

Rolle des NO/cGMP-Signalweges bei der
Regulation des kontraktilen Apparates von
porcinen Endothelzellen

SUSANNE NAU

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen im Fachbereich vertreten

durch: Prof. Dr. M. Bergmann

und

dem Institut für Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. R. Schulz

Betreuer: Prof. Dr. T. Noll

Rolle des NO/cGMP-Signalweges bei der Regulation des kontraktile Apparates von porcinen Endothelzellen

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.

im Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Susanne Nau

Tierärztin aus Haan

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Prof. Dr. Dr. h. c. M. Kramer

Gutachter:

1. Prof. Dr. M. Bergmann
2. Prof. Dr. T. Noll

Tag der Disputation:

7. Februar 2014

"Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. 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."

Susanne Nau

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	1
1 Einleitung	4
1.1 Endothelzellen bilden eine selektive Schranke	4
1.2 Endotheliale Faktoren der Permeabilitätsregulation	6
1.3 Endotheliale Adhäsionsstrukturen	7
1.4 Der endotheliale kontraktile Apparat	8
1.5 Regulation der Zellkontraktion durch MLK-Kinase und-Phosphatase	10
1.6 Rolle von NO/cGMP in Endothelzellen	14
1.7 Fragestellung und Ziel der Arbeit	19
2 Material	20
2.1 Chemikalien	20
2.2 Antikörper	22
2.3 Geräte und Laborbedarf	22
3 Methoden	25
3.1 Isolation und Kultivierung von porcinen Aortenendothelzellen	25
3.2 Bestimmung der MLK-Phosphorylierung	27
3.3 Bestimmung der endothelialen Makromolekülpermeabilität	33
3.4 Bestimmung der zytosolischen Ca ²⁺ -Konzentration	35
3.5 Bestimmung der Translokation der Proteinphosphatasen 1 an Myosin	37
3.6 Bestimmung der isometrischen Kraftentwicklung	42
3.7 Statistik	45
4 Ergebnisse	46
4.1 Wirkung von DEA-NONOate auf die MLK-Phosphorylierung und die zytosolische Ca ²⁺ -Konzentration	46
4.2 Wirkung von DEA-NONOate, YC-1, Sp-8-Br-PET-cGMPS und Rp-8-pCPT-cGMPS auf die Permeabilität	47

4.3 Wirkung von DEA-NONOate, YC-1, Sp-8-Br-PET-cGMPS und Rp-8-pCPT-cGMPS auf die isometrische Kraftentwicklung	50
4.4 Wirkung von DEA-NONOate, YC-1, Sp-8-Br-PET-cGMPS und Rp-8-pCPT-cGMPS auf die MLK-Phosphorylierung	52
4.5 Wirkung von DEA-NONOate , ML-7 und Calyculin A auf die MLK-Phosphorylierung	55
4.6 Wirkung von DEA-NONOate auf die Translokation der PP1 an Myosin	56
5 Diskussion	58
6 Zusammenfassung	66
7 Summary	68
8 Literaturverzeichnis	70
9 Danksagung	85

Verzeichnis der Abkürzungen

ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser (aqua bidestilata)
BCIP	5-Bromo-4-chlor-3-indolylphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
Ca ²⁺	2-wertiges 2-fach positiv geladenes Calciumion
Ca _i	freie zytosolische Ca ²⁺ -Konzentration
CAMK II	Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase II
cAMP	cyclo-Adenosin-3',5'-monophosphat
cGMP	cyclo-Guanosin-3',5'-monophosphat
DEA-NONOate	2-(N,N-Dimethylamino)-diazemat-2-oxid
DMEM	Dulbeccos Modification of Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECGM	Endothel Cell Growth Medium, Kulturmedium
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β-aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure
FKS	fötales Kälberserum
Fura-2 AM	Fura-2-Acetoxymethylester
g	Erdbeschleunigung
GC	Guanylylzyklase
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	Horse raddish peroxidase
HUVEC	humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen
IE	internationale Einheit
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
ML-7	(5-Iodonaphtalen-1-sulfonyl)-homopiperazin
MLK	Myosinleichtketten

Verzeichnis der Abkürzungen

MLK-P	Phosphorylierte Myosinleichtketten
MLK~P	monophosphorylierte MLK
MLK~PP	diphosphorylierte MLK
MYPT1	Myosin-bindende Phosphataseuntereinheit 1
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
NKS	neonatales Kälberserum
NO	Stickstoffmonoxid
NO-Synthase	Stickstoffmonoxid-Synthase
n.s.	nicht signifikant
P	Signifikanzniveau
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDE	Phosphodiesterase
pGC	membrangebundene Guanylylzyklase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Proteinphosphatase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rp-8-pCPT-cGMPS	Rp-8-(4-chlorophenylthio)-guanosin-3',5'-zyklo- monophosphorothioat-Rp-diastereoisomer
RhoA	Rat sarcoma protein homolog gene family, member A
Rock	Rho-assozierte Proteinkinase
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
sGC	lösliche Guanylylzyklase
Sp-8-Br-PET-cGMPS	β-Phenyl-1-N ² -ethano-8-bromoguanosin-3',5'-zyklo- monophosphorothioat-Sp-diastereoisomer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin

Verzeichnis der Abkürzungen

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VASP	Vasodilator-stimuliertes-Phosphoprotein
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VE-Catherin	vaskuläres, endotheliales Catherin
(vol/vol)	Volumenprozent
vs.	versus
% (wt/vol)	Gewichtsprozent
YC-1	3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazol

Ferner gelten die Abkürzungen des Periodensystems der Elemente und die Symbole des SI-Systems der Maßeinheiten (*Système International d'unités*).

1 Einleitung

Das Endothel kleidet als einschichtiges, kontinuierliches Plattenepithel die Innenwand sämtlicher Gefäße im Organismus aus. Mit einer Oberfläche von 10.000 m² sind die Endothelzellen von großer funktioneller Bedeutung. Sie bilden eine selektive Schranke zwischen dem Gefäßlumen und dem Interstitium und regulieren so aktiv die Austauschvorgänge von Wasser, gelösten Salzen, Makromolekülen und Blutzellen. Diese Vorgänge sind zur Aufrechterhaltung der Homöostase essentiell. Aber auch im Rahmen einer Inflammation spielt die Regulation der endothelialen Permeabilität eine große Rolle: Mediatorvermittelt wird die Durchlässigkeit des Endothels erhöht, was zur Folge hat, dass ins Besondere vermehrt Wasser und Makrophagen ins Interstitium übertreten können, und das Entzündungsgeschehen verstärkt wird. Genauso besitzen Endothelzellen aber auch antiinflammatorische und antithrombogene Eigenschaften, wie Stabilisierung der endothelialen Barriere und Verhinderung der Adhäsion von Thrombo- und Leukozyten an die innere Gefäßwand.

Die endotheliale Schrankenfunktion wird über intrazelluläre, endotheliale Signaltransduktionswege vermittelt. Diese Signalwege werden durch endokrine und parakrine Botenstoffen, wie z.B. dem Angiotensin, Thrombin oder dem Atrialen Natriuretischen Peptid (ANP) reguliert. In diesem Zusammenhang sind vor allem die Signaltransduktionswege von besonderer Bedeutung, die über Stickstoffmonoxid (NO) bzw. cyclo-Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) vermittelt werden. Die Rolle von NO/cGMP im Hinblick auf die Regulation der Schrankenfunktion von makrovaskulären Endothelzellen steht im Zentrum der vorliegenden Arbeit.

1.1 Endothelzellen bilden eine selektive Schranke

Das Endothel bildet eine selektive Schranke für niedermolekulare, plasmatische Bestandteile und Makromoleküle zwischen dem intravasalen Raum und dem Interstitium. Durch diese Schranke gibt es 2 Transportwege, ein transzellulärer und ein parazellulärer Weg (Stevens et al., 2000).

Der transzelluläre Transport erfolgt durch Transzytose. Dabei werden bestimmte Proteine und andere Stoffe in Form von Vesikeln, den *vesikulo-vakuoläre Organellen*

(VVOs) oder Caveolae, aktiv durch das Endothel geleitet (Simionescu, 1983; Michel, 1996; Dvorak und Feng, 2001). Der transzelluläre Transport kann aber auch passiv erfolgen. Dabei passieren kleinere Moleküle, Gase und Wasser die endotheliale Schranke per Diffusion.

Quantitativ bedeutender als der transzelluläre Transportweg ist jedoch der Parazelluläre, bei dem sich porenähnliche Spalträume im Bereich der Zell-Zell-Kontakte bilden. Durch diese Spalten gelangen per Konvektion und Diffusion Blutzellen, Albumine und größere Flüssigkeitsmengen in den angrenzenden Raum, was besonders im Rahmen eines Entzündungsgeschehens von Bedeutung ist.

Die parazellulären Austauschvorgänge sind abhängig von der jeweiligen Permeabilität der Endothelzellschicht für die verschiedenen Moleküle und der resultierenden Filtrationskräfte aus hydrostatischem-, interstitiellem- und kolloidosmotischem Druck (Rippe und Haraldsson, 1994; Michel und Curry, 1999). Dabei wird die Permeabilität und damit die endotheliale Spaltbildung durch endokrine und parakrine Mediatoren gesteuert. Unter pathologischen Bedingungen kann sie sich durch den Einfluss von spezifischen Botenstoffen unphysiologisch erhöhen und Ursache für ein Versagen der endothelialen Schrankenfunktion sein. Wird z.B. im Zuge eines Entzündungsgeschehens Histamin freigesetzt, so bilden sich interzelluläre Spalten im Endothel (Majno und Palade, 1961). Dies ermöglicht die Passage von Stoffen, die unter physiologischen Bedingungen durch die endotheliale Barriere zurückgehalten werden. Die Extravasation von Plasmaproteinen geht einher mit einem Austritt von Wasser in das umliegende Gewebe, so dass ein schädliches Ödem entsteht. Die verminderte Perfusion in dieser Region bedeutet ein Versorgungsmangel des ödematösen Gewebes. Durch zumeist zusätzliche Druckatrophie werden die Zellen zerstört, wobei ihre Regenerationsfähigkeit vermindert ist. Diese Permeabilitätserhöhung führt zum Funktionsverlust oder sogar zum Untergang des betroffenen Gewebes und steht daher in Verbindung mit vielerlei Erkrankungen. In einigen Fällen ist sie sogar Ursache von lebensbedrohlichen Syndromen. Bei asthmatischen Erkrankungen beispielsweise, kann vermehrter Plasmadurchtritt aus den Gefäßen in die Atemwege zu akuter Atemnot mit anschließendem Erstickungstod führen (Groeneveld, 2003). Erhöhte vasale Permeabilität kann außerdem im Laufe einer Sepsis einen Kreislaufkollaps hervorrufen oder zerebrale Infarkte verschlimmern (Paul et al., 2001). Bei der diabetischen Retinopathie begünstigt sie die intravasale Narbenbildung, die bis zur

völligen Erblindung führen kann. Pathophysiologische Permeabilitätserhöhung spielt auch bei der Entstehung von atherosklerotischen Erkrankungen eine Rolle (Colangelo et al., 1998; Nielsen, 1996). Zusammengenommen zeigen diese Befunde die bedeutende Rolle eines endothelialen Schrankenversagens für die Entwicklung von pathophysiologischen Situationen.

1.2 Endotheliale Faktoren der Permeabilitätsregulation

Die parazelluläre Permeabilität resultiert aus dem Zusammenspiel zweier unterschiedlicher Mechanismen, der Regulation der Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Adhäsionsstrukturen (Zelladhäsionskraft) und des zytoskelettalen, kontraktilen Apparates (Baldwin und Thurston, 2001; Garcia et al., 1995; Lum und Malik, 1996). Auslöser für eine Erhöhung der Permeabilität sind z.B. Entzündungsmediatoren, wie Histamin oder Thrombin, die eine intrazelluläre Signaltransduktion in Gang setzen. Dies hat zur Folge, dass sich die Adhäsionsstrukturen lösen, das Zytoskelett fragmentiert und der kontraktile Apparat aktiviert wird, so dass sich die Zelle verkürzt. Diese Abläufe führen zu einer Bildung von interendothelialen Spalten und damit zum Verlust der Schrankenfunktion (Abb. 1). Bei Wiederaufbau der Zelladhäsion und Hemmung des kontraktilen Apparates reduziert sich die Spaltbildung, und die endotheliale Schrankenfunktion wird wieder hergestellt.

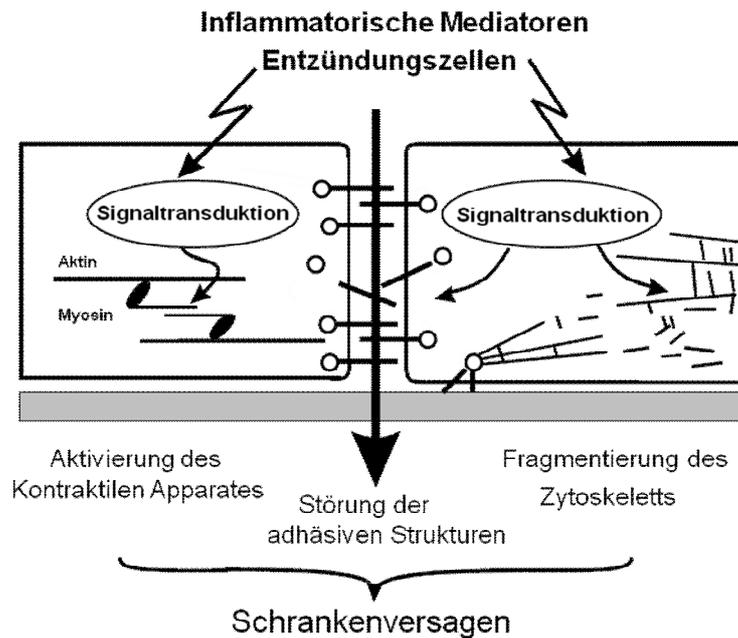


Abb. 1: Mechanismen des endothelialen Schrankenversagens

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit steht die Analyse von NO/cGMP-vermittelten, intraendothelialen Signalmechanismen, welche die Schrankenfunktion des Endothels verbessern. Es wird dabei die Hypothese überprüft, ob eine NO/cGMP-induzierte Stabilisierung der Schrankenfunktion auf einer Hemmung des kontraktiven Apparates beruht.

1.3 Endotheliale Adhäsionsstrukturen

Endothelzellen stehen untereinander über sogenannte Adherens junctions in Verbindung. Diese werden durch bestimmte Adhäsionsproteine gebildet, wie z.B. dem vaskulären, endothelialen Catherin (VE-Catherin). Die extrazelluläre Domäne der VE-Catherine verbindet über Ca^{2+} (2-wertiges 2-fach positiv geladenes Calciumion)-abhängige homophile Wechselwirkungen die benachbarten Endothelzellen. Hingegen interagiert die intrazelluläre Domäne mit dem Aktin-Zytoskelett über Catenine (Bazzoni und Dejana, 2001; Dejana et al., 1999). Die Anheftung der Endothelzellen an die extrazelluläre Matrix wird durch Transmembranrezeptoren vermittelt, den Integrinen. Diese kommunizieren mit

speziellen intrazellulären Proteinen, welche die Verbindung der Integrine mit dem Zytoskelett vermitteln (Aplin et al., 1998; Geiger et al., 2001).

An der Regulation der Stabilisierung des Zytoskelettes ist vermutlich das Vasodilator-Stimulierte-Phosphoprotein (VASP) beteiligt, welches als intrazelluläres zytoskelettales Bindungsprotein in den Bereichen der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte lokalisiert ist (Reinhard et al., 1992, 1999). Dort steht es mit intrazellulären Proteinen in Verbindung, wie Aktin (Hüttelmaier et al., 1999) und den fokalen Bindungsproteinen Zyxin und Vinculin (Niebuhr et al., 1997). VASP wird durch cyclo-Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) Proteinkinase A (PKA) und cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG) phosphoryliert (Lohmann et al., 1997; Draijer et al., 1995 a, b; Halbrügge et al., 1990).

Experimente von Smolenski et al. (2000) zeigen, dass in humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) die Aktivierung der PKG eine Verlagerung der Zytoskelettproteine von fokalen Adhäsionsstellen auslöst, wobei VASP und Zyxin von besondere Bedeutung sind. Diese Umbauprozesse verursachen eine Destabilisierung der Zelladhäsionsstrukturen und können im Zusammenhang mit der PKG-abhängigen Verminderung der Zellmigration stehen. Jedoch ist der genaue funktionelle Einfluss von VASP auf das endotheliale Zytoskelett bislang nicht geklärt.

1.4 Der endotheliale kontraktile Apparat

Die kontraktile Elemente der Endothelzellen umfassen im Wesentlichen die Proteingruppen Aktin, Myosin, Tropomyosin und α -Aktinin (Drenckhahn und Mannherz, 1983; Gabbiani et al., 1983; Schnittler et al., 1990). Das Myosinmolekül besitzt einen zweigeteilten Kopf, der gelenkartig mit dem Halsstück verbunden ist. Über ein weiteres Gelenk verbunden schließt sich das Schwanzstück an. Der Einfluß von inflammatorischen Stimuli, wie z.B. Thrombin (Garcia et al., 1986; Patterson et al., 1994), Histamin (Rotrosen und Gallin, 1986), Zytokine, Sauerstoffradikale oder neutrophile Granulozyten (Hixenbaugh et al., 1997) können den endothelialen kontraktile Apparat aktivieren. Dabei binden zu Beginn reversibel die Myosinköpfe an Aktin, knicken im Kopf-Hals-Gelenk ab und gleiten an dem Aktinfilament entlang. Dann lösen sie sich wieder und richten sich in ihre Ausgangsposition auf. Durch dieses Ineinandergleiten der Aktin- und Myosinfilamente verkürzt sich die

Endothelzelle, so dass interendotheliale Spalten entstehen. Dabei steigt die freie zytosolische Ca^{2+} -Konzentration (Ca_i).

Andere Stimuli, wie z.B. Adenosin, bewirken, in diesem Falle über PKA vermittelt, eine Inaktivierung des kontraktiven Apparates, und letztlich eine Verminderung der endothelialen Spalten (Casnocha et al., 1989, Langeler und van Hinsbergh, 1991; Hempel et al., 1996).

Die Aktin-Myosin-Interaktion der Endothelzellen wird durch den Aktivierungsgrad der regulatorischen Myosinleichtketten (MLK) bestimmt, welche die zentralen regulatorischen Proteine des kontraktiven Apparates darstellen. Deren Phosphorylierung bestimmt die Aktin-Myosin-Interaktion und somit die Permeabilität des Endothels ((Abb. 2) Schnittler et al., 1990; Wysolmerski und Lagunoff, 1990). Die Untersuchung des Aktivierungsstatus der MLK spielt im Hinblick auf die Regulation der endothelialen Schrankenfunktion in dieser Arbeit eine zentrale Rolle.

