten unabhängiger Zellpräparationen. \* $P < 0.05$  vs. Kontrolle.

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden anhand eines Kulturmodells mikrovaskulärer koronarer Endothelzellen die Schritte der Signaltransduktion charakterisiert, über die IMD die endotheliale Barrierefunktion reguliert. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass IMD konzentrationsabhängig die Albuminpermeabilität in Endothelzellschichten der mikrovaskulären Strombahn steigert. Dabei wird die Wirkung von IMD über einen *Calcitonin receptor-like receptor* vermittelt. Als intraendothelialer Signalmechanismus stimuliert IMD die PKA und löst eine Hemmung des RhoA/ROCK-Weges aus, in dessen Folge das Aktinzytoskelett destabilisiert wird. Die Disassemblierung des endothelialen F-Aktingerüsts geht mit einer Reduktion der Phosphorylierung von Kofilin einher. Darüber hinaus induziert IMD eine Reduktion der Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit der Myosinleichtkettenphosphatase, MYPT1, was darauf hinweist, dass Intermedin den kontraktile Apparat der Endothelzelle inaktiviert.

### 5.1 Intermedin steigert die endotheliale Permeabilität für Makromoleküle über einen CRLR / RAMP-Rezeptorkomplex

Intermedin stimuliert eine Zunahme der Makromolekülpermeabilität von Endothelzellschichten mikrovaskulären koronaren Ursprungs. Dabei steigert IMD bereits bei Konzentration ab 0,1 nM die Permeabilität signifikant. Diese Wirksamkeit von IMD auf die Endothelschranke stimmt mit früheren Messungen an kultivierten Endothelzellschichten humaner Nabelschnurvenen überein (Pfeil et al. 2009). In den Experimenten, die unter identischen Bedingungen wie in dieser Untersuchung durchgeführt wurden, war die halb-maximale Wirkung auf die Permeabilität bei 0,5 nM IMD erreicht.

In vivo Untersuchungen zeigen, dass die physiologische IMD-Plasmakonzentration des Menschen zwischen 2 bis 28 pM und der Ratte zwischen 20 bis 45 pM liegt (Bell & McDermot 2008). Im Zusammenhang mit dieser Untersuchung sind Daten von Morimoto et al. interessant, die fanden, dass die IMD-Konzentrationen im linken Ventrikel des menschlichen Herzens bzw. im Plasma bei  $0,251 \pm 1,18$  pmol/g Feuchtwicht, bzw  $24,7 \pm 1,78$  pM liegen (Morimoto, Satoh et al. 2007). Bei einer Vielzahl kardiovaskulärer Erkrankungen ist die Expression und Freisetzung von IMD

## Diskussion

um ein Mehrfaches erhöht (Bell & McDermot 2009). Darüber hinaus stellt die im Plasma gemessene Konzentration lediglich einen Mittelwert dar; lokal kann die IMD-Konzentration erheblich höhere Werte annehmen. Zusammengenommen bieten die Daten dieser Untersuchung einen klaren Hinweis darauf, dass IMD ein großes Wirkpotential auf die Makromolekülpermeabilität besitzt.

Aus vorherigen Studien ist bereits bekannt, dass IMD, wie die mit ihm verwandten Peptide CGRP und Adrenomedullin, seine Wirkung auf die intrazelluläre Signaltransduktion über spezifische CRLR/RAMP-Rezeptor-Komplexe vermittelt. So konnten Roh et al. 2004 an 293 T-Zellen, die ausschließlich den CRLR, nicht jedoch RAMPs exprimierten, zeigen, dass IMD keine Wirkung auf die Signaltransduktion ausübte. Im Gegensatz dazu reagierten in einer weiteren Versuchsreihe Zellen, die neben dem CRLR auch verschiedene RAMPs exprimierten auf IMD mit einem starken Anstieg der cAMP-Produktion (Roh, Chang et al. 2004).

Darüber hinaus scheint IMD zwar über fast alle bekannten CRLR/RAMP-Rezeptor-Komplex-Kombinationen die intrazelluläre Signaltransduktion zu stimulieren, jedoch mit erheblichen Unterschieden in der Intensität. Wesentliche Beiträge zum Verständnis der IMD-Rezeptor-Interaktion haben Rho et al. 2004 in ihren Arbeiten geliefert. Sie stimulierten z.B. humane Neuroblastom-Zellen und L6-myogene Rattenzellen die unterschiedliche CRLR / RAMP-Komplexe exprimieren (Choksi, Hay et al. 2002) mit IMD. Dabei konnten sie zeigen, dass IMD ein nicht-selektiver Agonist des CRLR/RAMP-Rezeptor-Komplexes ist (Roh, Chang et al. 2004). Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Wirkung an den einzelnen Rezeptoren-Komplexen unterschiedlich stark ist. IMD erweist sich als relativ schwacher Agonist sowohl am CRLR/RAMP1- als auch am CRLR/RAMP2-Rezeptor. Am potentesten ist die IMD-Wirkung bei Bindung an den CRLR/RAMP3-Rezeptor (Hay, Christopoulos et al. 2005). Als wirksame pharmakologische Werkzeuge wurden in dem Zusammenhang Rezeptorantagonisten auf der Grundlage trunkierter Abkömmlinge des CGRP eingesetzt. In der hier vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von IMD auf die Makromolekülpermeabilität durch den panspezifischen IMD-Rezeptorantagonisten  $\alpha$ -CGRP<sub>8-37</sub> vollständig gehemmt werden kann. Diese Befunde demonstrieren, dass die IMD-Wirkung auf die Schrankenfunktion via CRLR/RAMP-Rezeptor-Kombination vermittelt ist. Mikrovaskuläre koronare Endothelzellen exprimieren neben dem CRLR auch RAMP1-3. Über welche CRLR/RAMP-Rezeptor-Kombination die IMD-Wirkung auf

die Schrankenfunktion vermittelt wird muss in weiterführenden Untersuchungen identifiziert werden.

## **5.2 Die Intermedin-Wirkung auf die endotheliale Schranke wird über PKA vermittelt**

Sowohl IMD als auch die direkte Stimulation der Adenylzyklase durch FSK bewirkte eine Steigerung der Phosphorylierung des *cAMP responsive element-binding protein* (CREB). Dabei bewirkt IMD bei einer fast 1000fach geringeren Konzentration als FSK eine Steigerung der CREB-Phosphorylierung. CREB ist ein cAMP-abhängiger Transkriptionsfaktor der von der PKA phosphoryliert und aktiviert wird und damit einen endogenen Indikator für die PKA-Aktivität darstellt. Diese Daten zeigen, dass IMD analog zu FSK Endothelzellen über den cAMP/PKA-Weg aktiviert.

In früheren Studien wurde gezeigt, dass cAMP seine primäre Wirkung auf die Barrierefunktion in Endothelzellen über PKA ausübt (Lum, Jaffe et al. 1999; Liu, Verin et al. 2001; Yuan 2002). Die Befunde der vorliegenden Permeabilitätsversuche bestätigen die früheren Arbeiten. Der PKA-Inhibitor H89 senkte die Permeabilitätssteigernde Wirkung von IMD deutlich, jedoch nicht vollständig.