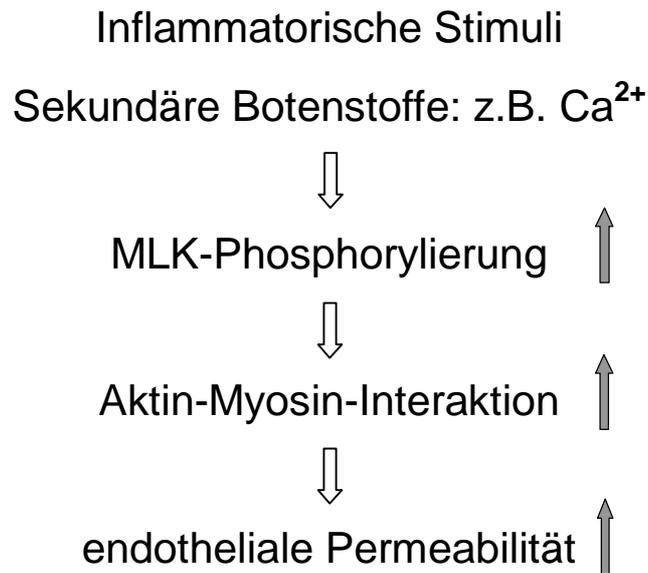


Abb. 2: Permeabilitätserhöhung durch Aktivierung der Myosinleichtketten (MLK)-Phosphorylierung in Endothelzellen. Inflammatorische Stimuli bzw. bestimmte sekundäre Botenstoffe erhöhen die MLK-Phosphorylierung. Die Interaktion der Aktin- und Myosinfilamente nimmt zu und verursacht eine Zunahme der endothelialen Permeabilität.

1.5 Regulation der Zellkontraktion durch MLK-Kinase und -Phosphatase

Für die Kontraktion der Endothelzellen und somit für die Durchlässigkeit des Endothels ist der Phosphorylierungsstatus der Myosinleichtketten entscheidend. Dieser wird durch die wechselnde Aktivität der MLK-Kinasen und MLK-Phosphatasen bestimmt (Abb. 3).

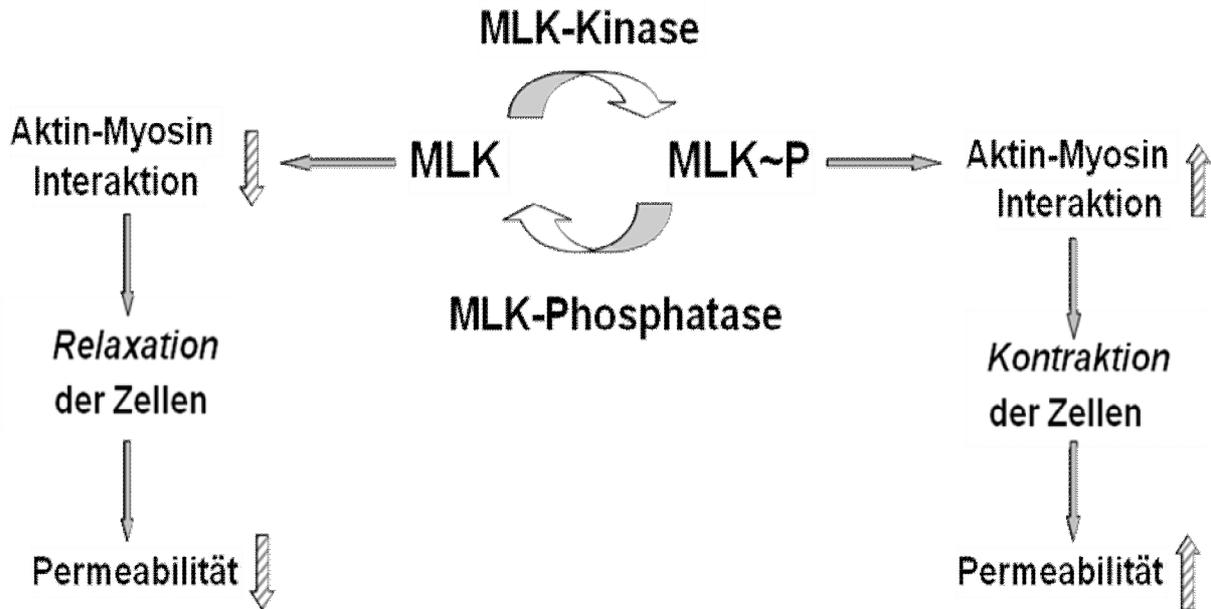


Abb. 3: Wirkung der Myosinleichtketten (MLK)-Kinase bzw. MLK-Phosphatase auf den endothelialen kontraktilen Apparat. Aktivierung der MLK-Kinase bewirkt über Zunahme der phosphorylierten MLK (MLK-P) eine Aktivierung des kontraktilen Apparates, wodurch die Zellen kontrahieren und die Permeabilität steigt. Aktivierung der MLK-Phosphatase hingegen führt über verminderte MLK-Phosphorylierung zu Inaktivierung des kontraktilen Apparates, wodurch die Zellen relaxieren und die Permeabilität sinkt.

Regulation der Zellkontraktion durch MLK-Kinase in glatten Muskelzellen

Wesentliche Vorstellungen über die Aktivierung des kontraktilen Apparates von Endothelzellen stammen aus Forschungsarbeiten an glatten Muskelzellen. Es ist bekannt, dass adäquate Stimuli, die eine Kontraktion der glatten Muskelzelle hervorrufen, eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration bewirken. Das aus dem endoplasmatischen Retikulum stammende intrazelluläre Ca^{2+} bindet an Calmodulin, wodurch einerseits die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige MLK-Kinase und andererseits die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CAMK II) aktiviert wird. Aktivierung der CAMK II bewirkt eine Phosphorylierung und Hemmung der MLK-Kinase (Adelstein et al., 1981; Stull et al., 1990; Tansey et al., 1994). Dies wird als ein negativer Feedback-Mechanismus verstanden, um einer überschießenden MLK-Phosphorylierung entgegenzuwirken (Word et al., 1994).

Die MLK-Kinase wird auch durch die PKA (Conti und Adelstein, 1981), Proteinkinase C (PKC) (Nishikawa et al., 1983) und die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase) (Klemke et al., 1997; Suizu et al., 2000; Kamm und Stull, 2001; D'Angelo und Adam, 2002) phosphoryliert. Es wird vermutet, dass sich durch diese Phosphorylierung die Ca^{2+} -Sensitivität der MLK-Kinase ändert und damit die Kontraktionskraft der Muskelzelle beeinflusst wird (Arner und Pfitzer, 1999).

Regulation der Zellkontraktion durch MLK-Kinase in Endothelzellen

Auch der kontraktile Apparat von Endothelzellen wird über die Aktivierung einer Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Proteinkinase gesteuert (Khimenko et al., 1996; Garcia et al., 1995). Diese phosphoryliert die endotheliale MLK-Kinase, die eine Isoform der muskulären MLK-Kinase darstellt. Die MLK-Kinase phosphoryliert die MLK direkt an Threonin (Thr) 18 und/oder Serin (Ser) 19 (Garcia et al., 1995, 1997, Goeckler und Wysolmerski, 1995; Hixenbaugh et al., 1997; Verin et al., 1998). Die Phosphorylierung der MLK stellt die Startreaktion für die Aktivierung der kontraktile Elemente in Endothelzellen dar, die über Retraktion der Zellen zu einer Permeabilitätserhöhung führt (Wysolmerski und Lagunoff, 1990, 1991; Garcia et al., 1997). Daneben wird, analog zu Glattmuskelzellen, in Endothelzellen die Möglichkeit einer MLK-Phosphorylierung durch Rho-Kinasen diskutiert (van Nieuw Amerongen und van Hinsbergh, 2001).

Über mögliche Inaktivierungsmechanismen der endothelialen MLK-Kinase ist wenig bekannt. Garcia et al. (1995, 1997) beschrieb einen Mechanismus, bei dem MLK über einen cAMP-abhängigen Mechanismus dephosphoryliert werden. Dabei wird angenommen, dass die MLK-Kinase durch PKA phosphoryliert und dadurch inaktiviert wird.

Regulation der Zellkontraktion durch MLK-Phosphatase

Als Antagonist zur MLK-Kinase, steht die MLK-Phosphatase, die die MLK dephosphoryliert und den kontraktile Apparat inaktivieren. Dies führt zu einer Kraftabnahme der glatten Muskelzelle (Lee und Kitazawa, 1997).

Auch in Endothelzellen konnte nachgewiesen werden, dass eine MLK-Dephosphorylierung durch MLK-Phosphatasen eine Inaktivierung des kontraktiven Apparates und Abnahme der isometrischen Kraftentwicklung bewirkt (Goeckler und Wysolmerski 1995; Gündüz et al., 2003).

Die MLK-assoziierte Phosphatase der Glattmuskelzelle gehört zu der Gruppe der Proteinphosphatasen (PP) und besteht als Holoenzym aus mehreren Untereinheiten (Hartshorne 1998; Herzig und Neumann, 2000; Somlyo et al., 1999). Diese sind bisher genauer nur in Zellen des muskulären Typs untersucht worden. Die MLK-Phosphatase ist ein Multiproteinkomplex und besteht grundsätzlich aus 3 Untereinheiten (Okubo et al., 1993, 1994): Aus einer Myosin-bindenden Untereinheit (MYPT1, 130 kDa) einer katalytischen Untereinheit PP1 δ (37 kDa) und einer kleineren 20-kDa Untereinheit mit noch unbekannter Funktion (Alessi et al., 1992; Cohen, 1989, 2002; Ichikawa et al., 1996; Ito et al., 2004; Terrak et al., 2004). Die katalytische Untereinheit PP1 δ ist relativ substratspezifisch. Die Substratspezifität der PP1 kommt dadurch zustande, dass die katalytische Untereinheit PP1 δ über MYPT1 an Myosin transloziert und gebunden wird (Ishihara et al., 1989; Ichikawa et al., 1996). Darüber hinaus ist MYPT1 an der Regulation der Aktivität des Holoenzym beteiligt.

Neuere Arbeiten zeigen, dass die Aktivierungsmechanismen der MLK-Phosphatase in Endothelzellen große Ähnlichkeiten mit denen in glatten Muskelzellen hat (Härtel et al., 2007). Auch in Endothelzellen fand man die δ -Isoform der katalytischen Untereinheit der PP1 (Verin et al., 2000b; Knapp et al., 1999). Außerdem wurden in Endothelzellen die Expression und Komplexbildung mit MYPT1 beschrieben (Verin et al., 1998, 2000a; Härtel et al., 2007). Insgesamt sind jedoch die Signalmechanismen, die den kontraktiven Apparat in Endothelzellen regulieren, nur wenig verstanden.

Untersuchungen an Glattmuskelzellen konzentrierten sich bisher auf die Analyse von Mechanismen, die zu einer Hemmung der MLK-Phosphatase führen. Ein wichtiger regulatorischer Mechanismus, der in diesem Zusammenhang identifiziert wurde, wird über die kleine Rho-GTP (Guanosintriphosphat)-ase RhoA vermittelt. Dabei aktiviert RhoA die RhoA-assoziierte Kinase Rock, welche die regulatorische Untereinheit MYPT1 an Thr 850 und 696 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung bewirkt eine Hemmung des Phosphatase-Holoenzym (Kimura et al. 1996; Feng et al., 1999).

Analog zu den glatten Muskelzellen wird auch in Endothelzellen eine Beteiligung der Rho-assoziierten Kinasen angenommen. Es wurde gezeigt, dass z.B. Thrombin die

MLK-Phosphatasen der Endothelzellen rasch inaktivieren kann. Dies beruht auf einer Thrombin-induzierten Aktivierung des RhoA-Rock-Signaltransduktionsweges und Phosphorylierung von MYPT 1 an Thr 850 und 696 (Essler et al., 1998; Surks et al., 1999, Härtel et al. 2007).

Im Gegensatz zur MLK-Phosphatase-Hemmung ist über ihre Aktivierung nur wenig bekannt. Verschiedene Arbeiten an Glattmuskelzellen weisen darauf hin, dass bestimmte Mediatoren über Signalwege der PKA und PKG einen relaxierenden Effekt auf den glatten Muskel ausüben. Dabei spielt eine Aktivierung der MLK-Phosphatasen eine wesentliche Rolle. Eine Aktivierung der MLK-Phosphatase wird u.a. dadurch erklärt, dass regulatorische Proteine des Phosphatase-Holoenzym phosphoryliert werden. Diese sind aber bisher nicht eindeutig identifiziert. Ein inhibitorisches Regulatorprotein könnte der Inhibitor-1 sein, der durch PKA-abhängige Phosphorylierung seine inhibitorische Wirkung auf die PP1-Untereinheit verliert und damit zur Aktivierung der MLK-Phosphatase beiträgt (Hartshorne, 1998; Somlyo et al., 1999; Arner und Pfitzer, 1999).

1.6 Rolle von NO/cGMP in Endothelzellen

In Endothelzellen ist der NO/cGMP-Signalweg von zentraler Bedeutung für Effekte, die durch die Schubspannung des strömenden Blutes, intrazelluläre Signale, Hormone, Pharmaka oder Toxine ausgelöst werden. Zu den gefäßprotektiven Wirkungen gehören die Hemmung der Leukozyten-Endothelzellen-Interaktion, Thrombozytenaggregation und Stabilisierung von Mastzellen (Kubes, 1995). In der vorliegenden Untersuchung liegt das Augenmerk auf dem Einfluss von NO/cGMP auf die Regulation des kontraktilen Apparates und der endothelialen Permeabilität.

Die überwiegende Mehrzahl der *in vitro* Experimente an kultivierten Endothelzellschichten aus z.B. Nabelschnur von Mensch und Rind oder Schweineaorta zeigen, dass die Aktivierung des NO/cGMP-Weges eine Senkung der parazellulären Permeabilität verursacht (Baron et al., 1989; Draijer et al., 1995a; Yamada et al., 1990; Westendorp et al., 1994). Außerdem wurde gezeigt, dass die permeabilitätssenkende Wirkung von NO/cGMP eine Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität aufhebt (Yamada et al., 1990; Westendorp et al., 1994). Experimente mit pulmonalen arteriellen Endothelzellen des Menschen *in vitro* zeigen vergleichbare Ergebnisse: NO/cGMP wirkt einer Schädigung der endothelialen

Schranke entgegen, die durch oxidativen Stress verursacht wurde (Moldobaeva et al., 2006).

Auch in Versuchen mit isolierten Lungen zeigte sich, dass NO/cGMP die vaskuläre Permeabilität senkt, wenn die Lungen hyperventiliert wurden (Schmidt et al., 2008), der intravasale Druck erhöht (Yin et al., 2008) oder die Lungen durch Ischämie-Reperfusionvorgänge geschädigt wurden (Egemnazarov et al., 2009).

Darüber hinaus bewirkte eine NO-Inhalation in Tierversuchen eine Reduktion des Lungenödems. Hierbei wird vermutet, dass sowohl eine NO/cGMP-bedingte Gefäßrelaxation als auch Effekte auf die endotheliale Schrankenfunktion eine Rolle spielen (Garat et al., 1997; Bloomfield et al., 1997).

Weitere *in vivo* Experimente mit exogen verabreichtem ANP/cGMP zeigten ebenfalls eine protektive Wirkung auf das Lungenendothel: Bei Hunden z.B. konnte ein coronar bedingtes Lungenödem vermindert werden (Riegger et al., 1990), bei Nagetieren zeigte sich eine Reduktion des Lungenödems, nachdem die endotheliale Schranke durch Ischämie-Reperfusion geschädigt wurde (Dodd-o et al., 2008), und bei Mäusen konnte eine prophylaktische ANP-Gabe ein durch *Staphylococcus aureus*-Infektion bedingtes Lungenödem verhindert werden (Xing et al., 2011).

Dabei zeigten Experimente mit pulmonalen Mikro- und Makrovaskularzellen, dass ANP/cGMP einen vasoprotektiven Effekt ausübt (Irwin et al., 2005; Klinger et al., 2006; Scott et al., 2010).

Diese Beobachtungen zeigen die Bedeutung der schrankenstabilisierenden Wirkung von NO/cGMP im Hinblick auf die Aufrechterhaltung der Hämostase und der Verhinderung von Ödemen in sowohl physiologischen als auch in pathophysiologischen Situationen.

Der NO/cGMP-Signaltransduktionsweg vermittelt jedoch nicht nur permeabilitätssenkende Effekte, sondern in bestimmten Organen und unter bestimmten experimentellen Bedingungen wurden permeabilitätssteigernde Effekte beobachtet:

Versuche an isoliert-perfundierten Mikrogefäßen zeigen, dass sowohl NO-Donatoren, als auch Aktivatoren der Guanylylzyklase (GC) einen Anstieg der Permeabilität auslösen. Als Aktivatoren werden dabei z.B. der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), Histamin, Bradykinin oder der Tumor-Nekrose-Faktor beschrieben (Bates, 1998; He et al., 1998; Meyer und Huxley, 1992; Mayhan, 1994; Ramirez et al., 1996; Wu et al., 1996; Yuan et al., 1993).

Experimente in situ ergaben bei Einsatz spezifischer inflammatorischer Stimuli eine cGMP-vermittelte Erhöhung der endothelialen Permeabilität in bestimmten Organen wie der Haut (Sarker und Fraser, 2002).

Darüberhinaus konnte auch in vivo gezeigt werden, dass ANP/cGMP eine Steigerung der endothelialen Permeabilität in der Haut und in der quergestreiften Muskulatur bewirkt (Schreier et al., 2008, Curry et al., 2010, Chen et al., 2012).

Diese gegensätzliche Wirkung von NO/cGMP im Hinblick auf die endotheliale Permeabilität kann durch regionale Eigenheiten der Zellen erklärt werden. In diesem Zusammenhang scheinen besonders die unterschiedliche Expression von Isoformen der PKG und der Phosphodiesterasen (PDE) in den Gefäßprovinzen von Bedeutung zu sein. Aber auch Unterschiede in den experimentellen Bedingungen spielen eine Rolle (Yuan, 2003).

Regulation der Zellkontraktion durch NO/ cGMP

In der Vergangenheit ist die NO/cGMP-vermittelte Signaltransduktion vor allem an glatten Muskelzellen untersucht worden. Hier kann cGMP über zwei Wege synthetisiert werden: 1. zum einen durch Aktivierung der löslichen zytosolischen Guanylylzyklase (sGC), via endothelial-gebildetem NO oder durch exogene pharmakologische NO-Donatoren, und 2. durch Aktivierung einer membrangebundenen Guanylylzyklase (pGC), die den zytoplasmatischen Teil des ANP-Rezeptors darstellt. ANP bindet an die pGC und löst die Bildung von cGMP aus GTP aus (Koesling, 1999). Eine Erhöhung der zellulären cGMP-Konzentration führt zu Aktivierung der PKG. Diese wiederum aktiviert die MLK-Phosphatase, so dass schließlich die MLK dephosphoryliert werden und die Glattmuskelzellen relaxieren (Surks et al., 1999).

In Endothelzellen verläuft die Signaltransduktion ähnlich wie in glatten Muskelzellen. Durch eine Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, wie sie z.B. im Rahmen einer Inflammation durch Histamin oder Bradykinin ausgelöst wird, wird die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase) aktiviert (Schini und Vanhoutte, 1992; Förstermann et al., 1991). Das dabei gebildete NO aktiviert die sGC welche wiederum cGMP synthetisiert (Shin et al., 1992; Boulanger et al., 1990; Walter, 1989, Lincoln et al., 1996). Außerdem kann cGMP durch die membrangebundene GC gebildet werden, welche die intrazelluläre Domäne des

ANP-Transmembranrezeptors darstellt (Alexander et al., 2011). cGMP stimuliert die PKG, cGMP-abhängige Ionenkanäle und reguliert PDE (Lohmann et al., 1997). Dabei wird die PDE II durch cGMP aktiviert und die PDEIII gehemmt, welche cGMP und cAMP hydrolysiert (Kemp-Harper, 2009).