Die  $Ca^{2+}$ -Calmodulin abhängige Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) und die Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP) sind die Schlüsselenzyme im kontraktilem Apparat der Endothelzelle. Sie regulieren den Phosphorylierungszustand der leichten Myosinkette (MLC) und damit die kontraktile Aktivierung des Aktinzytoskeletts. Es konnte gezeigt werden, dass die cAMP-induzierte Aktivierung von MLCP in Endothelzellen, welche die Dephosphorylierung der MLC katalysiert (Gunduz, Hirche et al. 2003), über Proteinkinase A vermittelt wird (Bindewald K., Neumann J. 2004). Szokodi et al. 1998 zeigten, dass Adrenomedullin (AM) über den CGRP<sub>1</sub>-Rezeptor cAMP-unabhängig die Proteinkinase C (PKC) aktiviert (Szokodi, Kinnunen et al. 1998).

PKC ist in der Lage durch Modifizierung und Deassemblierung fokaler Adhäsionsplaques, bestehend aus *vascular endothelium cadherin* (VE-cadherin) und zytoplasmatischen Cateninen, die parazelluläre Permeabilität für Albumin zu erhöhen (Bogatcheva, Verin et al. 2003; Konstantoulaki, Kouklis et al. 2003).

Adhäsionsplaques sind Multiproteinkomplexe, die neben dem Aktinzytoskelett eine wichtige Rolle in der Erhaltung der endothelialen Barrierefunktion spielen.

Wir haben bereits darauf hingewiesen, dass IMD ein nicht-selektiver Agonist der CGRP / RAMP-Komplexe ist und deshalb, wenn auch nur in einem schwachen Ausmaß, durchaus seine Wirkung über den CGRP<sub>1</sub>-Rezeptor ausübt. Eine zusätzliche Stimulierung des PKC-abhängigen Signalweges durch IMD könnte die nicht vollständige H89-induzierte Hemmung der IMD-Wirkung über Blockade des cAMP/PKA-Signalweges erklären.

### **5.3 Der Einsatz von RhoA- bzw. ROCK-Hemmern erhöht die Endothel-Permeabilität**

Der RhoA/ROCK-Weg spielt bei der Regulation der Zytoskelettfunktion eine zentrale Rolle. Durch seine Interaktion mit anderen Zielproteinen sichert er zusätzlich die koordinierte Kontrolle anderer zellulärer Prozesse wie z.B. die Assemblierung/Deassemblierung des Zytoskeletts und der Zelladhäsionsstrukturen sowie den Aktivierungszustand des kontraktiven Apparates. Es konnte gezeigt werden, dass ROCK durch Aktivierung der Lim-Kinase die Aktin-Polymerisation stimuliert und die Aktinfilamente stabilisiert (Geneste, Copeland et al. 2002). Weiterhin wird die leichte Myosinketten-Phosphatase ROCK-abhängig inhibiert, was eine Kontraktion der Endothelzellen zur Folge hat (Kimura, Ito et al. 1996; Charest, Firtel 2007).

Die Analyse des RhoA/ROCK-Weges in der vorliegenden Untersuchung zeigt, dass IMD PKA-abhängig den Rho/ROCK-Signalweg hemmt. Unterstützt werden diese Daten durch die Tatsache, dass das gleiche Ergebnis durch Stimulierung mit FSK erzielt wird. Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit Untersuchungen aus der Literatur (Azam, Yoshioka et al. 2007). Damit stellt sich die Frage ob IMD seine Permeabilitäts-steigernde Wirkung über Hemmung des RhoA/ROCK-Weges vermittelt. Dazu wurden Permeabilitätsexperimente mit Hemmstoffen gegen RhoA und ROCK durchgeführt. Diese zeigen, dass Endothelzellschichten, die mit dem ROCK-Inhibitor Y27632 behandelt wurden, einen deutlichen Anstieg der Permeabilität für Albumin zeigen. Die gleiche Wirkung kann man beobachten, wenn die Zellen mit dem RhoA-Inhibitor C3T behandelt wurden. In den eingesetzten Konzentrationen steigerten beide Inhibitoren die Makromolekülpermeabilität im gleichen Ausmaß wie 10 nM IMD. Die Tatsache, dass IMD einerseits den

RhoA/ROCK-Weg hemmt und andererseits IMD die gleiche Wirkung auf die Permeabilität von mikrovaskulären Endothelzellen ausübt, wie der Rho-Inhibitor C3T oder der ROCK-Inhibitor Y27632, ist ein weiterer Beleg dafür, dass die Signaltransduktion von IMD über Hemmung des Rho/ROCK-Weg vermittelt wird. Im Folgenden ist zu klären, wie IMD über Hemmung des Rho/ROCK-Weges eine Permeabilitätssteigerung bewirkt. In dem Zusammenhang kommen zwei prinzipielle Prozesse in Frage: der kontraktile Apparat und das endotheliale Zytoskelett.

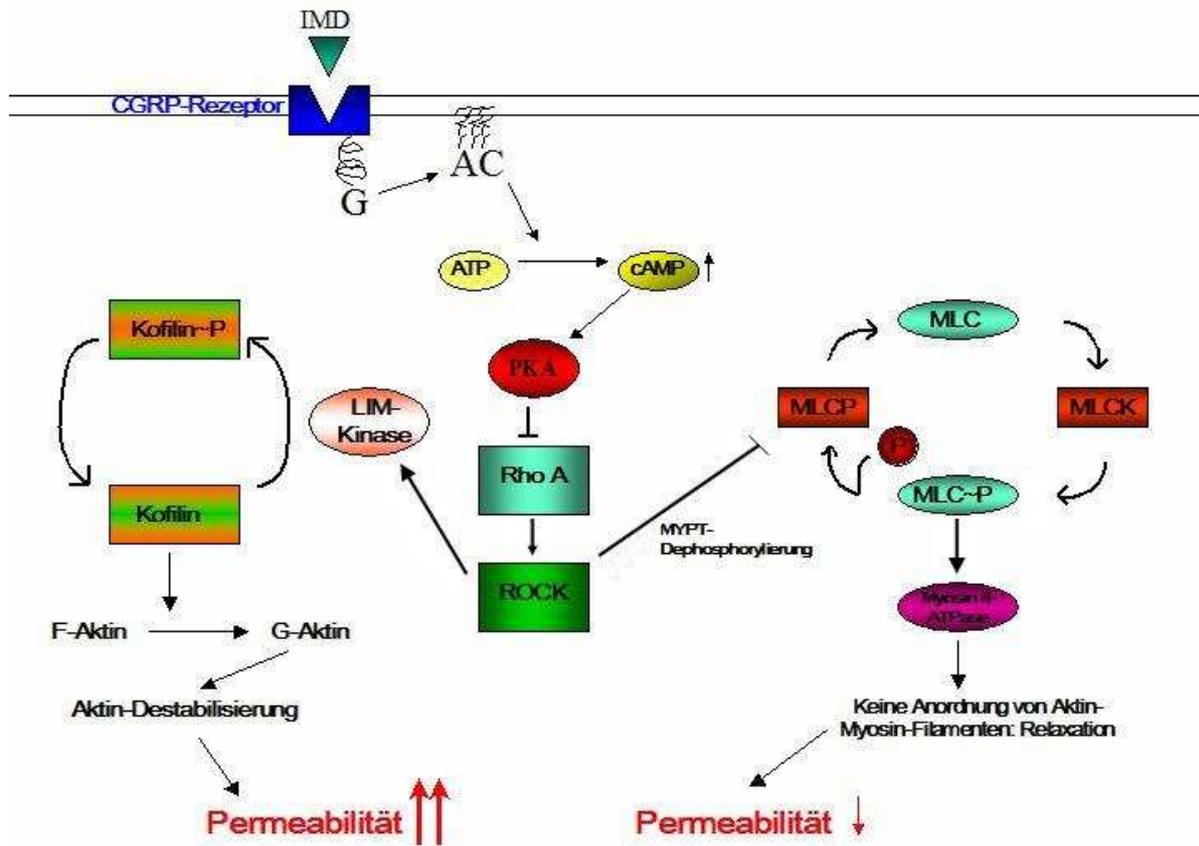
### **5.4 Intermedin hemmt die Phosphorylierung von MYPT1**

Die MYPT1-Phosphorylierung mikrovaskulärer koronarer Endothelzellen nimmt stark ab, unabhängig davon, ob sie mit IMD, FSK oder Y27632 behandelt wurden. MYPT1 ist die zentrale regulatorische Untereinheit der MLCP, über die die katalytische PP1-Untereinheit an Myosin bindet und den aktiven MLCP-Holoenzymkomplex bildet. Die Assemblierung sowie die Aktivität der MLCK wird über verschiedene Phosphorylierungsstellen an MYPT1 geregelt (Härtel, Rodewald et al. 2007). Phosphorylierung von MYPT1 an Thr 850 über den RhoA/ROCK-Weg bewirkt eine Hemmung der MLCP-Aktivität und damit Steigerung der MLC-Phosphorylierung und kontraktile Aktivierung der Endothelzellen. Eine Reduktion der Phosphorylierung geht mit einer Aktivierung der MLCP, Relaxation der Endothelzellen und damit Stabilisierung der Schranke einher. Die vorliegende Studie zeigt, dass IMD den Rho/Rock-Wege hemmt und eine Dephosphorylierung von MYPT1 bewirkt. Diese Daten unterstützen die Annahme, dass IMD damit via RhoA/ROCK die MLCP aktiviert. Es ist bekannt, dass das dem IMD verwandte Adrenomedullin die durch unterschiedliche Stimuli ausgelöste Hyperpermeabilität in verschiedenen Gefäßprovinzen über Blockade der Phosphorylierung der Myosinleichtkette in Endothelzellen verhindert. Dadurch unterbleibt die interzelluläre Lückenbildung (Hippenstiel, Witzenrath et al. 2002). Eine derartige IMD-Wirkung sollte jedoch ebenfalls zu einer Abnahme der Permeabilität führen und erklärt offensichtlich nicht die Permeabilitäts-steigernde Wirkung von IMD. Daher muss der Permeabilität-steigernde IMD-Effekt über einen weiteren Signalweg laufen, der die Schrankenstabilisierung via MCLP-Aktivierung überlagert.

## **5.5 Intermedin destabilisiert das Aktinzytoskelett über Hemmung der LIM-Kinase**

Es ist bekannt, dass die Bildung von F-Aktin vom Phosphorylierungszustand des Aktin-bindenden Proteins Kofilin abhängt. In phosphoryliertem Zustand fördert Kofilin die Deassemblierung von F-Aktin (Morgan, Lockerbie et al. 1993). Elektronenmikroskopische Beobachtungen zeigten, dass die Bindung von Kofilin an die Aktinfilamente zu einer Änderung der Filament-Windungen führt (Galkin, Orlova et al. 2001) und die lateralen Kontakte der Filamente geschwächt werden (Mcgough, Chiu 1999).

In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass unter Stimulation der Endothelzellen durch IMD Kofilin dephosphoryliert wird. Behandlung der Zellen mit FSK oder Y27632 bewirkte ebenso eine Abnahme der Kofilin-Phosphorylierung, wobei hier der Effekt noch deutlicher ausfiel. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass IMD über Hemmung von ROCK eine Dephosphorylierung von Kofilin bewirkt und dadurch eine Destabilisierung des Aktinzytoskeletts provoziert. Im Einklang mit dieser Annahme steht die immunhistochemische Analyse des Aktinzytoskeletts. Es zeigte sich, dass IMD den Abbau von Aktinfasern und großen Teilen des übrigen Zytoskeletts auslöst. Hier ist auch die mechanische Ursache für den IMD-induzierten Permeabilitätsanstieg in den mikrovaskulären koronaren Endothelzellen zu suchen: Wie in Abbildung 5.1 illustriert, übertrifft unter den gegebenen experimentellen Bedingungen die Destabilisierung der Aktinfilamente (Permeabilität-steigernder Effekt von IMD) die Hemmung des kontraktiven Apparates (Permeabilität-senkender Effekt von IMD). Zusammengefasst zeigen die Befunde dieser Arbeit, dass IMD als ein neuer potenter Regulator der endothelialen Barrierefunktion angesehen werden kann.



**Abb. 6.1:** Signaltransduktion von Intermedin (IMD) und seine Beziehung zum Aktinzytoskelett und kontraktilem Apparat. Dabei steht eine deutliche Permeabilitätssteigerung ( $\uparrow\uparrow$ ) durch Destabilisierung des Aktinzytoskeletts einer im Wirkungsgrad untergeordneten Permeabilitätssenkung ( $\downarrow$ ) durch Relaxation des Gefäßendothels gegenüber. G = Guaninnukleotid-bindendes Protein; AC = Adenylatzyklase; PKA = Proteinkinase A; MLCP = myosin light-chain phosphatase; MLC = myosin light chain; MLCK = myosin light-chain kinase

## **5.6 Klinischer Einfluss von Intermedin in Bezug auf die koronare Herzkrankheit**

Trotz des enormen Fortschritts in der Therapie des akuten Koronarsyndroms in den vergangenen Jahren werden weiterhin große Anstrengungen unternommen, Wege zu finden, kardiovaskuläre Krankheiten effektiver therapieren zu können. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Anlass zur Überlegung, ob die Steigerung der koronaren Endothelpermeabilität durch IMD unter physiologischen Bedingungen kardioprotektiven Wert besitzt.

Die drei Determinanten, die die myokardiale Sauerstoffversorgung bestimmen, sind:

1. der koronare Blutfluss, von dem der Volumenfluss der Erythrozyten abhängt
2. die Sauerstoffbindungs-Kapazität des Kapillarblutes, abhängig von der Hämoglobinkonzentration
3. die Dichte des durchbluteten Kapillarnetzes.

Ändert sich einer dieser drei Faktoren, führt dies gleichfalls zu einer Veränderung in der Versorgung des Herzmuskels mit Sauerstoff. Bei der koronaren Herzkrankheit ist häufig der koronare Blutfluss vermindert. Ursache können zum Beispiel Myokardhypertrophie, Koronarspasmen, Koronarsklerose oder koronare Mikroembolisation sein. Bei vermindertem Blutfluss innerhalb der Koronargefäße besteht die Gefahr, dass die intramyokardialen Mikrogefäße nicht mehr ausreichend perfundiert werden. Die intramyokardiale Mikrozirkulation umfasst Arterien mit einem Durchmesser von 0,5 mm bis zu Kapillaren von etwa 5 µm Durchmesser. Sie sind maßgeblich für die regionale Myokardperfusion verantwortlich. Übersteigt der Stenosegrad 55% des Gefäßlumens, erschöpfen sich die Kompensationsmechanismen, die den Blutfluss aufrecht erhalten. Die Myokardperfusion fällt proportional zum koronaren Blutfluss (Wu, Baldwin 1992).