Somit steigt die cAMP-Konzentration, was eine Aktivierung der PKA und eine Stabilisierung der Adhäsionsproteine zur Folge hat. Daraus resultiert eine Herabsetzung der endothelialen Albumindurchlässigkeit. cGMP könnte über diesen Mechanismus einen barrierestabilisierenden Effekt ausüben (Sayner et al., 2011).

Wie bereits oben erwähnt, bewirkt ein Anstieg von cGMP in Endothelzellmonolayern eine Abnahme der Makromolekülpermeabilität (Baron et al., 1989; Yamada et al. 1990; Westendorp et al. 1994). Der Mechanismus dieser NO/cGMP-Wirkung auf die endotheliale Schrankenfunktion wird bisher jedoch nur teilweise verstanden. Die zentrale Annahme, die dieser Untersuchung zugrunde liegt ist, dass der NO/cGMP-Effekt auf einer Hemmung des kontraktilen Apparates beruht. Dabei wird vermutet, dass NO/cGMP über PKG die MLK-Phosphatase aktiviert, dadurch die MLK-Phosphorylierung in den Endothelzellen abnimmt, und der kontraktile Apparat inaktiviert wird. Eine Abnahme der MLK-Phosphorylierung könnte jedoch auch durch eine Hemmung der MLK-Kinase verursacht werden (Abb. 4).

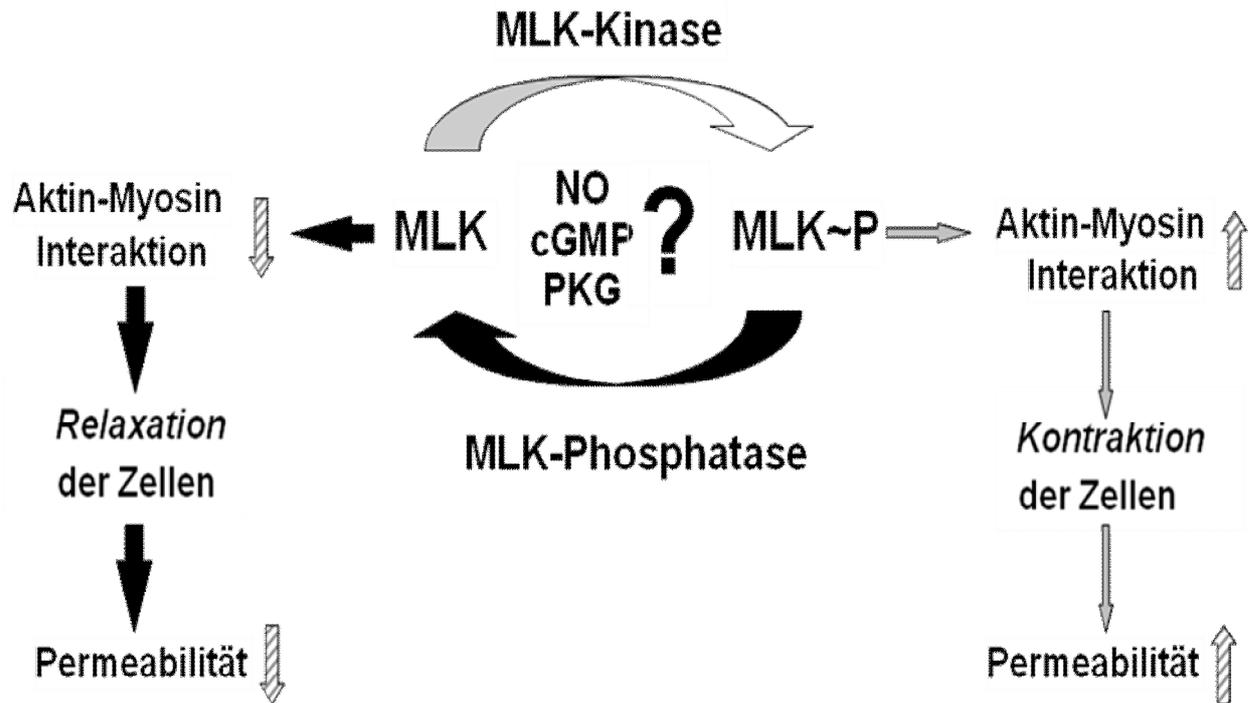


Abb. 4 : Wirkung von NO/cGMP auf die Myosinleichtketten (MLK) -Kinase bzw. -Phosphatase. Die zentrale Frage der Untersuchung ist, ob NO/cGMP über Hemmung des kontraktiven Apparates die Makromolekülpermeabilität senkt. Unklar ist dabei, ob die MLK durch Hemmung der MLK-Kinase oder Aktivierung der MLK-Phosphatase dephosphoryliert werden.

1.7 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse des NO/cGMP-abhängigen Signalweges auf den kontraktilem Apparat von Endothelzellen. Im Speziellen wurde dabei die Regulation der MLK-Kinasen und MLK-Phosphatasen bezüglich der MLK-Dephosphorylierung untersucht, wobei folgenden Fragen nachgegangen wurde:

1. Wie beeinflusst NO/cGMP die endotheliale Permeabilität?
2. Ändert sich die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration der Endothelzellen nach Stimulation des NO/cGMP-Signalweges?
3. Wird der kontraktile Apparat der Endothelzellen durch NO/cGMP gehemmt?
4. Inwiefern wird dabei die isometrische Kraftentwicklung der Endothelzellen durch NO/cGMP verändert?
5. Über welchen Mechanismus reguliert die NO/cGMP-abhängige Signaltransduktion die Dephosphorylierung der MLK? Welche Rolle spielt dabei eine Hemmung der MLK-Kinase oder Aktivierung der MLK-Phosphatase?
6. Löst NO/cGMP die Translokation der endothelialen MLK-Phosphatase zum Myosin aus?

Die Untersuchungen wurden an kultivierten Endothelzellen aus der Aorta des Schweines durchgeführt. Der Aktivierungszustand des endothelialen kontraktilem Apparates wurde über die Phosphorylierung der MLK, sowie der isometrischen Kraftentwicklung der Zellen bestimmt. Die Aktivierung der MLK-Phosphatase wurde über die Translokation der PP1-katalytischen Untereinheit an Myosin untersucht. Die Albuminpassage durch Endothelzellmonolayer wurde als Parameter für die parazelluläre Permeabilität bestimmt. Die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration (Ca_i) wurde mittels einer Fluoreszenzindikator-Methode gemessen.

2 Material

2.1 Chemikalien

Häufig eingesetzte Chemikalien

Acrylamidlösung, PlusOne [®] (40 %)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
APS	Serva, Heidelberg
BCIP	AppliChem, Darmstadt
Bisacrylamidlösung, PlusOne [®] (2 %)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
BSA	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Calyculin A	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Cantharidin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Carbogen [®]	Messer Griesheim, Krefeld
Complete [®] Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Cytochalasin D	Upjohn, Heppenheim
DEA-NONOate	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Diethylether	Roth, Karlsruhe
DMEM	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
D-Saccharose	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchrn
DTT	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
ECL-Westernblotreagenz	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
EDTA-Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
ECGM	Promocell, Berlin
EGTA	Sigma-Aldrich Chemie , Taufkirchen
Ethanol	Riedel de Haën, Seelze
FKS	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Fura-2 AM	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerol, PlusOne [®] (87 %)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff, PlusOne [®]	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HEPES	Roche, Mannheim
Imidazol	Merck, Darmstadt

Material und Methoden

Ionomycin	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Medium 199 / Earl's Salts	Invitrogen, Karlsruhe
Mercaptophenol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Methanol	Riedel de Haën, Seelze
ML-7 Hydrochlorid	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
NBT	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
NKS	Invitrogen, Karlsruhe
PBS	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Pefabloc®	Roche, Mannheim
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
PVDF	Millipore, Eschborn
Rattenschwanzkollagen	First Link, Brierly Hill, UK
Rp-8-pCPT-cGMPS	Biolog Life Science Institute, Bremen
SDS	Serva, Heidelberg
Sp-8-Br-PET-cGMPS	Biolog Life Science Institute, Bremen
TCA	Merck, Darmstadt
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Thioglykolat (Natriumsalz)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
TRIS	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypanblau	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
YC-1	Biomol, Hamburg

2.2 Antikörper

Anti-Myosinleichtketten 20 K (monoklonal, Maus, Klon MY-21)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Anti-Maus-IgM (μ -Ketten spezifisch, AP(alkalische Phosphatase) -gekoppelt)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Anti-PP1 (polyklonal, Kaninchen)	Upstate, Schwalbach
Anti-Kaninchen-IgG (polyklonal, HRP-gekoppelt)	Upstate, Schwalbach

Alle übrigen Chemikalien waren von höchster erhältlicher Qualität und wurden bezogen von den Firmen Boehringer (Mannheim), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Riedel de Haën (Seelze) sowie Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen). Sie wurden nach Herstellerangaben verwendet und aufbewahrt.

2.3 Geräte und Laborbedarf

Zellkultur

Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Zellkulturschalen	Typ: Falcon 3803, 3003; Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilbank	Typ: Lamin Air HBB 2472, Heraeus, Hanau
Brutschrank	Typ: Cytoperm, Heraeus, Hanau
Mikroskop	Typ: TMSF-F , Nikon, Düsseldorf
Neubauer-Zählkammer	Superior, Marienfeld

Gelelektrophorese

Netzgeräte	Typ: High Voltage Power Pack P30 Typ: Power Pack P25, Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammern für Glycerol-Harnstoffgele	Typ: Minigelsystem, SE250/SE260 Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Blotkammer	Biotec-Fischer, Reiskirchen

Hamiltonspritze (50 µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
PVDF-Blotmembran	Typ: Immobilon-P Transfer Membran, Biotec-Fischer, Reiskirchen
Filterpapier	Typ: Universal Trockenpapier Biotec-Fischer, Reiskirchen

Makromolekülpermeabilität

Polykarbonat-Filtereinsätze (24 mm Durchmesser, 0,4 µm Porengröße)	Vitaris, Baar Typ Transwell TM
Durchflußspektrophotometer	Typ Specord 10, Zeiss, Jena

Ca²⁺-Bestimmung

Video-Imaging-System Deckgläser (25 mm Durchmesser)	Till Photonic, Gräfelfing Menzel, Braunschweig
---	---

Kraftmessung

Kraftwandler	Typ: KG 7A, Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Doppelbrückenverstärker	Typ: DUBAM 7C
Mikromanipulator	Märzhauser, Wetzlar
Sylgard-Silikon-Form	Typ: 186 Silicone Elastomer, Dow Corning Corp., Midland, USA

Verbrauchsmaterial

Parafilm [®]	PECHINEY Plastic Packaging, Menasha, WI, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Röhrchen, 10 ml	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Röhrchen, 50 ml	Typ: Falcon: 352070, Becton Dickinson, Heidelberg

Sterilfilter (0,2 µm Porenweite)	Sartorius, Göttingen
Trockenpapier	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Zellschaber	Becton Dickinson, Heidelberg

Sonstige Geräte

Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizer	Techne, Burkhardtsdorf
Magnet-Heizrührer	IKA-Werke, Staufen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Schüttler	Typ: WT 12, Biometra, Göttingen
Vortexer	IKA-Werke, Staufen
Wasserbad	Julabo Labortechnik, Seelbach
Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
Zentrifuge	Typ: Biofuge 15R, Heraeus, Hanau

Auswertung

Flachbettscanner	Hewlett Packard, Eschborn
Software	Image Quant [®]
	Molecular Dynamics, Krefeld
	i-Photo-Plus
	Quantity One
	Microsoft Excel

3 Methoden

3.1 Isolation und Kultivierung von porcinen Aortenendothelzellen

Die Endothelzellen wurden aus den Aorten von Schlachtschweinen isoliert (Spahr und Piper, 1990). Unmittelbar nach der Schlachtung im Schlachthof Giessen wurden von 25 ca. 6 Monate alten und 90 bis 110 kg schweren Schweinen ca. 20 cm lange Aortenabschnitte entnommen, welche in einem mit 0,9 %iger (wt/vol) Kochsalzlösung gefüllten Transportgefäß in das Physiologische Institut gebracht wurden. Eine Stunde nach der Tötung der Tiere begann die Präparation mit dem Befreien der Aortensegmente vom Bindegewebe sowie anhaftenden Lymphknoten. Anschließend wurden sie in Längsrichtung aufgeschnitten und auf einer Unterlage aufgespannt, so dass die Endothelschicht mit einem Skalpell unter leichtem Druck abgeschabt werden konnte.

M199/CO₂-Medium: (pH 7,4; sterilfiltriert)

Medium 199/Earl's Salts	9,62 g/l
HEPES	15 mM
NaHCO ₃	24 mM
Carbogen [®]	für mind. 1 Stunde begasen

Zellkulturmedium I:

M199/CO ₂ -Medium	76 % (vol/vol)
NKS	20 % (vol/vol)
Penicillin-Streptomycin	4 % (vol/vol)

Zellkulturmedium II:

M199/CO ₂ -Medium	78 % (vol/vol)
NKS	20 % (vol/vol)
Penicillin-Streptomycin	2 % (vol/vol)

Zellkulturmedium III:

M199/CO ₂ -Medium	93 % (vol/vol)
NKS	5 % (vol/vol)

Penicillin-Streptomycin 2 % (vol/vol)

HEPES/EDTA-Puffer: (pH 7,4; sterilfiltriert)

NaCl	125 mM
KCl	2,6 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
MgSO ₄	1,2 mM
HEPES	10 mM
EDTA-Na ⁺	0,5 mM

EDTA-Trypsinlösung: (pH 7,4; sterilfiltriert)

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄	8 mM
Trypsin	0,05 % (wt/vol)
EDTA	0,02 % (wt/vol)

Die so gewonnenen Zellen wurden in ein 37 °C warmes Zellkulturmedium I überführt, 10 Minuten bei 150 x g zentrifugiert und als Pellet in 50 ml Zellkulturmedium I durch Auf- und Absaugen mit einer Glaspipette resuspendiert. Nach ausreichender Zellvereinzellung wurde die Suspension auf 5 Primaria-Zellkulturschalen gleichmäßig ausplattiert, in welche zuvor jeweils 20 ml Zellkulturmedium I gegeben worden war. Die Schalen wurden dann bei 37 °C in Gegenwart von 5 % CO₂ inkubiert. Nach 3 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, so dass nicht anhaftende Zellen verworfen wurden.

Um ein besseres Zellwachstum zu fördern, wurde nach 24 Stunden das Zellkulturmedium I gegen das Zellkulturmedium II ausgetauscht, wobei die Antibiotikakonzentration halbiert wurde. Bis zum 4. Tag vermehrten sich die Zellen zu einer den gesamten Kulturschalenboden bedeckenden konfluenten Schicht. Nun konnten die Zellen subkultiviert werden, indem zuerst das Medium abgesaugt wurde, um sie dann nach 2-maligem Waschen mit HEPES-EDTA, für 5 Minuten mit 5 ml EDTA-Trypsinlösung zu inkubieren. Anschließend wurde die tryptische Loslösung der Zellen durch Zugabe von 5 % (vol/vol) serumhaltigem Zellkulturmedium III gestoppt.

Die Zellen wurden in einer Dichte von 7×10^4 Zellen/cm² für die biochemischen Analysen auf Kulturschalen, zur Bestimmung der Makromolekülpermeabilität auf Polycarbonat-Filtereinsätze, zur Messung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration auf Deckgläschen (Durchmesser 25 mm) oder zur Bestimmung der isometrischen Kraft auf Rattenschwanzkollagengelen ausgesät. Nach ca. 4 Tagen bildeten die Zellen eine dichte einlagige Schicht und wurden in den verschiedenen Experimenten eingesetzt.

3.2 Bestimmung der MLK-Phosphorylierung

Probenaufbereitung für die Harnstoff-Gelelektrophorese

Vor Inkubationsbeginn wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen mit HEPES-Inkubationsmedium vorsichtig gewaschen. Die Inkubation wurde gestartet, indem das zu untersuchende Agens, zusammen mit dem HEPES-Inkubationsmedium, in die Zellkulturschale hineinpipettiert wurde. Die Zellinkubation erfolgte in einem CO₂-freien Brutschrank und dauerte zwischen einer und sechzig Minuten.

HEPES-Inkubationsmedium: (pH 7,4; sterilfiltriert)

NaCl	125 mM
KCl	2,6 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
MgSO ₄	1,2 mM
HEPES	30 mM
CaCl ₂	1,0 mM

Stopplösung:

Trichloressigsäure (TCA)	10 % (wt/vol)
--------------------------	---------------

Harnstoff-Gel-Puffer:

TRIS	240 mM
Glycin	276 mM

Lysispuffer: (pH 8,8)

Harnstoff	8,8 M
DTT	10 mM
Thioglykolat	5 mM
Cantharidin	0,01 mM
Imidazol	60 mM
Harnstoffgel-Puffer	9,75 % (vol/vol)

Der Lysispuffer wurde unmittelbar vor jedem Versuch frisch angesetzt.

Elektrophorese-Auftragspuffer:

gesättigte Saccharose-Lösung mit 0,01 % (wt/vol) Bromphenolblau

Um die Inkubation zu beenden, wurden die Zellkulturschalen aus dem Brutschrank genommen, das Medium abgesaugt und durch 600 µl 10 % ige, eiskalte TCA ersetzt. Die Schälchen wurden sofort für 30 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden die ausgefällten Proteine vom Boden der Kulturschalen abgeschabt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Noch eventuell der Schale anhaftende Reste wurden mit 400 µl TCA abgespült und ebenfalls in die Reaktionsgefäße überführt. Nun erfolgte die Zentrifugation der Zellen bei 40.000 x g und 4 °C für 15 Minuten. Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 µl Diethylether gewaschen. Die Pellets wurden erneut für sieben Minuten 40.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dreimaliger Wiederholung wurden die Pelletes in 30 µl Lysispuffer (37 °C) aufgenommen. Anschließend wurde dem Lysat 3 µl Elektrophorese-Auftragspuffer zugegeben.

Glycerol-Harnstoff-Gelelektrophorese

Die eindimensionale Elektrophorese nach Persechini et al. (1986) erlaubt die Trennung von un-, mono- und diphosphorylierten MLK in einem Trennschritt. Dabei beruht die Auftrennung darauf, dass durch die Wahl geeigneter Bedingungen in einem Harnstoff-Glycerolgel die phosphorylierten Myosinleichtketten aufgrund ihrer höheren negativen Ladung schneller als die nicht phosphorylierten

Myosinleichtketten zur Anode wandern.

Die Gelkammern bestanden jeweils aus einer Glas- und einer Aluminiumplatte, die auf drei Seiten durch Spacer geschlossen wurde. Vor Gebrauch wurden die Elemente gründlich gereinigt und mit 70 % igem Ethanol entfettet. Zur Herstellung der Gele wurde eine Glycerol-Harnstoffgel-Lösung hergestellt, die anschließend 5 Minuten lang unter Rühren und Unterdruck entgast wurde. Zum Start der Polymerisation wurde der Lösung 7,1 µl TEMED und 200 µl 10 % (wt/vol) APS zugefügt. Durch das Einsetzen eines Profilformers im oberen Bereich der Kammern bildeten sich jeweils 8 Geltaschen.

Nach 60 Minuten waren die Gele auspolymerisiert und enthielten 10 % (wt/vol) Acrylamid sowie 0,4 % (wt/vol) Bisacrylamid. Der untere Spacer konnte nun entfernt werden und die Gelkammer wurde in die vertikale Elektrophoresekammer eingesetzt.

Glycerol-Harnstoffgel-Lösung:

Glycerol	20,7 ml
Acrylamidlösung	40 % (wt/vol), 11,25 ml
Bisacrylamidlösung	2 % (wt/vol), 9,5 ml
Harnstoffgel-Puffer	3,8 ml

Anodenlaufpuffer:

Harnstoffgel-Puffer	8,3 % (vol/vol)
Aqua bidest.	91,7 % (vol/vol)

Kathodenlaufpuffer:

Anodenlaufpuffer	450 ml
DTT	2,4 mM
Thioglykolat	2,3 mM

Vor jedem Versuch wurde der Kathodenlaufpuffer frisch angesetzt.

1 l Anodenpuffer wurde für 3 Gelkammern mit insgesamt 6 Gelen genutzt, wobei 450 ml davon für den Kathodenpuffer bestimmt waren.

Um die Gele mit DTT und Thioglykolat zu sättigen, wurde ein Elektrophoresevorlauf bei 400 Volt und 18 °C für eine Stunde durchgeführt. Die Temperatur der Gele wurde mit Hilfe einer Wasserkühlung konstant gehalten. Anschließend wurden die Proben

aufgetragen (20-40 µg Protein/ Geltasche) und für 70 Minuten bei 400V und 18 °C aufgetrennt.

Westernblot

Blotpuffer: (pH 8,3)

TRIS	25 mM
Glycin	150 mM
Methanol	10 % (vol/vol)

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine 70 Minuten lang im „semi-dry“-Blotverfahren (Kyhse-Andersen, 1984) auf eine PVDF-Membran übertragen (Stromstärke: 0,8 mA/cm² Membranfläche). Auf die Anode einer Westernblotkammer wurden luftblasenfrei übereinander drei in Blotpuffer getränkte Filterpapiere, eine PVDF-Membran und bis zu vier nebeneinander angeordnete Gele gelegt. Die oberste, sich direkt unter der Kathode befindliche Schicht, wurde wiederum von drei in Blotpuffer getränkten Filterpapieren gebildet. Die Membran wurde vor dem Transferaufbau 30 Minuten lang mit Methanol benetzt, in demineralisiertem Wasser gespült und für 2 Minuten in Blotpuffer überführt.

Nach Beendigung des Blottvorgangs wurde das Polyacrylamidgel entfernt, und die Membran 2 Minuten lang in Aqua bidest. geschwenkt, mit Methanol entwässert und luftgetrocknet. Die Aufbewahrung bis zur Membranentwicklung erfolgte bei 4 °C.

Blotentwicklung

Um den Phosphorylierungszustand der MLK darzustellen, wurden die auf die PVDF-Membran übertragenen Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen MLK versetzt. Dazu wurden folgende Lösungen benötigt:

TBS-Puffer: (pH 7,4)

TRIS/HCl	10 mM
NaCl	150 mM
Tween	0,01 % (vol/vol)

Blockierlösung:

BSA	3 % (wt/vol)
TBS	97 % (wt/vol)

Substratpuffer: (pH 9,5)

TRIS/HCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM
NaCl	10 mM

AP-Entwicklerlösung: (vor Licht schützen)

Substratpuffer	60 ml
NBT	30 mg
BCIP	15 mg

Die AP-Entwicklerlösung wurde vor jeder Verwendung frisch angesetzt.

Antikörperpuffer:

TBS-Puffer	45 ml
BSA, fettsäurefrei	3 % (wt/vol)
Triton X-100	0,1 % (vol/vol)

Waschlösung I:

TBS-Puffer	45 ml
Triton X-100	0,1 % (vol/vol)

Waschlösung II:

TBS-Puffer	45 ml
Triton X-100	0,5 % (vol/vol)

Die trockene PVDF-Membran wurde kurzzeitig mit Methanol benetzt und für 2 Minuten in demineralisiertem Wasser äquilibriert. Um die unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde sie 30 Minuten lang in Blockierlösung geschwenkt. Anschließend wurde die Membran für 3 Stunden in Gegenwart des ersten Anti-MLK-Antikörper (Verdünnung 1:1000 mit Antikörperpuffer), danach zweimal mit Waschlösung I für jeweils 5 Minuten gewaschen und

anschließend für 1,5 Stunden in Gegenwart des zweiten Antikörpers (Anti-Maus-IgM, AP-gekoppelt, Verdünnung 1:1000 mit Antikörperpuffer) inkubiert. Danach wurde die Membran erneut zweimal für 5 Minuten in Waschlösung II überführt und 15 Minuten in TRIS/HCl-Puffer (10 mM; pH 7,4) umgepuffert. Schließlich wurde die Membran für 5-15 Minuten mit AP-Entwicklerlösung im Dunklen inkubiert. Zum Schluß wurde die Nachweisreaktion durch Waschen mit demineralisiertem Wasser gestoppt und die Membran auf einem Filterpapier luftgetrocknet.

Auswertung

Die auf der Blotmembran angefärbten MLK-Banden wurden eingescannt und ihre Dichte densitometrisch ausgewertet. Auf der Grundlage der densitometrischen Messung wurde der prozentuale Anteil der Phosphorylierungsstufen bezogen auf die Gesamtintensität der MLK mittels der Auswertesoftware Image Quant[®] berechnet. Der Prozentanteil phosphorylierter MLK (% MLK-Phosphorylierung) an der Gesamt-MLK wird angegeben als:

$$\% \text{ MLK-Phosphorylierung} = \frac{2 \times \text{MLK}\sim\text{PP} + \text{MLK}\sim\text{P}}{\text{MLK} + \text{MLK}\sim\text{P} + \text{MLK}\sim\text{PP}} \times 100$$

Dabei steht MLK~P für die monophosphorylierte Form der MLK und MLK~PP für die diphosphorylierte Form. Da die diphosphorylierten MLK zwei Phosphatreste pro Molekül enthalten, ergibt sich ein maximaler Wert der MLK-Gesamtphosphorylierung von 200 %.

Der Phosphorylierungsgrad der MLK errechnet sich aus den relativen Intensitäten der Proteinbanden einer Auftragung. Daher ist diese Methode unabhängig vom Proteingehalt der Einzelprobe.

3.3 Bestimmung der endothelialen Makromolekülpermeabilität

Die Permeabilität wurde anhand des Flusses von Trypanblau-markiertem Albumin durch Endothelzellschichten in einem Zwei-Kompartimentsystem ermittelt. Zwischen den Kompartimenten befanden sich konfluente Endothelzellschichten. Dabei wurde das Erscheinen des markierten Albumins im abluminalen Kompartiment photometrisch bestimmt.

Versuchsaufbau

Die Endothelzellen wurden zunächst auf Polykarbonatmembranen kultiviert, die sich auf Filtereinsätzen befanden (Abb. 5). Die beiden Kompartimente wurden mit Basalmedium befüllt, wobei das Volumen des luminalen Kompartiments 2,5 ml und das des abluminalen Kompartiments 13 ml betrug. Dabei herrschte keine hydrostatische Druckdifferenz zwischen den Kompartimenten. In das luminale Kompartiment wurde zusätzlich Trypanblau-markiertes Albumin gegeben.

Basalmedium: (pH 7,4; 37 °C):

NaCl	150 mM
KCl	2,7 mM
CaCl ₂	1,0 mM
MgSO ₄	1,2 mM
HEPES	30 mM
NKS	5 % (vol/vol; 10 min hitzeinaktiviert bei 60 °C)

Trypanblau-markiertes Albumin: (60 µM):

BSA	30 µM
Trypanblau	30 µM

Das Trypanblau-markierte Albumin wurde über Nacht in Basalmedium inkubiert.

Im abluminalen Kompartiment befand sich ein Magnetrührer, der das Entstehen von Konzentrationsgradienten verhinderte. Ein Teil des Mediums im abluminalen

Kompartiment wurde mittels einer Rollerpumpe rezirkulierend durch eine Küvette eines Durchflußspektrophotometers gepumpt. So konnte das Erscheinen von Trypanblau-markiertem Albumin im abluminalen Kompartiment kontinuierlich gemessen werden. Zur Vermeidung von Messartefakten wurde ein Zwei-Wellenlängenmodus (Wellenlänge zur Messung von Trypanblau: 600 nm, versus Kontrollwellenlänge: 720 nm) des Photometers benutzt.

Die Trypanblau-Albumin-Konzentration im luminalen Kompartiment wurde alle 10 Minuten erfaßt, wobei sich während des Experiments keine signifikante Änderung zeigte.

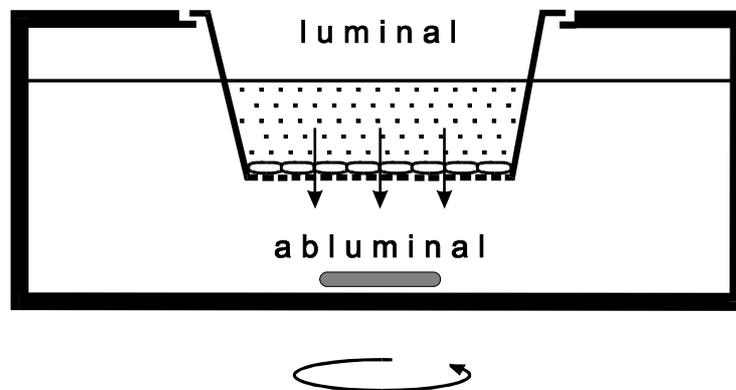


Abb. 5: Inkubationskammer

Endothelzellen wurden auf einer Filtermembran zu einer konfluenten Schicht kultiviert und teilen die Inkubationskammer in 2 Kompartimente.

Experimentelle Bedingungen

Zunächst wurde nach einer initialen Äquilibrationszeit von 20 Minuten die Albuminpermeabilität der Endothelzellen 20 Minuten lang bestimmt. Danach wurden die Agentien dem luminalen Kompartiment zugegeben, und die Albuminkonzentration im abluminalen Kompartiment 40 Minuten lang kontinuierlich bestimmt. Die Endkonzentration der Lösungsmittel der in DMSO- oder Ethanol-gelösten Agentien betrug maximal 0,1 % (vol/ vol). Bei dieser Konzentration war kein signifikanter Eigeneffekt auf die Endothelzellen zu erwarten. Zur Kontrolle wurden Endothelzellen in Gegenwart gleicher Lösungsmittelkonzentrationen inkubiert.

Auswertung

Der Albuminfluß (F; angegeben in mol x sec⁻¹ x cm⁻²) durch die Endothelschichten mit der Fläche (S) wurde ausgehend von dem Anstieg der Albuminkonzentration (d[A]₂) im Zeitintervall (dt) im abluminalen Kompartiment mit dem Volumen (V) wie folgt berechnet:

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

Der Permeabilitätskoeffizient (P; angegeben in cm x sec⁻¹) des kombinierten Systems aus Zellmonolayer und Filtermembran wurde wie folgt berechnet:

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

dabei beschreiben [A]₁ und [A]₂ die Albuminkonzentration im luminalen und abluminalen Kompartiment. Die treibende Kraft ([A]₁ - [A]₂) ändert sich während des Experiments nicht signifikant (Änderung von ([A]₁ - [A]₂) < 3 %), folglich entsprechen die relativen Änderungen des Albuminflusses (F) denen des Permeabilitätskoeffizienten (P).

3.4 Bestimmung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration

Die zytosolische Ca²⁺-Konzentration in aortalen Endothelzellen wurde mit Hilfe des Ca²⁺-Fluoreszenzindikators Fura-2 AM bestimmt. Fura-2 AM gelangt als Acetoxymethylester in die Zellen und wird dort von zellulären Esterasen gespalten. Als geladenes Molekül kann es nicht mehr die Zellmembran passieren. Die Fluoreszenz wurde mittels eines Video-Imaging-Systems aufgezeichnet.

Versuchsaufbau und experimentelle Bedingungen

Die konfluenten Endothelmonolayer wurden auf runden Deckgläsern für 50 min bei Raumtemperatur in Inkubationsmedium I inkubiert.

Inkubationsmedium I:

Medium 199/Earl's Salts	9,62 g/l
NKS	5 % (vol/vol; 10 min hitzeinaktiviert bei 60 °C)
Fura-2 AM	5 µM

Inkubationsmedium II:

Medium 199/Earl's Salts	9,62 g/l
NKS	5 % (vol/vol; 10 min hitzeinaktiviert bei 60 °C)

Anschließend erfolgte eine weitere 20-minütige Inkubation in dem Fura-2 AM-freien Medium II. Anschließend wurden die Deckgläschen mit den Fura-2-AM-beladenen Endothelzellen in eine gasdichten Perfusionskammer eingebaut, und die zu untersuchenden Agentien konnten vorsichtig per Bolus dazugegeben werden. Während des gesamten Versuchs wurden die Zellen mit HEPES-Medium perfundiert. Die Anregungswellenlänge von Fura-2 AM wechselte alle 6 Sekunden zwischen 340 und 380 nm (Bandbreite 2 nm), wobei das emittierte Licht bei 510 nm (Bandbreite 5 nm) gemessen wurde.

Auswertung

Die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration wurde nach der Methode von Li et al. (1987) bestimmt. Zur Bestimmung des Fluoreszenzmaximums (R_{\max}) wurden die Zellen in Gegenwart von 5 µM Ionomycin plus 3 mM Ca^{2+} inkubiert, und zur Bestimmung des Fluoreszenzminimums (R_{\min}) erfolgte die Inkubation in Gegenwart von 5 µM Ionomycin plus 5 mM EGTA in modifizierter Tyrode-Lösung.

Dabei wurde Ca_i wie folgt berechnet:

$$Ca_i = K_d \times \beta \times \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)}$$

K_d beschreibt die Dissoziationskonstanten von Fura-2 (Grynkiewicz et al., 1985) und β das Verhältnis des Anregungssignals bei 380 nm Ionomycin-behandelter Zellen in Gegenwart von 5 mM EGTA oder 3 mM Ca^{2+} .

3.5 Bestimmung der Translokation der Proteinphosphatasen 1 an Myosin

Um die Translokation der PP1-katalytischen Untereinheit an Myosin zu bestimmen, wurden Zellhomogenate aus Endothelzellen gewonnen und in eine Myosin-angereicherte Fraktion und eine Myosin-freie Fraktion geteilt (Verin et al., 1995). Anschließend wurde der PP1- und MLK-Gehalt mittels SDS-PAGE und Westernblot ermittelt.

Experimentelle Bedingungen

Als Zellmaterial dienten porcine Aortenendothelzellen, die in Schalen von 10 cm Durchmesser kultiviert waren. Zu Beginn des Experimentes wurde das Zellkulturmedium III (Kap. 3.1) abgesaugt und durch HEPES-Inkubationsmedium (Kap. 3.2) ersetzt. Die Zellen wurden dann durch Zusatz von DEA-NONOate unterschiedlich lang stimuliert.

Gewinnung der Myosin-angereicherten Zellfraktion

Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit HEPES-Medium gewaschen, und 200 μ l eiskalter Homogenisierungspuffer hinzugegeben. Umgehend wurden die Zellen auf -80 °C tiefgefroren.

Material und Methoden

Homogenisierungspuffer: (pH 7,5)

Tris/HCl	50 mM
EDTA	0,1 mM
Mercaptoethanol	28 mM
PMSF	0,2 mM
DTT	3,4 mM
Complete [®]	1 Tablette/10 ml

Kochsalzpuffer:

NaCl	0,6 M
Tween 20	0,1 % (vol/vol)
Complete [®]	1 Tablette/10 ml

Assaypuffer: (pH 7,5)

Tris/HCl	50 mM
EDTA	0,1 mM
Mercaptoethanol	28 mM
PMSF	0,5 mM
DTT	3,4 mM
Complete [®]	1 Tablette/10 ml

PMSF und DTT wurden erst kurz vor Gebrauch zugegeben.

Laemmli-Puffer: (pH 6,8)

Tris/HCl	0,5 M
Glycerol	25 % (vol/vol)
SDS	4 % (wt/vol)
Mercaptoethanol	1 % (vol/vol)
Bromphenolblau	0,1 % (wt/vol)

Anschließend wurden die Zellen von der Schale abgeschabt und mit Hilfe einer Insulinspritze (30 Gauge Nadel) homogenisiert. Dem Homogenat wurde der gleiche Volumenanteil Kochsalzpuffer hinzugesetzt. Es erfolgte zunächst eine 60-minütige Inkubation und dann eine 30- minütige Zentrifugation bei 4.500 x g und jeweils 4 °C. Der Überstand wurde mit Assaypuffer 10-fach verdünnt und 40 Minuten lang bei

8.200 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet, in dem sich die Myosin-angereicherte Fraktion befand und der Überstand, der die Myosin-arme Fraktion enthielt, wurden mit Laemmlipuffer versetzt. Nach 10-minütiger Denaturierung bei 65 °C konnten die Proben mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert werden.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde mittels eines diskontinuierlichen Verfahrens nach Laemmli, 1970, nach folgendem Prinzip durchgeführt:

Das anionische Detergens SDS bindet an Proteine. Daher wird deren Eigenladung überdeckt. Zusätzlich werden Disulfidbrücken durch Mercaptoethanol und DTT gelöst, so dass sich die denaturierten SDS-Protein-Komplexe nur noch in ihrer Größe voneinander unterscheiden. Die negativ geladenen Proteine werden daher bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld durch ein Polyacrylamidgel nach ihrem relativen Molekulargewicht aufgetrennt.

Trenngelpuffer: (pH 8,8)

Tris/HCl	1,5 M
----------	-------

Trenngel-Lösung: (12,5 %)

Acrylamid/Bisacrylamid	(30:0,8), 30 % (wt/vol), 17,5 ml
Trenngelpuffer	10,5 ml
Aqua bidest.	14 ml
SDS	10 % (wt/vol), 450 µl
TEMED	20 µl
APS	10 % (wt/vol), 200 µl

Sammelgelpuffer: (pH 6,8)

Tris/HCl	0,5 M
----------	-------

Sammelgel-Lösung: (6 %)

Acrylamid-/Bisacrylamid	(30:1); 30 % (wt/vol), 4 ml
Sammelgelpuffer	5 ml

Material und Methoden

Aqua bidest.	10,4 ml
SDS	10 % (wt/vol), 200 µl
TEMED	25 µl
APS	10 % (wt/vol), 250 µl

Laufpuffer:

Glycin	192 mM
Tris/HCl	24,8 mM
SDS	3,5 mM

Die Mengenangaben beziehen sich auf die Herstellung von 2 Gelen.

Die zum Aufbau der Gelkammer benötigten Materialien wurden gereinigt und mit 70 %igem Ethanol entfettet. Nun wurden 2 Glasplatten mittels 2 Seitenspacern so aufeinander gelegt, dass eine Kammer entstand, wobei die Glasplatten durch mehrere Klammern fixiert wurden. Ein Gummischlauch dichtete die Kammer entlang der Spacer zusätzlich ab. Die Trenngel-Lösung wurde bis auf 2/3 der Kammerhöhe gegossen und mit aqua bidest. überschichtet. 2 Stunden später war das Trenngel vollständig auspolymerisiert, und das Wasser wurde durch Sammelgel-Lösung ersetzt, in das ein Gelkamm zum Formen der Taschen eingesetzt wurde. Eine weitere Stunde später war auch das Sammelgel auspolymerisiert, so dass der Gelkamm und die Gummischläuche entfernt werden konnten. Die Elektrophoresekammer wurde nun in ein Gefäß gestellt, in dem zuvor Laufpuffer gefüllt wurde. In die obere Aussparung der Kammer wurde ebenfalls Laufpuffer gegeben. Nun wurde in jede Geltasche jeweils 30 µl einer Probe vorsichtig mit einer Hamiltonspritze injiziert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht bei 40 Volt. Der Gellauf wurde kurz nach dem Austritt des Bromphenol-Lauffrontmarkers gestoppt.