Der Gefäßtonus wird durch vom Endothel produzierte vasoaktive Blutdruckregulatoren wie Prostazyklin, endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) und Stickstoffmonoxid (NO) reguliert. Endotheliale Dysfunktion entsteht vor allem durch eine mangelnde NO-Bioverfügbarkeit (Cai, Harrison 2000). Der wichtigste Stimulus für die Genexpression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und die NO-Synthase ist die Schubkraft, die durch Flüssigkeitsströmung auf Zellen ausgeübt wird, der sogenannte Scherstress. Im Falle eines reduzierten Blutflusses ist

## Diskussion

auch der Scherstress entsprechend vermindert. Die NO-Synthese ist herabgesetzt und die Endothel-abhängige Dilatation fällt entsprechend schwach aus.

Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass die intravenöse Gabe von IMD eine Dilatation der Koronararterien bewirkt (Kobayashi, Liu et al. 2004; Pan, Yang et al. 2005). Nach dem Ohm'schen Gesetz ist der Blutfluss = Druckgradient / Widerstand. Da der Druckgradient entlang eines Gefäßes relativ konstant bleibt und eine Gefäßdilatation den Gefäßwiderstand senkt, hat IMD eine steigernde Wirkung auf die Perfusion.

Je dichter das durchblutete Kapillarnetz im Herzmuskel, desto kürzer ist die Diffusionsstrecke zu dem zu versorgenden Gewebe. Die Mikrozirkulation in den Kapillaren hat beim Menschen eine Gesamtlänge von etwa 30.000 Kilometern. Die Kapillarverteilung ist so engmaschig, dass der Abstand zu jeder Körperzelle nicht mehr als 1  $\mu\text{m}$  beträgt. Intermedin könnte durch seinen Einfluss auf die endotheliale Barriere positiven Einfluss auf die Perfusion des Herzmuskelgewebes nehmen. Dies könnte unter physiologischen, aber vor allem auch unter pathophysiologischen Bedingungen der Fall sein. Die Tatsache, dass die IMD-Konzentration in hypertrophem Myokard im Vergleich zu gesundem Myokard siebenfach erhöht ist und auch ein Konzentrationsanstieg im Rattenherz mit Herzinfarkt zu messen ist (Totsune, Takahashi et al. 2000; Bell, Zhao et al. 2008), spricht für eine wichtige Rolle des Peptids im Zusammenhang mit kardialen Pathologien.

In der Phase der frühen Ischämie herrscht ein intrazelluläres Energiedefizit. Es kommt zu einer Anhäufung von Endprodukten des anaeroben Stoffwechsels (Laktat,  $\text{NADH}_2$  und Protonen). Eine folgende Verschiebung des Elektrolytmilieus, Kaliumverarmung und Kalziumüberschuss innerhalb der Kardiomyozyten bewirken eine Veränderung des Membranpotentials mit schwerwiegenden elektrophysiologischen Folgen: ventrikuläre Ektopien, Kammerflimmern und Einschränkung der myokardialen Kontraktionskraft.

Der Ausfall der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe führt zu einem Natriumanstieg mit der Folge eines intrazellulären Ödems mit konsekutiver Ruptur des Sarkolems (Renz-Polster 2004). Intrazellulär gelegene Enzyme (z.B. NAD(P)H-Oxidase, Xanthinoxidase, NO-Synthase) sind in der Lage molekularen Sauerstoff zu reduzieren. Bei dieser Reaktion entstehen gleichzeitig reaktive Sauerstoffspezies (ROS), auch Sauerstoff-Radikale genannt. Diese werden im Zuge der Zellzerstörung freigesetzt. ROS wirken direkt endothelschädigend und begünstigen das Entstehen einer endothelialen

## Diskussion

Dysfunktion (Harrison 1997). Vor allem das Superoxid-Anion ( $O_2^-$ ) fängt sofort NO ab und bildet mit diesem Peroxynitrit. Durch die konsekutiv verringerte NO-Bio-Verfügbarkeit ist die Gefäßrelaxation eingeschränkt (Bauersachs, Widder 2008).

Zeichen der Reperfusion eines Rattenherzens in vitro nach globaler Ischämie sind Bradykardie, Störung der kontraktile Funktionen und deutliche Myokardschäden.

Dank der gefäßdilatierenden Wirkung und des Potentials, die endotheliale Permeabilität zu erhöhen, könnte IMD möglicherweise ischämische Zellschäden verlangsamen beziehungsweise verhindern. Bei Auftreten ischämischer Ereignisse würde ein durch IMD erhöhter Blutfluss den Abtransport zelltoxischer Stoffe und Abbauprodukte des anaeroben Stoffwechsels beschleunigen und somit einer Veränderung des Membranpotentials und elektrophysiologischen Konsequenzen entgegenwirken.

Diese Vermutung wird durch Ergebnisse von Yang et al. gestützt: Wird IMD während der Reperfusionsphase injiziert, verbessert es die kardiale Kontraktilität und senkt den linksventrikulären Druck. Ebenfalls reduziert IMD nachweislich den myokardialen Schaden. Zeichen eines Myokardschadens ist eine hohe Aktivität von intrazellulärem LDH im Reperfusat. Behandlung mit IMD senkt deutlich die LDH-Aktivität (Yang, Qi et al. 2005).

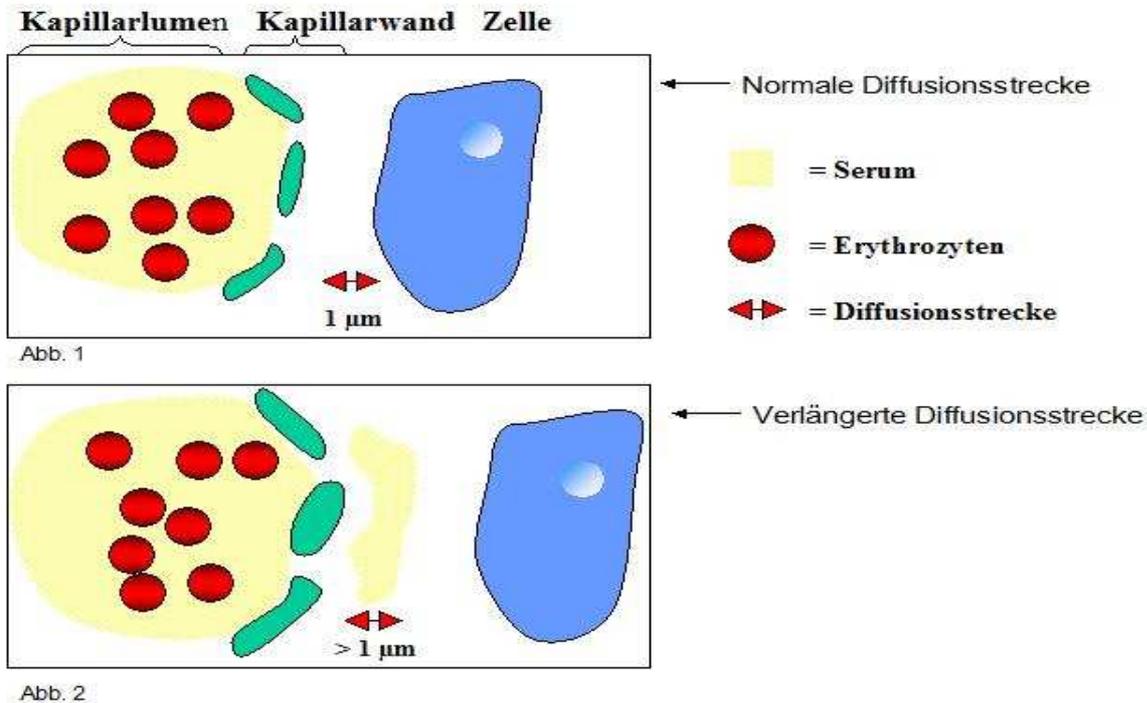
IMD bewirkt eine Dilatation der Koronararterien. Der daraus resultierende gesteigerte Blutfluss und die zusätzliche Formänderung des endothelialen Zell-Zytoskeletts verbessern zum einen die Perfusion des Gewebes und erlauben zum anderen möglicherweise dem für das Gewebe lebenswichtigen Sauerstoff und anderen Nährstoffen die leichtere Diffusion durch die Endothelschranke.