Westernblot

Nach Beendigung der SDS-PAGE wurden die im Gel aufgetrennten Proteine im „semidry“-Blotverfahren bei Raumtemperatur für eineinhalb Stunden mit einer

Stromstärke von 0,8 mA/cm² auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Blotaufbau und die Membranbehandlung erfolgten wie unter 3.2 beschrieben. Da das hier verwendete Gel größer war als das unter 3.2 genannte, konnte nur 1 Gel pro Blotkammer verwendet werden.

Immunologischer Nachweis der PP1-Phosphataseuntereinheiten und Myosinleichtketten

Nach erfolgtem Proteintransfer konnten die zu untersuchenden Proteine mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden.

TBS-Puffer: (pH 7,4)

Tris/HCl	10 mM
NaCl	150 mM
Tween	0,01 % (vol/vol)

Jeder Waschvorgang der Membranen mit TBS-Puffer erfolgte für 5 Minuten.

Blockierlösung:

TBS-Puffer	97 % (wt/vol)
BSA	3 % (wt/vol)

Die Membranen wurden zunächst 1 Stunde lang in 20 ml Blockierlösung bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die unspezifischen Bindungsstellen abgesättigt wurden. Anschließend erfolgte eine 3-stündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem Erstantikörper (Anti-PP1-Antikörper; Verdünnung 1:1000 mit 3 % (wt/vol) BSA in TBS-Puffer). Nach 4-maligem Waschen der Membranen wurden sie mit einem Horse raddish peroxidase (HRP)-gekoppelten Zweitantikörpern (Anti-Kaninchen-IgG; Verdünnung 1:2000 in 5 % (wt/vol) BSA) 1 Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte ein erneuter 4-maliger Waschvorgang. Nun wurden die Membranen kurz in ECL-Substratlösung geschwenkt, um die Banden der PP1 sichtbar zu machen. Mit Hilfe einer Digitalkamera konnte die entstandene

Chemielumineszenz aufgezeichnet werden und mittels des Softwareprogramms „Quantity One“ quantifiziert werden. Die Bestimmung der MLK mit spezifischen Antikörpern wurde im Kapitel 3.2 beschrieben.

3.6 Bestimmung der isometrischen Kraftentwicklung

Versuchsaufbau

Zur Bestimmung der isometrischen Kraftentwicklung der Endothelzellen wurde eine spezielle Kraftmessapparatur entwickelt, die es ermöglicht, die sehr geringen Kräfte einer Endothelzellschicht zu messen (Abb. 6).

Die Apparatur bestand im Wesentlichen aus einer Inkubationskammer und einem Kraftwandler mit einem Brückenverstärker. Das Signal des Brückenverstärkers wurde über einen Analog-Digitalwandler in einen Personal Computer eingelesen. Die Datenerfassung erfolgte im LabVIEW® (Data Aquisition Software, National Instruments Corporation, Version 2.2). Der Kraftwandler war mit einem Fixierstift über einen Mikromanipulator verbunden. Dazwischen befand sich eine mit Kulturmedium gefüllte Sylgard-Silikon-Form, in der das mit Endothelzellen kultivierte Kollagengel (17 x 22 x 4 mm) schwamm. In den beiden Querseiten des Kollagengels war jeweils ein Polyethylen-Halter (18 x 5 x 3 mm) einpolymerisiert. Dabei war der 1. Halter mit einem Fixierstift und der 2. Halter mit dem Kraftspannungswandler verbunden. So konnte ein isometrischer Zustand des Gels gewährleistet werden. Die Sylgard-Silikon-Form befand sich in einer Inkubationskammer, in der die Temperatur konstant bei 37 °C lag. Außerdem wurde sie kontinuierlich mit einem Wasserdampf-gesättigten Gasgemisch von 5 % CO₂ und 95 % O₂ durchströmt. Eine Schlauchpumpe ließ das Kulturmedium gleichmäßig rezirkulieren.

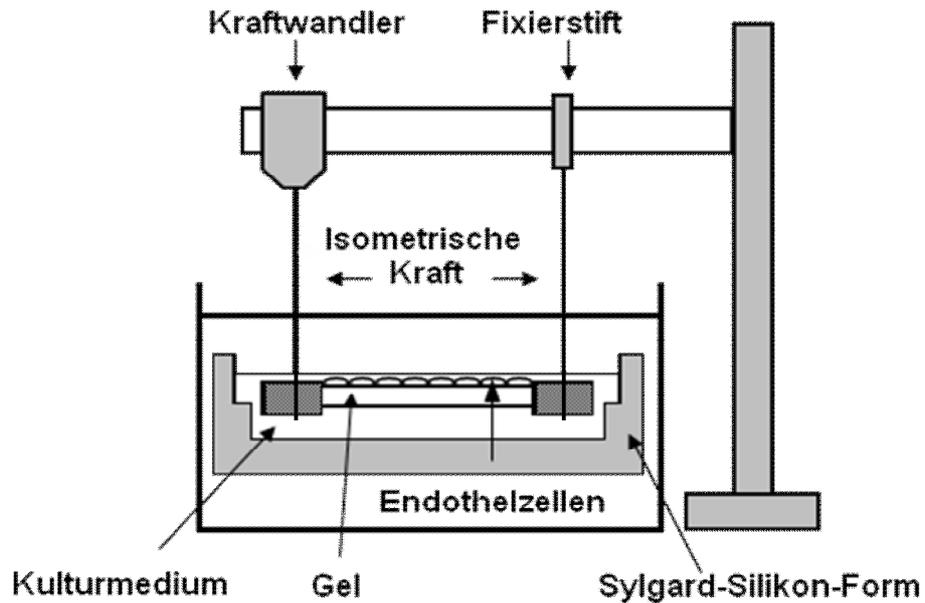


Abb. 6: Apparatur zu Bestimmung der isometrischen Kraftentwicklung kultivierter Endothelzellschichten

Herstellung der Kollagengele und Versuchsvorbereitung

Zunächst wurde eine kollagenhaltige Lösung angesetzt, die mit 1 N NaOH (200 μ l) neutralisiert wurde. Dabei erfolgte der Farbumschlag von hell-gelb zu schwach-rosa.

Kollagenhaltige Lösung:

TBS-Puffer	97 %
Rattenschwanzkollagen	4 ml
DMEM (10-fach konzentriert)	0,6 ml
FKS	0.6 ml

Um zu verhindern, dass die Gele frühzeitig auspolymerisierten, wurden die Substanzen bei 4 °C gelagert.

Nun wurden 580 μ l der neutralisierten Lösung zwischen die beiden Polyethylenhalter in die Sylgard-Silikon-Form pipettiert. Durch die hydrophobe Oberflächenbeschaffenheit der Form konnte eine Adhäsion des Gels an anderen Stellen außer an den Haltern verhindert werden. Die beiden Halter wurden in der Sylgard-Silikon-Form mit Hilfe von kleinen Keilen befestigt, damit das Gel bis zu dem

Beginn des Experiments in einem isometrischen Spannungszustand blieb. Nun wurde das Gel zur Auspolymerisierung 5 Minuten lang bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und die Endothelzellen konnten schließlich mit einer Dichte von 250.000 Zellen/cm² ausgesät werden. Nach 2 Tagen waren die Endothelzellen konfluent, so dass die Gele in die Inkubationskammer eingesetzt wurden. Vor Versuchsbeginn mussten noch die Keile an den Haltern gelöst werden, damit sich das Gel vom Boden der Form lösen konnte und auf der Mediumoberfläche schwamm. Es wurde nur noch zwischen dem Fixierstift und Kraftwandler gehalten. Nach einer Äquilibrierungsperiode von ca. 2 Stunden stellte sich eine stabile isometrische Kraft ein.

Um einen denkbaren Einfluss anderer Faktoren, wie z.B. die Kollagengele, auf die isometrische Kraftentwicklung der Endothelzellen auszuschliessen, wurde den Zellen 3 µM Cytochalasin D zugesetzt. Cytochalasin D zerstört das Aktin-Myosin-Zytoskelett der Endothelzellen, so dass keine weitere Spannungsentwicklung mehr messbar war. Auch wenn Gele eingesetzt wurden, auf denen sich keine kultivierten Endothelzellen befanden, konnte keine Kraftentwicklung gemessen werden. Die gemessene isometrische Kraft in den Experimenten wurde folglich allein von den eingesetzten Endothelzellen entwickelt.

Versuchsdurchführung und Auswertung

Die Reagentien wurden in entsprechender Konzentration über ein Ventil in den Kammerzulauf und somit in den Rezirkulationsstrom gegeben. Dabei wurde der zeitliche Verlauf der entstandenen Kraftänderung der Endothelzellen auf einem PC gespeichert. Die Kalkulation der isometrischen Kraftentwicklung wurde mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Windows Excel 2000 durchgeführt.

3.7 Statistik

Die Daten der Versuchsergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) von n verschiedenen Experimenten mit unterschiedlichen Zellpräparationen wiedergegeben. Die Daten wurden mit einem Statistikprogramm GraphPad PRISM[®] (GraphPad Software Incorporation La Jolla, Kalifornien, USA) statistisch analysiert. Statistische Vergleiche zwischen Gruppen wurden mittels „One-Way Analysis of Variance“ (ANOVA) in Verbindung mit dem Student-Newman-Keuls-Tests für die post-hoc Analysen durchgeführt. P-Werte von $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Wirkung von DEA-NONOate auf die MLK-Phosphorylierung und zytosolische Ca^{2+} -Konzentration

Unter den basalen Kulturbedingungen betrug der Phosphorylierungsgrad der MLK 52 ± 4 %. In Versuchen wurde zunächst die minimale effektive Konzentration des NO-Donators DEA-NONOate auf die MLK-Phosphorylierung bestimmt. Dazu wurden Endothelzellen für 20 Minuten in Gegenwart von DEA-NONOate-Konzentrationen zwischen 1 und 1000 μM inkubiert. Wie Abb. 7 zeigt, sinkt die Phosphorylierung der MLK konzentrationsabhängig. Bei Konzentrationen bis 20 μM nahm die MLK-Dephosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant ab.

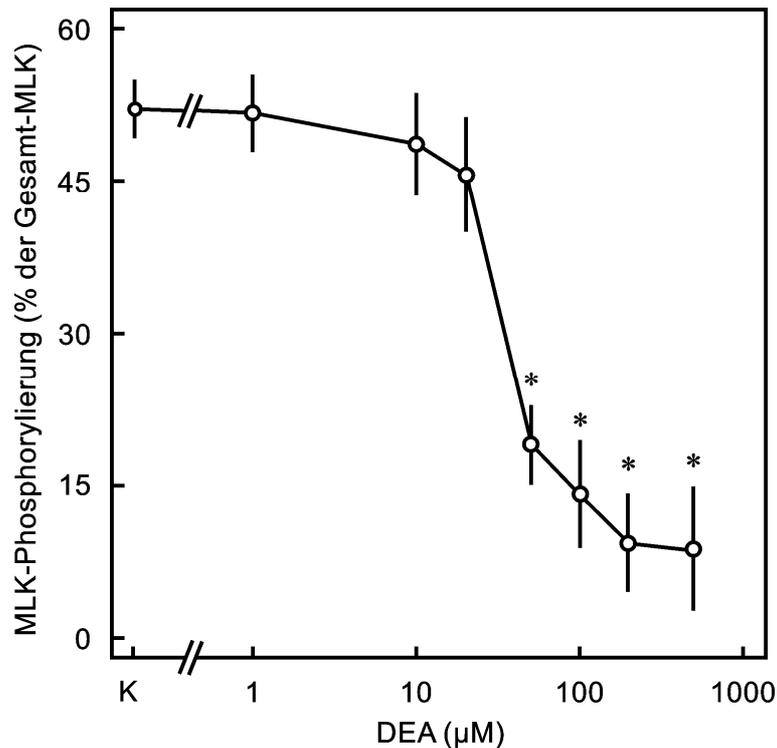


Abb. 7: Konzentrationsabhängige Wirkung des NO-Donors DEA-NONOate (DEA) auf die MLK-Phosphorylierung aortaler Endothelzellen des Schweins. Die Zellen wurden 20 Minuten in Gegenwart von DEA 1-500 μM inkubiert. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD von $n=5$ Experimenten unabhängiger Zellpräparationen. * $P < 0,05$ vs. Kontrolle (K).

Bei 50 μM DEA-NONOate wurde eine signifikante Dephosphorylierung der MLK auf 19 % der Gesamt-MLK erreicht. Die vierfache Steigerung der DEA-NONOate-Konzentration bewirkte lediglich eine weitere Abnahme der MLK-Phosphorylierung um 10 %. Um Nebenwirkungen durch eine zu starke Steigerung der NO-Freisetzung zu vermeiden (McQuaid und Keenan, 1997), wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen eine DEA-NONOate-Konzentration von 50 μM eingesetzt.

Nun wurde überprüft, ob die eingesetzte DEA-NONOate-Konzentration die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration (Ca_i) beeinflusst. Dabei wurde die Ca_i der Endothelzellen mit Hilfe eines Fluoreszenzindikators (Fura-2) 30 Minuten lang gemessen. Unter Kontrollbedingungen betrug die mittlere Ca_i 92 ± 28 nM über den gesamten Inkubationszeitraum. In Gegenwart von 50 μM DEA-NONOate betrug die mittlere Ca_i 78 ± 33 nM und war nicht signifikant verschieden von Ca_i der Kontrolle.

4.2 Wirkung von DEA-NONOate, YC-1, Sp-8-Br-PET-cGMPS und Rp-8-pCPT-cGMPS auf die Permeabilität

Unter Kontrollbedingungen betrug die Albuminpermeabilität von aortalen Endothelzellschichten 4×10^{-6} cm/s (Abb. 8) und blieb über die gesamte Versuchsdauer unverändert. Bei Zugabe des NO-Donators DEA-NONOate (50 μM) sank die Permeabilität bereits nach 10 Minuten um über 60 % ab und erreichte nach 40 Minuten einen Wert von $1,2 \times 10^{-6}$ cm/s. Wurden die Zellen in Gegenwart von 50 μM Rp-8-pCPT-cGMPS, einem zellpermeablen PKG-Hemmstoff inkubiert, so änderte sich die Permeabilität im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant. Bei gleichzeitiger Zugabe von Rp-8-pCPT-cGMPS und DEA-NONOate blieb die DEA-NONOate-induzierte Absenkung der Permeabilität aus.

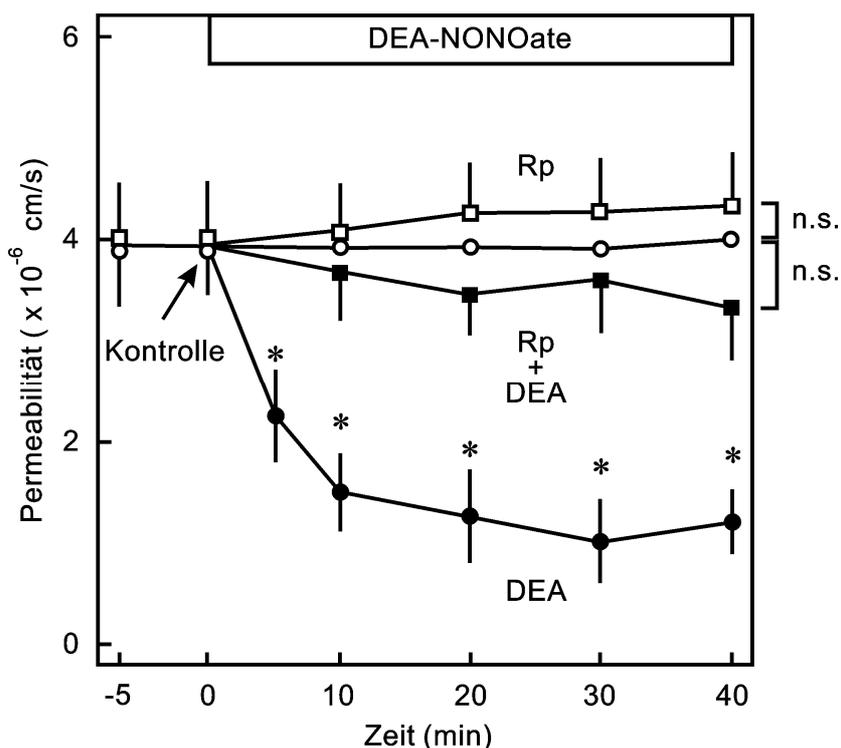


Abb. 8: Wirkung von DEA-NONOate (DEA), einem NO-Donator, und Rp-8-pCPT-cGMPS (Rp), einem Hemmstoff der PKG auf die Albuminpermeabilität aortaler Endothelzellen des Schweins. (○) Kontrolle, (●) 50 µM DEA, (□) 50 µM Rp, (■) 50 µM Rp plus 50 µM DEA. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD von n=5 Experimenten unabhängiger Zellpräparationen. *P < 0,05 vs. Kontrolle; n.s.: nicht signifikant verschieden zur Kontrolle.

Um den Einfluß von DEA-NONOate mit dem von YC-1, einem direkten Aktivator der Guanylylzyklase, und Sp-8-Br-PET-cGMPS, einem direkten Aktivator der PKG, auf die Albuminpermeabilität zu vergleichen, wurden die Endothelzellen mit den jeweiligen Substanzen für 20 Minuten inkubiert. Es zeigte sich, dass sowohl 50 µM YC-1 als auch 50 µM Sp-8-Br-PET-cGMPS einen mit DEA-NONOate vergleichbaren permeabilitätssenkenden Effekt auf die Endothelzellschicht ausüben (Abb. 9): YC-1 verringerte die Albuminpermeabilität um 64 %, Sp-8-Br-PET-cGMPS um 72 % und DEA-NONOate bewirkte eine 70 %ige Abnahme der Permeabilität.

Wie bereits in Abb. 8 gezeigt wurde, hatte der PKG-Hemmstoff Rp-8-pCPT-cGMPS alleine keinen wesentlichen Einfluß auf die Permeabilität. Die permeabilitätssenkende Wirkung von DEA-NONOate blieb jedoch aus, wenn DEA-NONOate und Rp-8-pCPT-cGMPS den Zellen gemeinsam zugegeben wurden. Auch

bei gleichzeitiger Gabe von YC-1 plus Rp-8-pCPT-cGMPS bzw. Sp-8-Br-PET-cGMPS plus Rp-8-pCPT-cGMPS änderte sich die endotheliale Albuminpermeabilität im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant.

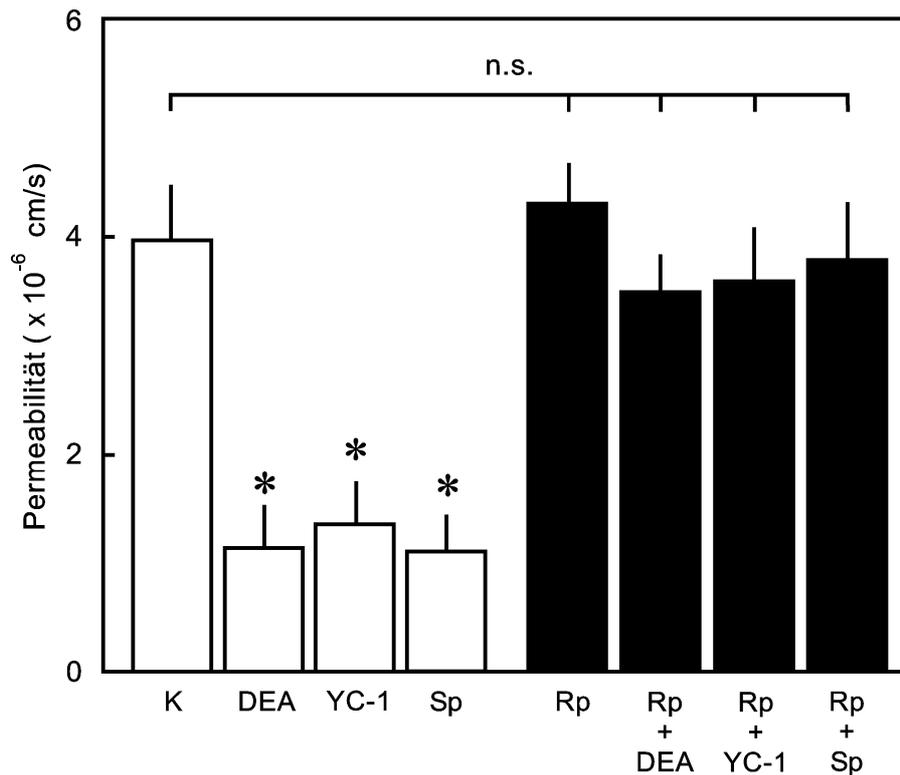


Abb. 9: Wirkung von DEA-NONOate (DEA, 50 μ M), einem NO-Donator, YC-1 (50 μ M), einem direkten Aktivator der Guanylylzyklase, Sp-8-Br-PET-cGMPS (Sp, 50 μ M), einem direkten Aktivator der PKG, Rp-8-pCPT-cGMPS (Rp 50 μ M), einem Inhibitor der PKG und Kombinationen der Substanzen auf die Albuminpermeabilität aortaler Endothelzellen des Schweins. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD nach 20 min von n = 5 Experimenten unabhängiger Zellpräparationen. *P < 0,05 vs. Kontrolle (K); n.s.: nicht signifikant verschieden zur Kontrolle.

4.3 Wirkung von DEA-NONOate, YC-1, Sp-8-Br-PET-cGMPS und Rp-8-pCPT-cGMPS auf die isometrische Kraftentwicklung

Um zu untersuchen, inwieweit DEA-NONOate und der PKG-Inhibitor Rp-8-pCPT-cGMPS die isometrische Kraftentwicklung der Endothelzellen beeinflussen, wurden die Endothelzellen 40 Minuten mit den jeweiligen Substanzen inkubiert, und die Kraftänderung bestimmt. Unter Kontrollbedingungen lag die isometrische Kraft der Endothelzellen bei 120 μ N (Abb. 10). Nach Zugabe von DEA-NONOate (50 μ M) sank sie innerhalb von 5 Minuten um nahezu 50 % und erreichte nach weiteren 35 Minuten einen Endwert von 24 μ N. Dies entspricht einer 80 %igen Abnahme der isometrischen Kraft.

Der PKG-Hemmstoff Rp-8-pCPT-cGMPS (50 μ M) hob jedoch die kraftsenkende Wirkung von DEA-NONOate vollständig auf. Rp-8-pCPT-cGMPS alleine bewirkte keine signifikante Kraftänderung der Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

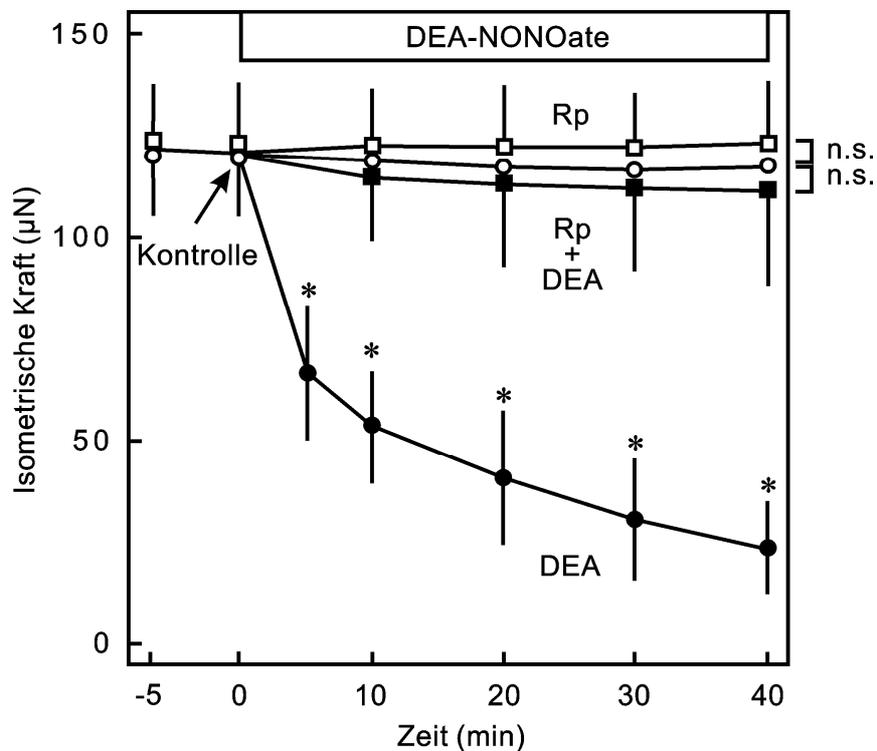


Abb. 10: Wirkung von DEA-NONOate (DEA), einem NO-Donator, und Rp-8-pCPT-cGMPS (Rp), einem Hemmstoff der PKG, auf die isometrische Kraftentwicklung aortaler Endothelzellen des Schweins. (○) Kontrolle, (●) 50 µM DEA; (□) 50 µM Rp; (■) 50 µM Rp plus 50 µM DEA. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD von $n = 5$ Experimenten unabhängiger Zellpräparationen. * $P < 0,05$ vs. Kontrolle; n.s.: nicht signifikant verschieden zur Kontrolle.

Ganz ähnliche Wirkungen auf die isometrische Kraftentwicklung aortaler Endothelzellen wurden beobachtet, wenn außerdem YC-1 oder Sp-8-Br-PET-cGMPS, sowie Kombinationen der Substanzen jeweils mit Rp-8-pCPT-cGMPS eingesetzt wurden (Abb. 11). Nach 20-minütiger Inkubation der Endothelzellen mit YC-1 (50 µM) sank die isometrische Kraftentwicklung der Zellen auf 51 µN, was einer 56 %igen Abnahme im Vergleich zum Kontrollwert (117 µN) entspricht. Bei Einsatz von Sp-8-Br-PET-cGMPS (50 µM), verringerte sie sich um 61 % auf 46 µN. Beide Werte sind vergleichbar mit der DEA-NONOate-induzierten Abnahme der isometrischen Kraft von 64 % auf 42 µN. Rp-8-pCPT-cGMPS hob die Wirkungen

aller Substanzen auf die isometrische Kraftentwicklung der Endothelzellen vollständig auf.

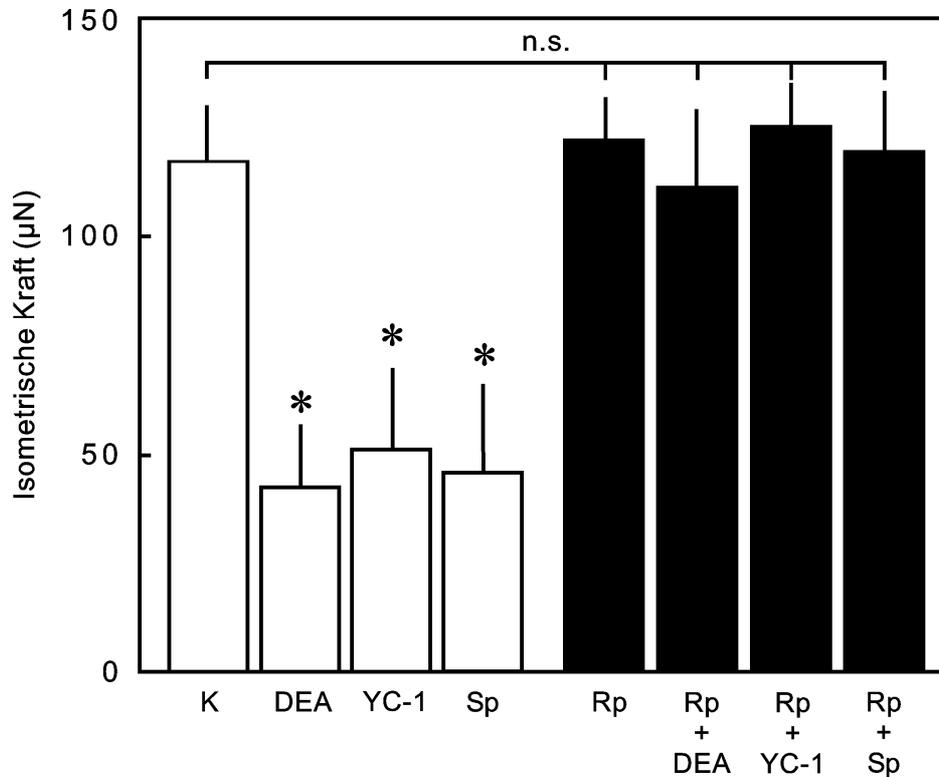


Abb. 11: Wirkung von DEA-NONOate (DEA, 50 µM), einem NO-Donator, YC-1 (50 µM), einem direkten Aktivator der Guanylylzyklase, Sp-8-Br-PET-cGMPS (Sp, 50 µM), einem direkten Aktivator der PKG, Rp-8-pCPT-cGMPS (Rp 50 µM), einem Inhibitor der PKG und Kombinationen der Substanzen auf die isometrische Kraftentwicklung aortaler Endothelzellen des Schweins. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD nach 20 min von n=5 Experimenten unabhängiger Zellpräparationen. *P < 0,05 vs. Kontrolle (K); n.s.: nicht signifikant verschieden zur Kontrolle.

4.4 Wirkung von DEA-NONOate, YC-1, Sp-8-Br-PET-cGMPS und Rp-8-pCPT-cGMPS auf die MLK-Phosphorylierung

Um die Wirkung von DEA-NONOate und Rp-8-pCPT-cGMPS auf die MLK-Phosphorylierung zu untersuchen, wurden die Endothelzellen 40 Minuten lang mit

Rp-8-pCPT-cGMPS (50 μ M) bzw. 40 Minuten lang mit DEA-NONOate (50 μ M) inkubiert (Abb. 12). Unter Kontrollbedingungen betrug die MLK-Phosphorylierung 55 ± 4 % und änderte sich über einen Zeitraum von 40 Minuten nicht. Auch die Zugabe von Rp-8-pCPT-cGMPS beeinflusste die MLK-Phosphorylierung nicht. DEA-NONOate hingegen senkte die MLK-Phosphorylierung bereits nach 5 Minuten um 42 %. Nach 40 Minuten betrug die MLK-Phosphorylierung nur noch 16 %. Rp-8-pCPT-cGMPS hob die DEA-NONOate-induzierte Reduktion der MLK-Phosphorylierung vollständig auf.

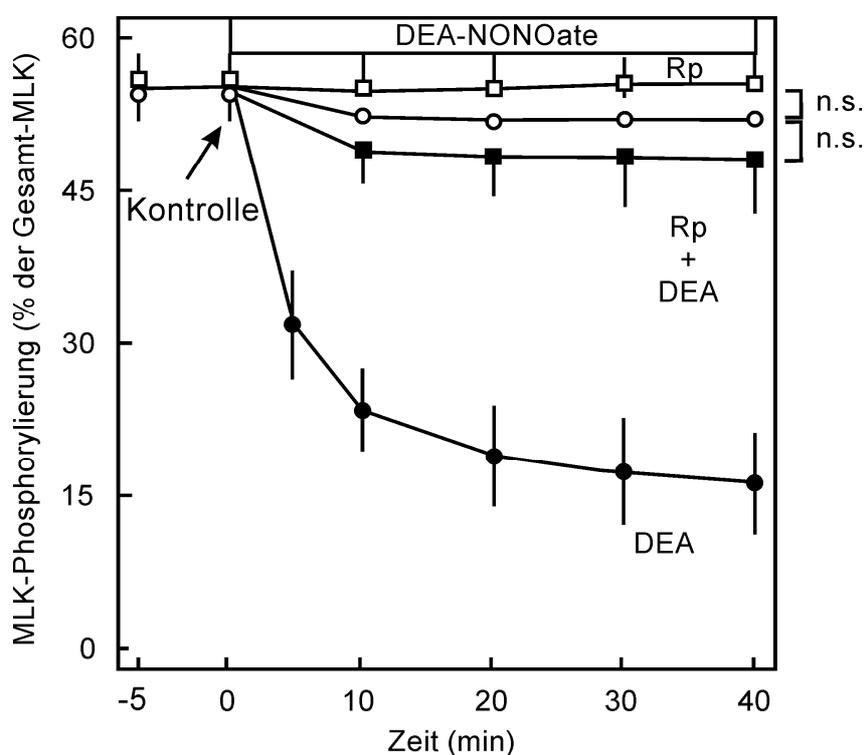


Abb. 12: Wirkung von DEA-NONOate (DEA), einem NO-Donator, und Rp-8-pCPT-cGMPS (Rp), einem Hemmstoff der PKG, auf die MLK-Phosphorylierung aortaler Endothelzellen des Schweins. (○) Kontrolle, (●) 50 μ M DEA, (□) 50 μ M Rp, (■) 50 μ M Rp plus 50 μ M DEA. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD von $n = 5$ Experimenten unabhängiger Zellpräparationen. * $P < 0,05$ vs. Kontrolle; n.s.: nicht signifikant verschieden zur Kontrolle.

In weiteren Experimenten wurden die Wirkung von DEA-NONOate, YC-1 und Sp-8-Br-PET-cGMPS auf die MLK-Phosphorylierung verglichen. Dazu wurden die Endothelzellen mit den jeweiligen Substanzen 20 Minuten inkubiert. DEA-NONOate

(50 μ M) senkte die MLK-Phosphorylierung um fast zwei Drittel von 55 auf 19 % (Abb. 13), YC-1 (50 μ M) auf 27 % und Sp-8-Br-PET-cGMPS (50 μ M) auf 24 %.

Rp-8-pCPT-cGMPS, welches keinen signifikanten Einfluss auf die basale MLK-Phosphorylierung hatte, hob die Effekte von DEA-NONOate, YC-1 bzw. Sp-8-Br-PET-cGMPS auf die MLK-Phosphorylierung auf.

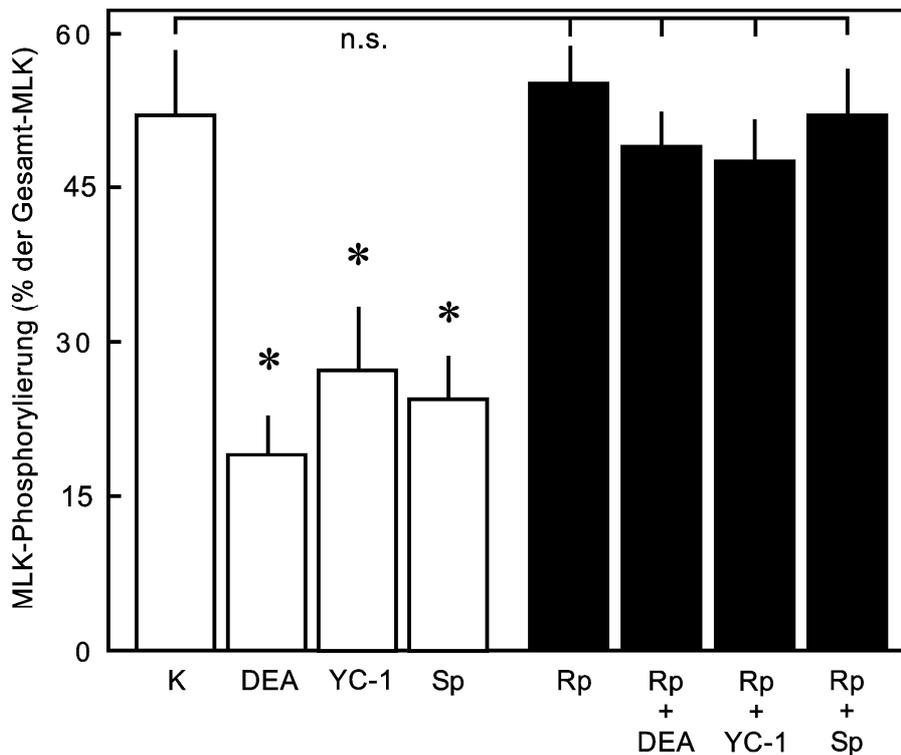


Abb. 13: Wirkung von DEA-NONOate (DEA, 50 μ M), einem NO-Donator, YC-1 (50 μ M), einem direkten Aktivator der Guanylylzyklase, Sp-8-Br-PET-cGMPS (Sp, 50 μ M), einem direkten Aktivator der PKG, Rp-8-pCPT-cGMPS (Rp, 50 μ M), einem Inhibitor der PKG und Kombinationen der Substanzen auf die MLK-Phosphorylierung aortaler Endothelzellen des Schweins. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD nach 20 min von n = 5 Experimenten unabhängiger Zellpräparationen. *P < 0,05 vs. Kontrolle (K); n.s.: nicht signifikant verschieden zur Kontrolle.

4.5 Wirkung von DEA-NONOate, ML-7 und Calyculin A auf die MLK-Phosphorylierung

Im nächsten Schritt wurde untersucht, welchen Effekt der MLK-Kinase-Hemmstoff ML-7 bzw. ML-7 plus DEA-NONOate auf den Phosphorylierungsgrad der MLK haben. Dazu wurde zunächst die Konzentration bestimmt, bei der die MLK-Kinase vollständig gehemmt wird. Dafür wurden die Endothelzellen für 5 Minuten mit ML-7 in Konzentrationen zwischen 1 und 100 μM inkubiert. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Dephosphorylierung der MLK. Dabei betrug die effektivste ML-7-Konzentration 50 μM , wobei die MLK-Phosphorylierung auf 21 % sank (Abb. 14A). In Gegenwart von ML-7 (50 μM) plus DEA-NONOate (50 μM) waren die MLK fast vollständig dephosphoryliert und die MLK-Dephosphorylierung betrug lediglich noch 3 %. Dies zeigt, dass DEA-NONOate die Wirkung des MLK-Kinase-Hemmstoffs verstärken kann.

Im folgenden Schritt wurde überprüft, welchen Effekt DEA-NONOate auf die endotheliale MLK-Phosphorylierung hat, bei gleichzeitiger Hemmung der MLK-Phosphatase durch Calyculin A. Dazu wurde zunächst die Calyculin A-Konzentration ermittelt, bei der die MLK-Phosphatase vollständig gehemmt wird. Die Inkubation mit Calyculin A in Konzentrationen zwischen 1 bis 100 nM führte innerhalb von 5 Minuten zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der MLK-Phosphorylierung von 55 auf bis zu 158 % (Abb. 14B). Diese annähernd maximale Wirkung wurde bei 50 nM Calyculin A erreicht. Daher wurde diese Konzentration in den weiteren Experimenten eingesetzt. Gleichzeitige Gabe von Calyculin A (50 nM) plus DEA-NONOate (50 μM) beeinflusste den Calyculin-induzierten Anstieg der MLK-Phosphorylierung nicht signifikant. Diese Experimente zeigen, dass die dephosphorylierende Wirkung von DEA-NONOate auf die MLK in Gegenwart von Calyculin A aufgehoben wird.