## 5.7 Ausblick

Es bleibt zu klären bis zu welchem Grad eine Steigerung der Permeabilität durch IMD protektiven Effekt auf das Myokard in vivo bedeutet. Die Vorteile einer Permeabilitätssteigerung wurden bereits erörtert. Übersteigt die parazelluläre Permeabilität allerdings ein gewisses Maß, besteht ein gestörtes Fließgleichgewicht zwischen An- und Abtransport von Gewebeflüssigkeit. Folge ist die Bildung eines Ödems. Ödeme vergrößern den Abstand zwischen Blutkapillaren und Körperzellen.

## Diskussion

Diese verlängerte Diffusionsstrecke bedeutet eine schlechtere Ernährung der Zellen, was zu Zellschädigung bzw. zum Zelltod führen kann (**Abb.6.2**).



**Abb. 6.2:** Ödem: Die Formationsänderung des endothelialen Zytoskeletts erhöht die parazelluläre Permeabilität. Serum kann verstärkt aus dem Gefäß in das Interstitium austreten. Folge ist ein Ödem sowohl im Endothel als auch im paravaskulären Gewebe (Abb.2). Beides führt zu einer verlängerten Diffusionsstrecke zwischen Gefäß und Zelle mit konsekutivem zellulärem  $O_2$ -Mangel.

Die Bedeutung von IMD in Bezug auf die koronare Herzkrankheit sollte Thema zukünftiger Forschungen sein. Ziel sollte sein, einen eindeutigen positiven Nutzen von IMD zu bestätigen. Dafür anbieten würden sich Anwendungen von IMD-spezifischen Antikörpern oder die auf das Herzgewebe begrenzte Ausschaltung des IMD-Gens, in dafür sich anbietenden Experimenten des ischämischen Infarkts. Im Anschluss an ein positives Ergebnis wäre eine Verwendung des Peptids auf dem klinischen Feld denkbar. Eine mögliche Anwendung könnte die intravenösen Gabe von IMD in der Akutphase des Myokardinfarktes darstellen mit dem Ziel, das Ausmaß des myokardialen Schadens zu verringern.

## 6. Zusammenfassung

Das Gefäßendothel nimmt als homogene Zellschicht neben der Regulation von Gefäßtonus, Blutfließeigenschaften sowie der Koagulation und Thrombusbildung eine bedeutende Rolle in der Steuerung der Barrierefunktion ein.

Intermedin, ein 2004 entdecktes neues Mitglied der Calcitonin-Peptid-Familie spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der endothelialen Barrierefunktion.

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung des molekularen Mechanismus, über den Intermedin die Schrankenfunktion beeinflusst.

Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen dabei die Fragen nach der Signaltransduktion und der Wirkung, welche Intermedin auf das endotheliale Zytoskelett hat.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden an kultivierten einschichtigen Ratten-Endothelzellen die Wirkung von Intermedin auf die endotheliale Permeabilität, CGRP-Rezeptoren, RhoA, ROCK, das Aktin-Zytoskelett und die kontraktile Aktivierung untersucht.

Stimulation von Endothelzellen mikrovaskulären Ursprungs mit Intermedin führte bereits bei einer Konzentration von 0,1 nM zu einer signifikanten Steigerung der Makromolekülpermeabilität, begleitet von einer Abnahme der RhoA-Aktivität sowie der kontraktilen Aktivität. Durch den gezielten Einsatz des panspezifischen IMD-Rezeptorantagonisten  $\alpha$ -CGRP<sub>8-37</sub> und des PKA-Hemmstoffs H89 konnte gezeigt werden, dass Intermedin seine Wirkung auf die intrazelluläre Signaltransduktion über spezifische CRLR/RAMP-Rezeptor-Komplexe vermittelt und dabei Endothelzellen über den cAMP/PKA-Weg aktiviert. Ebenfalls fand sich nach Gabe des Rho-Inhibitors C3T oder des ROCK-Inhibitors Y27632 eine dem Intermedin äquipotente Wirkung auf die endotheliale Permeabilität.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Intermedin über eine Dephosphorylierung des Aktin-bindenden-Proteins Kofilin die Deassemblierung von F-Aktin und somit eine Destabilisierung des Aktinzytoskeletts bewirkt.

Damit präsentiert diese Arbeit Intermedin als einen neuen potenten Regulator der endothelialen Barrierefunktion.

## 7. Summary

The vascular endothelium is a homogenous cell layer and plays a considerable role in the control of endothelial barrier function, regulation of the vascular tone, characteristics of blood flow, as well as coagulation and formation of blood clots. Intermedin was discovered in 2004 as a new member of the calcitonin / CGRP family, and it has a significant influence on the regulation of the endothelial barrier function. The aim of this study was to identify the molecular mechanisms through which intermedin affects the vascular endothelium.

The focus of the investigations was laid on the signalling pathways which are activated by intermedin and their effect on the endothelial cytoskeleton. In order to answer this questions, rodent endothelial cells were exposed to intermedin, *in vitro*, and the changes in the endothelial permeability, the CGRP-receptor, RhoA, ROCK, the actin cytoskeleton and the contractile activation were analysed.

Exposure to intermedin led to a rapid increase in the endothelial macromolecule permeability already at a concentration of 0.1 nM. Intermedin also induced a reduction in RhoA and contractile activity.

Usage of the pan-specific intermedin receptor antagonist  $\alpha$ -CGP<sub>8-37</sub> and the protein kinase inhibitor H89 revealed that intermedin mediates its effect on the intracellular signal transduction via specific CRLR/RAMP receptor complexes which then activate endothelial cells via the cAMP/PKA pathway. Furthermore, administration of the Rho-inhibitor C3-transferase and the ROCK-inhibitor Y27632 demonstrated an equally potent effect on endothelial permeability as intermedin.

In addition, intermedin caused a depletion of actin fibres via dephosphorylation of the actin-binding-protein Cofilin causing the destabilization of the actin cytoskeleton. Thus, the present study reveals intermedin as a new potent regulator of the endothelial barrier function.

## 8. Literaturnachweis

- Alberts (1997).** Molekularbiologie der Zelle, Jaenicke, L. (Hrsg). VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Autelitano D J, Ridings R (2001).** Adrenomedullin signalling in cardiomyocytes is dependent upon CRLR and RAMP2 expression. *Peptides* 22(11):1851-7.
- Azam M A, Yoshioka K, Ohkura S, Takuwa N, Sugimoto N, Sato K, Takuwa Y (2007).** Ca<sup>2+</sup>-independent, inhibitory effects of cyclic adenosine 5'-monophosphate on Ca<sup>2+</sup> regulation of phosphoinositide 3-kinase C2alpha, Rho, and myosin phosphatase in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 320(2):907-16.
- Bamburg J R (1999).** Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:185-230.
- Bauersachs J, Widder J D (2008).** Endothelial dysfunction in heart failure. *Pharmacol Rep* 60(1):119-26.
- Bell D, McDermott B J (1995).** Activity of amylin at CGRP1-preferring receptors coupled to positive contractile response in rat ventricular cardiomyocytes. *Regul Pept* 60(2-3):125-33.
- Bell D, McDermott B J (2008).** Intermedin (adrenomedullin-2): a novel counter-regulatory peptide in the cardiovascular and renal systems. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1:S247-62.
- Bell D, Zhao Y, McCoy F P, Devine A, McDermott B J (2008).** Expression of the counter-regulatory peptide intermedin is augmented in the presence of oxidative stress in hypertrophied cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem* 21(5-6):409-20.

- Bell D, Zhao Y, McCoy F P, Devine A B, McDermott B J (2007).** Differential effects of an anti-oxidant intervention on cardiomyocyte expression of adrenomedullin and intermedin and their receptor components in chronic nitric oxide deficiency. *Cell Physiol Biochem* 20(5):269-82.
- Bindewald K, Härtel F, Peters S C., Rodewald C, Nau S, Schäfer M, Neumann J Piper H M, Noll T (2004).** Opposite effect of cAMP signaling in endothelial barriers of different origin. *Am J Physiol Cell Physiol*; 287:C1246-55
- Bishop A L, Hall A (2000).** Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2:241-55.
- Bogatcheva N V, Dudek S M, Garcia J G, Verin A D (2003).** Mitogen-activated protein kinases in endothelial pathophysiology. *J Investig Med* 51(6):341-52.
- Bogatcheva N V, Verin A D (2009).** Reprint of "The role of cytoskeleton in the regulation of vascular endothelial barrier function" [Microvascular Research 76 (2008) 202-207]. *Microvasc Res* 77(1):64-9.
- Bogatcheva N V, Verin A D, Wang P, Birukova A A, Birukov K G, Mirzopoyazova T, Adyshev D M, Chiang E T, Crow M T, Garcia J G (2003).** Phorbol esters increase MLC phosphorylation and actin remodeling in bovine lung endothelium without increased contraction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285(2):L415-26.
- Borbiev T, Verin A D, Birukova A, Liu F, Crow M T, Garcia J G (2003).** Role of CaM kinase II and ERK activation in thrombin-induced endothelial cell barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285(1):L43-54.
- Cai H, Harrison D G (2000).** Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87(10):840-4.
- Chang C L, Roh J, Hsu S Y (2004).** Intermedin, a novel calcitonin family peptide that exists in teleosts as well as in mammals: a comparison with other calcitonin/intermedin family peptides in vertebrates. *Peptides* 25(10):1633-42.
- Charest P G, Firtel R A (2007).** Big roles for small GTPases in the control of directed cell movement. *Biochem J* 401(2):377-90.

- Chiba T, Yamaguchi A, Yamatani T, Nakamura A, Morishita T, Inui T, Fukase M, Noda T, Fujita T (1989).** Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist human CGRP-(8-37). *Am J Physiol* 256(2 Pt 1):E331-5.
- Choksi T, Hay D L, Legon S, Poyner D R, Hagner S, Bloom S R, Smith D M (2002).** Comparison of the expression of calcitonin receptor-like receptor (CRLR) and receptor activity modifying proteins (RAMPs) with CGRP and adrenomedullin binding in cell lines. *Br J Pharmacol* 136(5):784-92.
- Cotran R S (1987).** American Association of Pathologists president's address. New roles for the endothelium in inflammation and immunity. *Am J Pathol* 129(3):407-13.
- Cottrell G S, Roosterman D, Marvizon J C, Song B, Wick E, Pikios S, Wong H, Berthelie C, Tang Y, Sternini C, Bunnett N W, Grady E F (2005).** Localization of calcitonin receptor-like receptor and receptor activity modifying protein 1 in enteric neurons, dorsal root ganglia, and the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 490(3):239-55.
- Cueille C, Pidoux E, de Vernejoul M C, Ventura-Clapier R, Garel J M (2002).** Increased myocardial expression of RAMP1 and RAMP3 in rats with chronic heart failure. *Biochem Biophys Res Commun* 294(2):340-6.
- Dinh-Xuan A T, Pepke-Zaba J, Butt A Y, Cremona G, Higebottom T W (1993).** Impairment of pulmonary-artery endothelium-dependent relaxation in chronic obstructive lung disease is not due to dysfunction of endothelial cell membrane receptors nor to L-arginine deficiency. *Br J Pharmacol* 109(2):587-91.
- Drenckhahn D (1997).** The endothelial contractile cytoskeleton In: Vascular Endothelium: Physiology, Pathology, and Therapeutic Opportunities Born G.V.R., Schwartz C.J. (Hrsg). *Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart*: 1-25.
- Dvorak A M, Feng D (2001).** The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle. *J Histochem Cytochem* 49(4):419-32.

- EI-Fadaly A B, Kummer W (2005).** Endothelial vesiculo-vacuolar organelles, pockets and multi-layered fenestrated lamellae in the capillaries of the mouse carotid body. *Ann Anat* 187(4):333-44.
- Escott K J, Brain S D (1993).** Effect of a calcitonin gene-related peptide antagonist (CGRP8-37) on skin vasodilatation and oedema induced by stimulation of the rat saphenous nerve. *Br J Pharmacol* 110(2):772-6.
- Ettenson D S, Gotlieb A I (1992).** Centrosomes, microtubules, and microfilaments in the reendothelialization and remodeling of double-sided in vitro wounds. *Lab Invest* 66(6):722-33.
- Fischer J A, Muff R, Born W (2002).** Functional relevance of G-protein-coupled-receptor-associated proteins, exemplified by receptor-activity-modifying proteins (RAMPs). *Biochem Soc Trans* 30(4):455-60.
- Folkman J, Klagsbrun M (1987).** Vascular physiology. A family of angiogenic peptides. *Nature* 329(6141):671-2.
- Fujisawa Y, Nagai Y, Miyatake A, Miura K, Nishiyama A, Kimura S, Abe Y (2007).** Effects of adrenomedullin 2 on regional hemodynamics in conscious rats. *Eur J Pharmacol* 558(1-3):128-32.
- Fujisawa Y, Nagai Y, Miyatake A, Miura K, Shokoji T, Nishiyama A, Kimura S, Abe Y (2006).** Roles of adrenomedullin 2 in regulating the cardiovascular and sympathetic nervous systems in conscious rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(3):H1120-7.
- Galkin V E, Orlova A, Lukoyanova N, Wriggers W, Egelman E H (2001).** Actin depolymerizing factor stabilizes an existing state of F-actin and can change the tilt of F-actin subunits. *J Cell Biol* 153(1):75-86.
- Garcia J G, Siflinger-Birnboim A, Bizios R, Del Vecchio P J, Fenton J W, 2nd, Malik A B (1986).** Thrombin-induced increase in albumin permeability across the endothelium. *J Cell Physiol* 128(1):96-104.