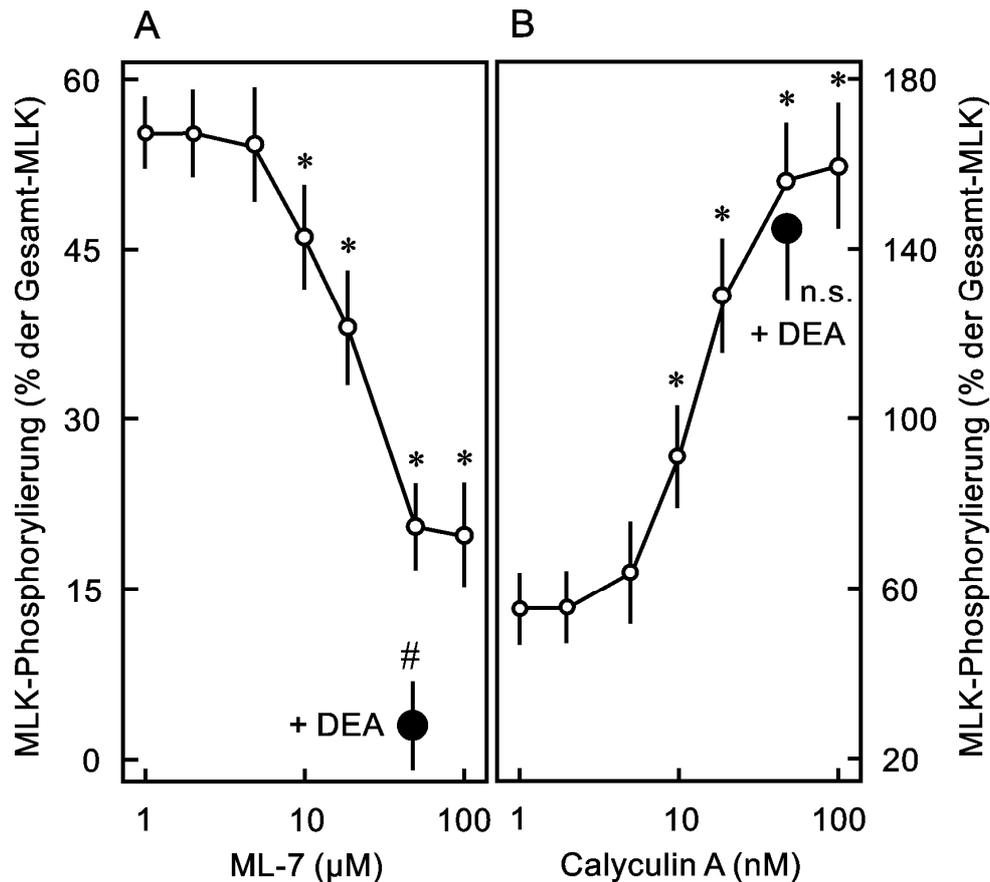


Abb. 14: Wirkung von DEA-NONOate (DEA), einem NO-Donator, ML-7, einem Hemmstoff der MLK-Kinase und Calyculin A, einem Hemmstoff der MLK-Phosphatase auf die MLK-Phosphorylierung aortaler Endothelzellen des Schweins.

(A) (○) 1-100 µM ML-7, (●) 50 µM ML-7 plus 50 µM DEA

(B) (○) 1-100 nM Calyculin A, (●) 50 nM Calyculin A plus 50 µM DEA

Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD nach 5 min von $n=5$ Experimenten unabhängiger Zellpräparationen. * $P < 0,05$ vs. 1 µM ML-7 (A) oder 1 nM Calyculin A (B); # $P < 0,05$ vs. 50 µM ML-7; n.s.: nicht signifikant verschieden zu 50 nM Calyculin A.

4.6 Wirkung von DEA-NONOate auf die Translokation der PP1 an Myosin

Hier wurde untersucht, ob DEA-NONOate die Translokation der katalytischen PP1-Untereinheit der MLK-Phosphatase an Myosin beeinflusst. Dazu wurden die Endothelzellen bis zu 20 Minuten in Gegenwart von DEA-NONOate inkubiert. Anschließend wurde die Myosin-angereicherte Zellfraktion aus den Endothelzell-

homogenaten gewonnen und die PP1 und MLK im Westernblot bestimmt. Im Bereich der PP1 sind Doppelbanden zu erkennen, da in Endothelzellen die Isoformen der PP1 Beta und vermutlich delta existieren.

Wie Abb. 15 zeigt, steigt nach Inkubation der Zellen mit DEA-NONOate der Gehalt an PP1 in der Myosin-angereicherten Zellfraktion an.

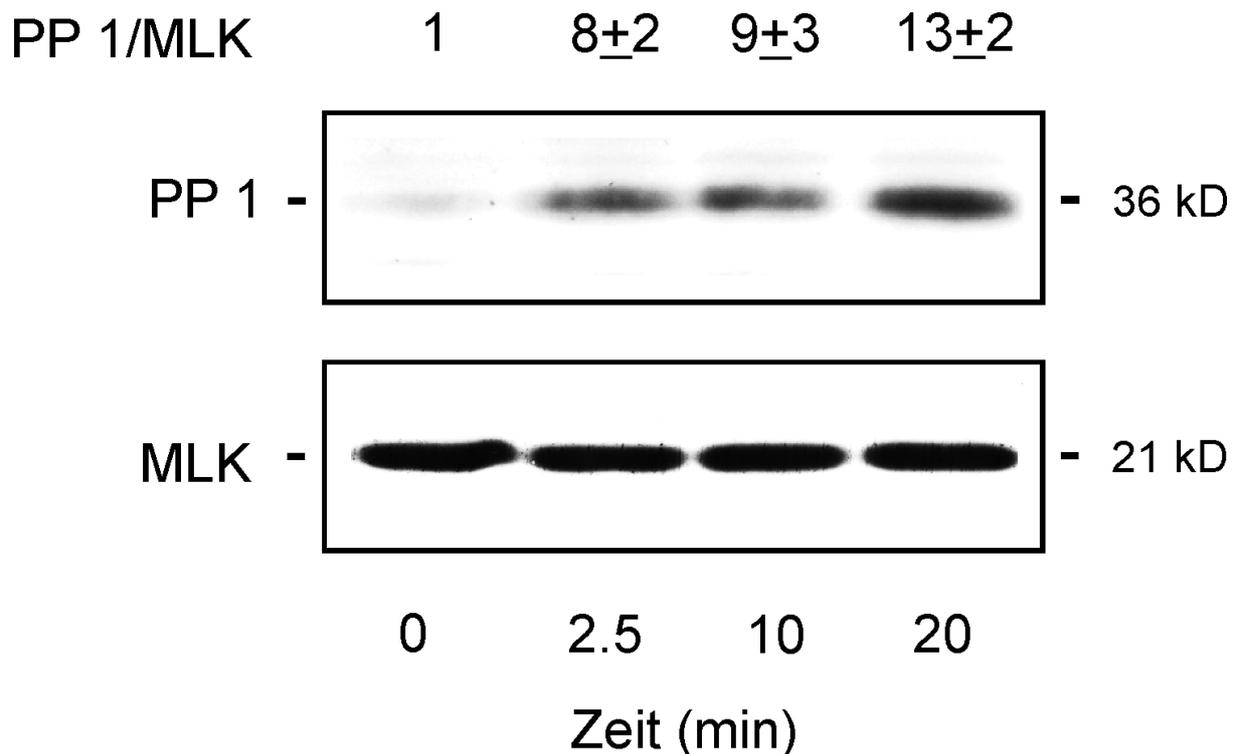


Abb. 15: Translokation der Proteinphosphatasen 1 (PP1) in die Myosin-angereicherte Zellfraktion nach 0-, 2,5-, 10- oder 20-minütiger Inkubation von Endothelzellen in Gegenwart von 50 μ M des NO-Donators DEA-NONOate. Repräsentativer Westernblot von 3 weiteren Experimenten mit unterschiedlichen Zellpräparationen. Angegeben ist das PP1/MLK-Verhältnis der Intensitäten der Banden. Das PP1: MLK-Verhältnis von nichtbehandelten Zellen (zum Zeitpunkt 0 Minute) wurde auf 1 gesetzt.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von NO/cGMP auf den kontraktile Apparat und auf die Albuminpermeabilität porciner, aortaler Endothelzellen untersucht. Die wesentlichen Ergebnisse sind:

1. NO/cGMP verursacht eine Reduzierung der endothelialen Albuminpermeabilität. Gleichzeitig wird die MLK-Phosphorylierung gesenkt, und die isometrische Kraftentwicklung der Endothelzellen nimmt ab.
2. Diese Prozesse beruhen auf einer NO-vermittelten Signaltransduktion, die cGMP- und PKG-abhängig ist.
3. Die NO/cGMP-vermittelte Dephosphorylierung der MLK und Hemmung des endothelialen kontraktile Apparates erfolgen durch Aktivierung der MLK-Phosphatase und nicht durch Hemmung der MLK-Kinase. In Übereinstimmung damit bewirkt NO/cGMP eine Rekrutierung der katalytischen Untereinheit der MLK-Phosphatase PP1 an Myosin, wobei die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration nicht beeinflusst wird.

NO/cGMP stabilisiert die Schrankenfunktion endothelialer Zellschichten. Dies konnte in einem etablierten Modell kultivierter Endothelzellen gezeigt werden, in denen die Zellen einem NO-Donator ausgesetzt wurden. Nach Zugabe von DEA-NONOate reagierten die Zellschichten spontan mit einer Abnahme der Albuminpermeabilität. Dieser Effekt konnte durch Rp-8-pCPT-cGMPS, einem Hemmstoff der PKG, verhindert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass NO/cGMP die Albuminpermeabilität über PKG-abhängige Mechanismen senkt. Exposition der Endothelzellen mit dem direkten pharmakologischen Aktivator der Guanylylzyklase, YC-1, oder einem direkten Aktivator der PKG, Sp-8-Br-PET-cGMPS, löste ebenfalls eine Abnahme der Albuminpermeabilität aus. Beide Wirkungen konnten wiederum durch Rp-8-pCPT-cGMPS verhindert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass NO über Aktivierung des Guanylylzyklase- und PKG-Weges die endotheliale Albuminpermeabilität senkt und damit die endotheliale Schranke stabilisiert.

NO/cGMP bewirkt ausserdem eine Abnahme der isometrischen Kraftentwicklung der Endothelzellen. Diese nahm nach Exposition der Endothelzellen mit DEA-NONOate zeitgleich zur Albuminpermeabilität ab. Der NO/cGMP-Effekt konnte durch den PKG-Hemmstoff Rp-8-pCPT-cGMPS aufgehoben werden. Eine ganz ähnliche

Wirkung auf die isometrische Kraftentwicklung hatte der direkte Aktivator der Guanylylzyklase, YC-1, und der PKG, Sp-8-Br-PET-cGMPS. Inkubation der Zellen mit den beiden Aktivatoren zeigte eine Abnahme der isometrischen endothelialen Kraft. Die Hemmung der PKG durch Rp-8-pCPT-cGMPS hob diese Wirkung wieder auf. Diese Experimente zeigen, dass NO über Aktivierung der Guanylylzyklase/PKG auch die isometrische Kraftentwicklung in Endothelzellen senkt.

In Übereinstimmung mit den Befunden senkt NO/cGMP den Grad der Aktivierung des endothelialen kontraktiven Apparates. Exposition der Endothelzellen mit DEA-NONOate bewirkte eine konzentrationsabhängige Abnahme der MLK-Phosphorylierung. Diese konnte durch PKG-Hemmung wieder aufgehoben werden. Auch die direkte Aktivierung der Guanylylzyklase oder der PKG löste eine Dephosphorylierung der MLK aus, die durch PKG-Hemmung verhindert werden konnte. Folglich hemmt NO den kontraktiven Apparat der Endothelzellen auf molekularer Ebene über Aktivierung eines Guanylylzyklase/PKG-Signalweges.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass NO über GC/PKG sowohl die Permeabilität als auch die isometrische Kraft bzw. MLK-Phosphorylierung in porcinen aortalen Endothelzellen senkt. Dies spricht für einen kausalen Zusammenhang zwischen der NO/cGMP-Wirkung auf die endotheliale Schrankenfunktion und der Aktivität des kontraktiven Apparates der Endothelzellen

Im Rahmen dieser Untersuchung stellte sich die Frage, welcher Mechanismus der NO/cGMP-induzierten Hemmung des endothelialen kontraktiven Apparates zu Grunde liegt. Der Aktivierungszustand des kontraktiven Apparates wird durch die Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit des Myosins bestimmt. Diese wird im Wesentlichen durch die Aktivität der MLK-Kinase und MLK-Phosphatase reguliert (Garcia et al., 1995, 1997; Härtel et al., 2007). In diesen Experimenten wurde gezeigt, dass NO/cGMP eine Netto-Dephosphorylierung der MLK bewirkt und dadurch den endothelialen kontraktiven Apparat hemmt. Es ist jedoch unklar, ob die NO/cGMP-abhängige Reduktion der MLK-Phosphorylierung Folge einer Aktivierung der MLK-Phosphatase oder einer Hemmung der MLK-Kinase ist. Um diese Frage zu beantworten, wurden 2 Arten von Versuchen durchgeführt. Zuerst sollten über Bestimmung der MLK-Phosphorylierung Rückschlüsse auf den Aktivierungsstatus der MLK-Kinase bzw. -Phosphatase gezogen werden. Dabei wurde das Prinzip der pharmakologischen Näherung angewendet, wobei ein Hemmstoff so hoch titriert wird, dass das betreffende Enzym vollständig gehemmt ist. Die Zellen wurden mit

ML-7, einem Inhibitor der MLK-Kinase, in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Dabei zeigte sich eine deutliche Dephosphorylierung der MLK, die bei einer Konzentration von 50 μM nicht weiter gesteigert werden konnte. Dies zeigt, dass unter diesen Bedingungen die MLK-Kinase vollständig gehemmt ist, und der Abfall der MLK-Phosphorylierung daher auf die basale Aktivität der MLK-Phosphatase zurückzuführen ist.

Unter den Bedingungen einer vollständigen Hemmung der MLK-Kinase wurde der Einfluß des NO-Donors DEA-NONOate auf die MLK-Phosphorylierung analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Zugabe von NO zu einer weiteren Senkung der MLK-Phosphorylierung führt. Dies lässt vermuten, dass die Steigerung der MLK-Dephosphorylierung auf einer NO/cGMP-vermittelten Aktivierung der MLK-Phosphatase beruht.

Zur weiteren Überprüfung wurden Experimente durchgeführt, in denen die MLK-Phosphatase gehemmt wurde. Inkubation der Endothelzellen mit steigenden Konzentrationen des Phosphatasehemmstoffs Calyculin A, bewirkten eine deutliche Erhöhung der MLK-Phosphorylierung. Da diese bei einer Calyculin A-Konzentrationen über 50 nM nicht mehr gesteigert werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass bei dieser Konzentration die MLK-Phosphatase vollständig gehemmt ist. Folglich ist der Anstieg der MLK-Phosphorylierung auf die endogene Aktivität der MLK-Kinase zurückzuführen. Unter diesen Bedingungen bewirkte die Zugabe von NO/cGMP keine Änderung der MLK-Phosphorylierung. Eine Hemmung der MLK-Kinase durch NO/cGMP wird aufgrund dieser Daten ausgeschlossen. Zusammenfassend wurde in diesen Experimenten gezeigt, dass die NO/cGMP-abhängige Dephosphorylierung der MLK in porcinen Endothelzellen allein auf einer Aktivierung der MLK-Phosphatase beruht und nicht auf einer Hemmung der MLK-Kinase.

Entscheidend für die Aktivierung der MLK-Phosphatase ist die Translokation der katalytischen Untereinheit über MYPT1 an Myosin (Härtel et al., 2007; Verin et al., 2000a). Ob eine derartige Assemblierung durch NO/cGMP in Endothelzellen ausgelöst wird, wurde in einem biochemischen Versuchsansatz überprüft, in dem die Anreicherung der katalytischen Untereinheit in der Myosin-angereicherten Zellfraktion bestimmt wurde. In diesen Experimenten liess sich unter NO/cGMP-Einfluss eine Zunahme der PP1-katalytischen Untereinheit in der Myosin-angereicherten Fraktion, bei einer gleichzeitigen Abnahme in der Myosin-armen Fraktion nachweisen. Diese

Ergebnisse unterstützen das Konzept, dass NO/cGMP eine Assemblierung des Phosphatase-Holoenzym-Komplexes an Myosin induziert, und somit die Dephosphorylierung der MLK steigert.

Bei der permeabilitätssenkenden Wirkung von NO/cGMP wird dessen Einfluss auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration kontrovers diskutiert (s.u., Draijer et al., 1995a, 1995b). Um diesen Einfluss zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration mittels eines Fluoreszenz-Indikators bestimmt. Dabei zeigte sich, dass der NO-Donor DEA-NONOate die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration nicht signifikant senkt. Diese Experimente schliessen damit aus, dass NO/cGMP die Ca^{2+} -abhängige MLK-Kinase über Senkung des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels hemmt. Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit den oben genannten Ergebnissen, die zeigen, dass NO/cGMP über Aktivierung der Ca^{2+} -unabhängigen MLK-Phosphatase den kontraktilen Apparat hemmt und somit die Permeabilität senkt.

Die Tatsache, dass Manöver, welche die zelluläre cGMP-Konzentration in Endothelzellen steigern, auch deren Schrankenfunktion verbessern, ist seit längerem bekannt. Dies wurde in Experimenten an verschiedenen Endothelzellarten wie Aorten- oder Umbilikalendothelzellen beschrieben (Baron et al., 1989; Draijer et al., 1995a; Hempel et al., 1996; Ramirez et al., 1996; Westendorp et al., 1994; Yamada et al., 1990). Der zugrunde liegende Mechanismus wird jedoch bis heute nicht verstanden. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die NO/cGMP-abhängige Stabilisierung der endothelialen Schrankenfunktion auf einer Aktivierung der MLK-Phosphatase beruht. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal der funktionelle Zusammenhang bezüglich des NO/cGMP-Signaltransduktionsweges und der isometrischen Kraftentwicklung der Endothelzellen beschrieben: Es wurde gezeigt, dass die NO/cGMP-abhängige Aktivierung des GC/PKG-Weges die isometrische Kraftentwicklung der Endothelzellen hemmt. Diese Hemmung beruht auf einer Rekrutierung der PP1 an Myosin. Gündüz et al. (2003) beschrieben bereits einen Zusammenhang zwischen Aktivierung der endothelialen MLK-Phosphatase und Senkung der isometrischen Kraftentwicklung, jedoch wurden mit Thrombin vorstimmulierte HUVEC verwendet, und die Dephosphorylierung der MLK wurde durch ATP induziert. Auch Härtel et al. (2007) fanden in HUVEC, dass extrazelluläres ATP die MLK-Phosphatase aktivieren könne und die MLK dephosphoryliere. Diese MLK-Dephosphorylierung ging einher

mit einer Inaktivierung des kontraktiven Apparates und Senkung der Albuminpermeabilität. Ähnliche Prozesse wurden in aortalen Endothelzellen cAMP/PKA-abhängig vermutet (Bindewald et al., 2004). Eine NO/cGMP-abhängige Senkung der isometrischen Kraftentwicklung in Endothelzellen, und Aktivierung der endothelialen MLK-Phosphatase wurde bislang jedoch nicht beschrieben.