- Geneste O, Copeland J W, Treisman R (2002).** LIM kinase and Diaphanous cooperate to regulate serum response factor and actin dynamics. *J Cell Biol* 157(5):831-8.
- Goeckeler Z M, Wysolmerski R B (1995).** Myosin light chain kinase-regulated endothelial cell contraction: the relationship between isometric tension, actin polymerization, and myosin phosphorylation. *J Cell Biol* 130(3):613-27.
- Gotlieb A I (1990).** The endothelial cytoskeleton: organization in normal and regenerating endothelium. *Toxicol Pathol* 18(4 Pt 1):603-17.
- Gotlieb A I, Langille B L, Wong M K, Kim D W (1991).** Structure and function of the endothelial cytoskeleton. *Lab Invest* 65(2):123-37.
- Gunduz D, Hirche F, Hartel F V, Rodewald C W, Schafer M, Pfitzer G, Piper H M, Noll T (2003).** ATP antagonism of thrombin-induced endothelial barrier permeability. *Cardiovasc Res* 59(2):470-8.
- Hagner S, Stahl U, Knoblauch B, McGregor G P, Lang R E (2002).** Calcitonin receptor-like receptor: identification and distribution in human peripheral tissues. *Cell Tissue Res* 310(1):41-50.
- Härtel F V, Rodewald C W, Aslam M, Gunduz D, Hafer L, Neumann J, Piper H M, Noll T (2007).** Extracellular ATP induces assembly and activation of the myosin light chain phosphatase complex in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 74(3):487-96.
- Haugland R P, You W, Paragas V B, Wells K S, DuBose D A (1994).** Simultaneous visualization of G- and F-actin in endothelial cells. *J Histochem Cytochem* 42(3):345-50.
- Hay D L, Christopoulos G, Christopoulos A, Poyner D R, Sexton P M (2005).** Pharmacological discrimination of calcitonin receptor: receptor activity-modifying protein complexes. *Mol Pharmacol* 67(5):1655-65.
- Hecker M (1999).** Pathophysiologie der koronaren Endothelfunktion. Autonomes Nervensystem und Koronare Herzkrankheit. Griebenow R., Gülker H., Dominiak P., Piper H.M. (Hrsg) *Novartis Pharma GmbH, Nürnberg*:65-86.

- Hempel A, Noll T, Muhs A, Piper H M (1996).** Functional antagonism between cAMP and cGMP on permeability of coronary endothelial monolayers. *Am J Physiol* 270(4 Pt 2):H1264-71.
- Hippenstiel S, Witzenrath M, Schmeck B, Hocke A, Krisp M, Krull M, Seybold J, Seeger W, Rascher W, Schutte H, Suttorp N (2002).** Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability. *Circ Res* 91(7):618-25.
- Hirata Y, Mitaka C, Sato K, Nagura T, Tsunoda Y, Amaha K, Marumo F (1996).** Increased circulating adrenomedullin, a novel vasodilatory peptide, in sepsis. *J Clin Endocrinol Metab* 81(4):1449-53.
- Hirose T, Totsune K, Mori N, Morimoto R, Hashimoto M, Nakashige Y, Metoki H, Asayama K, Kikuya M, Ohkubo T, Hashimoto J, Sasano H, Kohzuki M, Takahashi K, Imai Y (2008).** Increased expression of adrenomedullin 2/intermedin in rat hearts with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail* 10(9):840-9.
- Ichikawa K, Ito M, Hartshorne D J (1996).** Phosphorylation of the large subunit of myosin phosphatase and inhibition of phosphatase activity. *J Biol Chem* 271(9):4733-40.
- Ishimitsu T, Ono H, Minami J, Matsuoka H (2006).** Pathophysiologic and therapeutic implications of adrenomedullin in cardiovascular disorders. *Pharmacol Ther* 111(3):909-27.
- Jamora C, Fuchs E (2002).** Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol* 4(4):E101-8.
- Ji J Y, Jing H, Diamond S L (2008).** Hemodynamic regulation of inflammation at the endothelial-neutrophil interface. *Ann Biomed Eng* 36(4):586-95.
- Kawano Y, Fukata Y, Oshiro N, Amano M, Nakamura T, Ito M, Matsumura F, Inagaki M, Kaibuchi K (1999).** Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J Cell Biol* 147(5):1023-38.

- Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K (1996).** Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273(5272):245-8.
- Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T (1993).** Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 192(2):553-60.
- Klingenberg D, Gündüz D, Härtel F, Bindewald K, Schäfer M, Piper H M, Noll T (2004).** MEK/MAPK as a signaling element in ATP control of endothelial myosin light chain. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286: C807-C812
- Kobayashi Y, Liu Y J, Gonda T, Takei Y (2004).** Coronary vasodilatory response to a novel peptide, adrenomedullin 2. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31 Suppl 2:S49-50.
- Konstantoulaki M, Kouklis P, Malik A B (2003).** Protein kinase C modifications of VE-cadherin, p120, and beta-catenin contribute to endothelial barrier dysregulation induced by thrombin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285(2):L434-42.
- Laemmli U K (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5.
- Lee J S, Gotlieb A I (2002).** Microtubule-actin interactions may regulate endothelial integrity and repair. *Cardiovasc Pathol* 11(3):135-40.
- Leung T, Chen X Q, Manser E, Lim L (1996).** The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* 16(10):5313-27.
- Liu F, Verin A D, Borbiev T, Garcia J G (2001).** Role of cAMP-dependent protein kinase A activity in endothelial cell cytoskeleton rearrangement. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280(6):L1309-17.
- Lodish B A, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J.E. Darnell (2001).** Molekulare Zellbiologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.

- Lum H, Jaffe H A, Schulz I T, Masood A, RayChaudhury A, Green R D (1999).** Expression of PKA inhibitor (PKI) gene abolishes cAMP-mediated protection to endothelial barrier dysfunction. *Am J Physiol* 277(3 Pt 1):C580-8.
- McDaniel N L, Rembold C M, Murphy R A (1994).** Cyclic nucleotide dependent relaxation in vascular smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 72(11):1380-5.
- McGough A, Chiu W (1999).** ADF/cofilin weakens lateral contacts in the actin filament. *J Mol Biol* 291(3):513-9.
- McLatchie L M, Fraser N J, Main M J, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee M G, Foord S M (1998).** RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393(6683):333-9.
- Mehta D, Tiruppathi C, Sandoval R, Minshall R D, Holinstat M, Malik A B (2002).** Modulatory role of focal adhesion kinase in regulating human pulmonary arterial endothelial barrier function. *J Physiol* 539(Pt 3):779-89.
- Michel C C (1996).** Transport of macromolecules through microvascular walls. *Cardiovasc Res* 32(4):644-53.
- Morgan T E, Lockerbie R O, Minamide L S, Browning M D, Bamberg J R (1993).** Isolation and characterization of a regulated form of actin depolymerizing factor. *J Cell Biol* 122(3):623-33.
- Morimoto R, Satoh F, Murakami O, Totsune K, Suzuki T, Sasano H, Ito S, Takahashi K (2007).** Expression of adrenomedullin2/intermedin in human brain, heart, and kidney. *Peptides* 28(5):1095-103.
- Moriyama K, Iida K, Yahara I (1996).** Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes Cells* 1(1):73-86.
- Moy A B, Winter M, Kamath A, Blackwell K, Reyes G, Gjaever I, Keese C, Shasby D M (2000).** Histamine alters endothelial barrier function at cell-cell and cell-matrix sites. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278(5):L888-98.

- Muff R, Leuthauser K, Buhlmann N, Foord S M, Fischer J A, Born W (1998).** Receptor activity modifying proteins regulate the activity of a calcitonin gene-related peptide receptor in rabbit aortic endothelial cells. *FEBS Lett* 441(3):366-8.
- Nagae T, Mukoyama M, Sugawara A, Mori K, Yahata K, Kasahara M, Suganami T, Makino H, Fujinaga Y, Yoshioka T, Tanaka I, Nakao K (2000).** Rat receptor-activity-modifying proteins (RAMPs) for adrenomedullin/CGRP receptor: cloning and upregulation in obstructive nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 270(1):89-93.
- Noll T, Schafer M, Schavier-Schmitz U, Piper H M (2000).** ATP induces dephosphorylation of myosin light chain in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 279(3):C717-23.
- Ogoshi M, Inoue K, Takei Y (2003).** Identification of a novel adrenomedullin gene family in teleost fish. *Biochem Biophys Res Commun* 311(4):1072-7.
- Pan C S, Jiang W, Wu Sh Y, Zhao J, Pang Y Z, Tang C S, Qi Y F (2006).** Potentiated response to adrenomedullin in myocardia and aortas in spontaneously hypertensive rat. *Basic Res Cardiol* 101(3):193-203.
- Pan C S, Yang J H, Cai D Y, Zhao J, Gerns H, Yang J, Chang J K, Tang C S, Qi Y F (2005).** Cardiovascular effects of newly discovered peptide intermedin/adrenomedullin 2. *Peptides* 26(9):1640-6.
- Pfeil U, Aslam M, Paddenberg R, Quanz K, Chang C L, Park J I, Gries B, Rafiq A, Faulhammer P, Goldenberg A, Papadakis T, Noll T, Hsu S Y, Weissmann N, Kummer W (2009).** Intermedin/adrenomedullin-2 is a hypoxia-induced endothelial peptide that stabilizes pulmonary microvascular permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297(5):L837-45.
- Prado M A, Evans-Bain B, Dickerson I M (2002).** Receptor component protein (RCP): a member of a multi-protein complex required for G-protein-coupled signal transduction. *Biochem Soc Trans* 30(4):460-4.
- Pries A R, Kuebler W M (2006).** Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol* (176 Pt 1):1-40.

- Ren Y S, Yang J H, Zhang J, Pan C S, Yang J, Zhao J, Pang Y Z, Tang C S, Qi Y F (2006).** Intermedin 1-53 in central nervous system elevates arterial blood pressure in rats. *Peptides* 27(1):74-9.
- Renz-Polster H (2004).** Basislehrbuch Innere Medizin. München, *Urban&Fischer*.
- Rink T J, Beaumont K, Koda J, Young A (1993).** Structure and biology of amylin. *Trends Pharmacol Sci* 14(4):113-8.
- Roh J, Chang C L, Bhalla A, Klein C, Hsu S Y (2004).** Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes. *J Biol Chem* 279(8):7264-74.
- Schnittler H J, Wilke A, Gress T, Suttorp N, Drenckhahn D (1990).** Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium. *J Physiol* 431:379-401.
- Somlyo A P, Somlyo A V (1994).** Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372(6503):231-6.
- Stevens T, Garcia J G, Shasby D M, Bhattacharya J, Malik A B (2000).** Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279(3):L419-22.
- Sumi T, Matsumoto K, Nakamura T (2001).** Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 276(1):670-6.
- Sumpio B E, Riley J T, Dardik A (2002).** Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 34(12):1508-12.
- Sward K, Dreja K, Susnjar M, Hellstrand P, Hartshorne D J, Walsh M P (2000).** Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ileum. *J Physiol* 522 Pt 1:33-49.

- Szokodi I, Kinnunen P, Tavi P, Weckstrom M, Toth M, Ruskoaho H (1998).** Evidence for cAMP-independent mechanisms mediating the effects of adrenomedullin, a new inotropic peptide. *Circulation* 97(11):1062-70.
- Takahashi K, Kikuchi K, Maruyama Y, Urabe T, Nakajima K, Sasano H, Imai Y, Murakami O, Totsune K (2006).** Immunocytochemical localization of adrenomedullin 2/intermedin-like immunoreactivity in human hypothalamus, heart and kidney. *Peptides* 27(6):1383-9.
- Takei Y, Hyodo S, Katafuchi T, Minamino N (2004).** Novel fish-derived adrenomedullin in mammals: structure and possible function. *Peptides* 25(10):1643-56.
- Taylor M M, Bagley S L, Samson W K (2005).** Intermedin/adrenomedullin-2 acts within central nervous system to elevate blood pressure and inhibit food and water intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(4):R919-27.
- Toborek M, Kaiser S (1999).** Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol* 94(5):295-314.
- Totsune K, Takahashi K, Mackenzie H S, Murakami O, Arihara Z, Sone M, Mouri T, Brenner B M, Ito S (2000).** Increased gene expression of adrenomedullin and adrenomedullin-receptor complexes, receptor-activity modifying protein (RAMP)2 and calcitonin-receptor-like receptor (CRLR) in the hearts of rats with congestive heart failure. *Clin Sci (Lond)* 99(6):541-6.
- Vane J R, Botting R M (1994).** Regulatory mechanisms of the vascular endothelium: an update. *Pol J Pharmacol* 46(6):499-21.
- Vanhoutte P M, Mombouli J V (1996).** Vascular endothelium: vasoactive mediators. *Prog Cardiovasc Dis* 39(3):229-38.
- Word R A, Casey M L, Kamm K E, Stull J T (1991).** Effects of cGMP on  $[Ca^{2+}]_i$ , myosin light chain phosphorylation, and contraction in human myometrium. *Am J Physiol* 260(4 Pt 1):C861-7.

## Literaturnachweis

**Wu N Z, Baldwin A L (1992).** Transient venular permeability increase and endothelial gap formation induced by histamine. *Am J Physiol* 262(4 Pt 2):H1238-47.

**Yang J H, Qi Y F, Jia Y X, Pan C S, Zhao J, Yang J, Chang J K, Tang C S (2005).** Protective effects of intermedin/adrenomedullin2 on ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts. *Peptides* 26(3):501-7.

**Yuan S Y (2002).** Protein kinase signaling in the modulation of microvascular permeability. *Vascul Pharmacol* 39(4-5):213-23.

## 9. Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die in der Dissertation angegeben sind. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Dominik Schuler

Düsseldorf, 15.Juni 2010