Nur in glatten Muskelzellen wurde bereits erwähnt, dass NO/cGMP die MLK-Phosphatase aktiviere, und so die MLK dephosphoryliert würden (Surks et al., 1999). Dabei erfolge eine PKG-abhängige Aktivierung der MLK-Phosphatasen (Hartshorne, 1998; Somlyo et al., 1999; Arner und Pfitzer, 1999). Dabei gibt es aber auch Hinweise auf zellrelaxierende Wirkung aufgrund Hemmung der MLK-Kinase, die sich jedoch auf andere Signaltransduktionswege beziehen, die über PKA-, PKC- oder MAP-Kinase vermittelt werden (Arner und Pfitzer, 1999).

Die barrierestabilisierende NO/cGMP-Wirkung, wie sie hier anhand der kultivierten aortalen Endothelzellen beschrieben wurde, stimmt mit der Mehrzahl an beschriebenen Experimenten überein, bei denen auch endotheliale Zellkulturen verwendet wurden. Dabei zeigen sich z.B. bei Endothelzellen, die aus der Nabelschnur von Mensch und Rind oder Schweineaorta stammten (Baron et al., 1989; Draijer et al., 1995a; Yamada et al., 1990; Westendorp et al., 1994), oder bei pulmonalen Mikro- und Makrovaskularzellen, dass NO/cGMP einen schrankenstabilisierenden Effekt ausübt (Irwin et al., 2005; Klinger et al., 2006; Scott et al., 2010).

Dieser schrankenstabilisierende NO/cGMP-Effekt ist aber nicht unter allen Versuchsbedingungen und in allen Gefäßprovinzen gleich: Versuche an isoliert-perfundierten Mikrogefäßen zeigen, dass NO/cGMP-abhängig die Albuminpermeabilität steigt (Bates, 1998; He et al., 1998; Meyer und Huxley, 1992; Mayhan, 1994; Ramirez et al., 1996; Wu et al., 1996; Yuan et al., 1993).

In Experimenten mit isolierten Organen ist die NO/cGMP-Wirkung auf die endotheliale Permeabilität organspezifisch: Versuche mit perfundierten Präparationen der Haut zeigen NO/cGMP-vermittelt eine Erhöhung der Permeabilität (Sarker und Fraser, 2002), wohingegen in Versuchen mit isolierten Lungen ANP/cGMP-abhängig die endotheliale Barriere stabilisiert wird (Egemnazarov et al. 2009; Schmidt et al., 2008; Yin et al., 2008).

Auch die systemische Wirkung von cGMP ist gegensätzlich: In der Haut und in der quergestreiften Muskulatur zeigt sich eine Permeabilitätserhöhung unter ANP/cGMP-

Einfluss (Chen et al., 2012; Curry et al., 2010; Schreier et al., 2008), und in der Lunge wird die Permeabilität NO/cGMP-abhängig herabgesetzt (Bloomfield et al., 1997; Dodd-o et al., 2008; Garat et al., 1997; Xing et al., 2011).

Diese gegensätzliche Wirkung von NO/cGMP im Hinblick auf die endotheliale Permeabilität kann durch regionale Eigenheiten der Zellen erklärt werden. In diesem Zusammenhang scheinen besonders die unterschiedliche Expression von Isoformen der PKG und der Phosphodiesterasen (PDE) in den Gefäßprovinzen von Bedeutung zu sein. Genauso spielen Unterschiede in den experimentellen Bedingungen eine Rolle (Yuan, 2003).

Auch hinsichtlich der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration unter NO/cGMP-Einfluss gibt es regional unterschiedliche Effekte. Draijer et al. (1995a,1995b) z.B. beobachteten entgegengesetzte NO/cGMP-Effekte auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in humanen Aortenendothelzellen und HUVEC, die jeweils mit Thrombin vorstimuliert wurden. In HUVEC änderte sich die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration unter NO/cGMP-Einfluss nicht. Diese Befunde stimmen mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit überein, wobei die Autoren jedoch eine NO/cGMP-abhängige PDE III-Aktivierung vermuten. In humanen Aortazellen hingegen zeigte Draijer, dass eine Aktivierung der endothelialen Guanylylzyklase den Thrombin-induzierten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration senkte. Diese Ergebnisse wurden so gedeutet, dass cGMP über eine Senkung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration die Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität antagonisiere. Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass Draijer et al. mit Thrombin-vorstimulierten Zellen arbeiteten. Daher erfolgte die Messung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration unter anderen Bedingungen als in der vorliegenden Arbeit, in der die Zellen erst durch die Zugabe von NO-Donatoren stimuliert wurden.

Es ist seit langem bekannt, dass Endothelzellen schubspannungsabhängig NO/cGMP freisetzen, und so über parakrine Mechanismen an der Regulation der Gefäßweite beteiligt sind. Dabei spielt NO/cGMP auch eine Funktion bei der Regulation der endothelialen Schrankenfunktion. NO/cGMP wäre damit nicht nur parakriner Mediator der Glattmuskelzellen, sondern auch ein autokriner Mediator für die Intimafunktion. Darüber hinaus könnte unter pathophysiologischen Bedingungen eine NO/cGMP-Freisetzung die endotheliale Schranke stabilisieren, um einer gesteigerten Permeabilität, die zu schädlichen Ödemen führt, entgegenzuwirken. Wird z.B. im Rahmen eines Entzündungsgeschehens die endotheliale Permeabilität

durch das Einwirken von Entzündungsmediatoren erhöht, könnte NO/cGMP über Aktivierung der MLK-Phosphatase dazu beitragen, dass die endotheliale Schrankenfunktion wieder hergestellt würde. Daher wäre es auch denkbar, dass eine therapeutische Nutzung von NO/cGMP u.a. eine schrankenstabilisierende Wirkung hat: z.B. wird NO-Inhalation zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie eingesetzt, oder synthetische ANPs bei der Behandlung von Lungenödemen (McKie et al., 2010; Sakamoto et al., 2010).

Auch durch die Verwendung von PDE-Hemmstoffen wird der zelluläre cGMP-Spiegel erhöht. Dabei wird z.B. der PDE V-Hemmstoff Sildenafil bei der Prävention von neonataler hypoxischer Lungenentzündung und pulmonaler Hypertonie eingesetzt (de Visser et al., 2009). Dem NO/cGMP scheint in diesem Zusammenhang eine Schutzfunktion der endothelialen Schranke zuzukommen.

Auch bei Reperfusionsschäden nach Ischämie im Rahmen eines Herzinfarktes oder einer Lungenembolie könnte NO/cGMP einen positiven Effekt auf die endotheliale Schranke haben. Gleiches könnte für arteriosklerotische Veränderungen und Remodelling der Gefäße gelten.

Dies sind nur wenige Beispiele für den denkbar breiten therapeutischen Einsatz von NO/cGMP, dabei sollte jedoch bedacht werden, dass auch Studien durchgeführt wurden, die einen permeabilitätssteigernden Effekt von NO/cGMP zeigen (Chen et al., 2012; Curry et al., 2010; He et al., 1998; Schreier et al., 2008; Yuan et al., 1993). Abhilfe könnte hier die lokale organbezogene Applikation von NO/cGMP bieten.

Der NO/cGMP-PKG-Weg ist einer der wenigen bekannten Mechanismen überhaupt, die eine Aktivierung der MLK-Phosphatase hervorrufen können und so die endotheliale Schranke stabilisieren. Weitere Analysen dieser Mechanismen wären auf Grund der endothelabdichtenden Wirkung von Interesse. Hier könnten, basierend auf Phosphatase-vermittelter Stabilisierung des Endothels, neue therapeutische Strategien entwickelt werden, welche auf die Prophylaxe oder Minderung der Folgen einer erhöhten endothelialen Durchlässigkeit abzielen.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig in Endothelzellen gezeigt, dass 1. NO/cGMP via sGC/PKG den kontraktilen Apparat hemmt und die isometrische Kraft der Endothelzellen reduziert, wobei dieser Prozess Ca^{2+} -unabhängig ist. 2. Es wurde beschrieben, dass sowohl die Hemmung des kontraktilen Apparates als auch die Reduktion der isometrischen Kraft mit einer Verminderung der Makromolekülpermeabilität der Zellschichten einhergehen. Als 3. Punkt wurde

gezeigt, dass die Hemmung des kontraktiles Apparates auf einer Aktivierung der MLK-Phosphatase und nicht auf einer Hemmung der MLK-Kinase beruht. Dabei wird in Endothelzellen cGMP/PKG-vermittelt die katalytische Untereinheit der PP1 aus der zytosolischen Fraktion an das Myosin-reiche Zytoskelett transloziert. Über den NO/cGMP-abhängigen PKG- Weg kann also die MLK-Phosphatase in Endothelzellen aktiviert werden, was zu Stabilisierung der endothelialen Schrankenfunktion führt. Zusammengenommen unterstützen die Ergebnisse folgendes Konzept der NO/cGMP-Wirkung auf die endotheliale Schrankenfunktion:

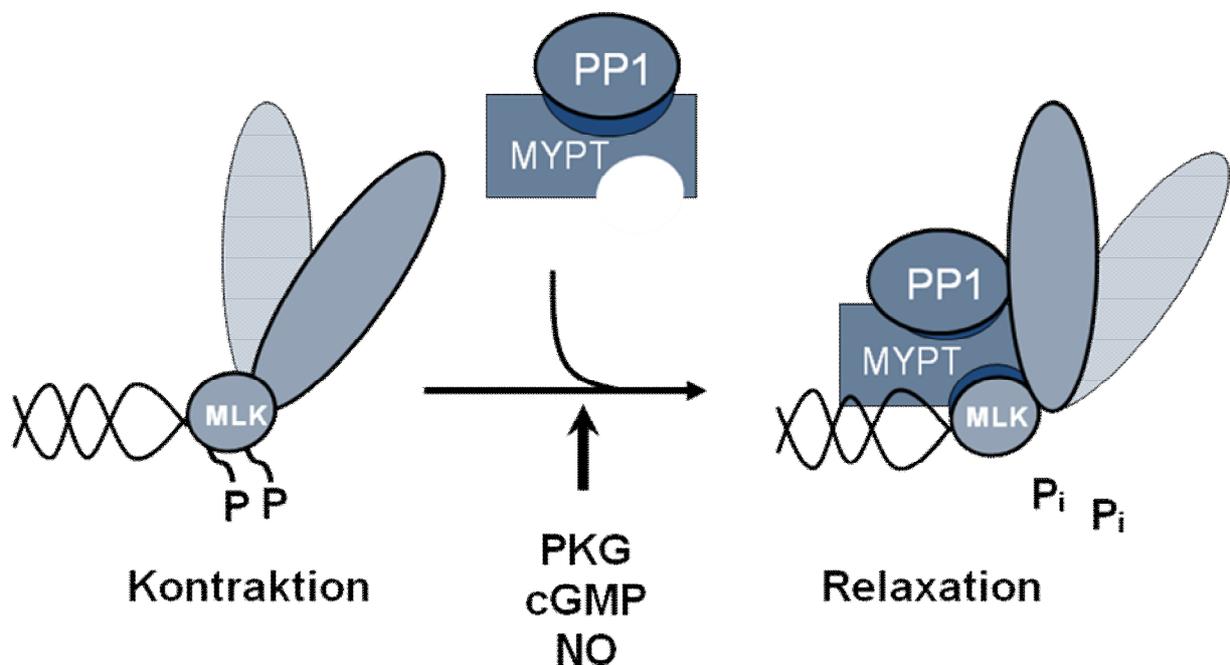


Abb. 16: Schematische Darstellung der Stabilisierung der endothelialen Schrankenfunktion unter NO/cGMP-Einfluss: Aktivierung der PP1 führt zu Dephosphorylierung der MLK, Abnahme der isometrischen zellulären Kraft und zu Abdichtung des Endothels.

6 Zusammenfassung

Der kontraktile Apparat spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation der endothelialen Schrankenfunktion. Die Aktivierung des kontraktiven Apparates wird dabei durch den Phosphorylierungsgrad der kleinen regulatorischen Untereinheiten des Myosins bestimmt. Dieser wiederum unterliegt der Kontrolle zweier Enzyme des kontraktiven Apparates: Myosinleichtkettenphosphatase (MLKPase) und MLK-Kinase (MLKK). Manöver, die die Konzentration des intrazellulären Botenstoffes NO/cGMP steigern, stabilisieren die endotheliale Schrankenfunktion. Der Mechanismus dieser schrankenprotektiven Wirkung wird bisher nur teilweise verstanden. In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob NO/cGMP den kontraktiven Apparat der Endothelzellen beeinflusst und damit die Schranke stabilisiert. Im Zentrum stand dabei die Regulation der MLK-Kinase und MLK-Phosphatase.

Die Experimente wurden an kultivierten porcinen Aortenendothelzellen durchgeführt. Dabei wurde der Phosphorylierungsgrad der MLK unter Einfluss verschiedener enzymatischer Aktivatoren bzw. Inhibitoren bestimmt. Des Weiteren wurden die Permeabilität und die kontraktile Aktivierung der Endothelzellschichten über deren Albumindurchlässigkeit sowie isometrische Kraftentwicklung gemessen. Zusätzlich wurde die Translokation der katalytischen Untereinheit, PP1, an Myosin dargestellt, und die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration mittels eines fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikators bestimmt.

Die Zugabe des NO-Donors DEA-NONOate (50 μM) verursachte sowohl eine starke Abnahme der MLK-Phosphorylierung, als auch eine deutliche Abnahme der isometrischen Kraft und Permeabilität der Endothelzellen. In Gegenwart des PKG-Inhibitors RP-8-pCPT-cGMPS (50 μM) wurden sämtliche NO/cGMP-Effekte auf die untersuchten Parameter wieder aufgehoben. YC-1 (20 μM), ein Aktivator der löslichen Guanylylzyklase sowie Sp-8-Br-PET-cGMPS (50 μM), ein direkter Aktivator der PKG, zeigten analoge Wirkungen wie DEA-NONOate, die unter Einfluss von RP-8-pCPT-cGMPS (50 μM) ebenfalls wieder aufgehoben wurden. Bei vollständiger pharmakologischer Hemmung der MLK-Kinase durch ML-7 (50 μM) verstärkte NO/cGMP die Wirkung von ML-7 auf die MLK-Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu wurde durch vollständige pharmakologische Hemmung der MLK-Phosphatase durch Calyculin A (10 nM) die dephosphorylierende Wirkung von NO/cGMP aufgehoben. Dies spricht dafür, dass NO/cGMP über Aktivierung der MLK-Phosphatase und nicht

über Hemmung der MLK-Kinase die MLK-Phosphorylierung reduziert. In Übereinstimmung damit konnte gezeigt werden, dass DEA-NONOate eine Translokation der PP1-Untereinheit an Myosin induziert. Die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration änderte sich unter NO/cGMP-Einfluss nicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass NO/cGMP in aortalen Endothelzellen die MLK-Phosphatase aktiviert. Die Aktivierung erfolgt über einen NO/cGMP/PKG-abhängigen Mechanismus und bewirkt eine Translokation der PP1 an Myosin. Die resultierende Dephosphorylierung der MLK führt zu einer Hemmung des endothelialen kontraktiven Apparates und schließlich zu einer Abnahme sowohl der isometrischen Kraftentwicklung als auch der Permeabilität des Endothels. Dieser Prozess ist Ca^{2+} -unabhängig.

7 Summary

The contractile machinery plays an important role in the regulation of the endothelial barrier function. The activation state of the contractile machinery is determined by the phosphorylation of the small regulatory subunit of myosin. This level, in turn, is controlled by two enzymes of the contractile apparatus: myosin light chain (MLC) phosphatase and MLC kinase. Manoeuvres that increase the concentration of the intracellular messenger NO/cGMP are able to stabilize the endothelial barrier function. The mechanism of this barrier protective effect is only partially understood. In this study we analyzed whether NO/cGMP influences the contractile machinery of the endothelial cells and therefore stabilizes the barrier function. As the central aim the regulation of the MLC kinase and the MLC phosphatase was investigated.

Experiments were performed in cultured monolayer of porcine aortic endothelial cells. MLC phosphorylation was analyzed by the influence of different enzymatic activators or inhibitors, respectively. Furthermore, the permeability and the contractile activation of the endothelial monolayer were measured by determining its albumin permeability and development of isometric force. In addition, translocation of the catalytic subunit, PP1, to myosin was analysed. The cytosolic Ca^{2+} concentration was determined by fluorescent Ca^{2+} indicator technique.

Application of the NO donor DEA-NONOate (50 μ M) caused a strong decline in MLC phosphorylation as well as a distinct reduction of macromolecule permeability and isometric force. In presence of the PKG Inhibitor RP-8-pCPT-cGMPS (50 μ M) the effects of DEA-NONOate on all parameters were completely blocked. YC-1 (20 μ M), activator of the soluble guanylyl cyclase, and Sp-8-Br-PET-cGMPS (50 μ M), activator of PKG, had the same effects as DEA-NONOate. All DEA-NONOate effects were completely blocked by RP-8-pCPT-cGMPS (50 μ M). Under conditions of complete pharmacological inhibition of the MLC kinase by ML-7 (50 μ M), NO/cGMP still enhanced MLC dephosphorylation. In contrast, the NO/cGMP-induced dephosphorylation of MLC was abolished if MLC phosphatase was completely inhibited by calyculin A. These data suggest that NO/cGMP reduces MLC phosphorylation by activating the MLC phosphatase but not by inhibition of the MLC kinase. Accordingly, DEA-NONOate induces translocation of PP1 to myosin. However, the cytosolic Ca^{2+} concentration was not affected by NO/cGMP.

Summary

This study shows for the first time, that NO/cGMP activates the MLC phosphatase in aortic endothelial cells. The activation of PP1 is mediated by a cGMP/PKG-dependent mechanism and causes translocation of PP1 to myosin. The resulting dephosphorylation of MLC leads to inactivation of the endothelial contractile machinery and finally reduces isometric force and permeability. This process is independent of Ca²⁺.

8 Literaturverzeichnis

1. Adelstein RS, Pato MD, Conti MA. The role of phosphorylation in regulating contractile proteins. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 14: 361-373, 1981.
2. Alessi D, MacDougall LK, Sola MM, Ikebe M., Cohen P. The control of proteinphosphatase-1 by targeting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. *Eur J Biochem* 210: 1023-1035, 1992.
3. Alexander SPH, Mathie A, Peters JA. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th Edition. *Br J Pharmacol* 164 (Suppl. 1):S1-S324, 2011.
4. Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesin receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesin molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 50: 197-263, 1998.
5. Arner A, Pfitzer G. Regulation of cross-bridge cycling by Ca^{2+} in smooth muscle. *Rev Physiol Bioch Pharmacol* 134: 63-146, 1999.
6. Baldwin AL, Thurston G. Mechanics of endothelial cell architecture and vascular permeability. *Crit Rev Biomed Eng* 29: 247-278, 2001.
7. Baron DA, Lofton CE, Newman WH, Currie MG. Atriopeptin inhibition of thrombin-mediated changes in the morphology and permeability of endothelial monolayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 3394-3398, 1989.
8. Bates DO. The chronic effect of vascular endothelial growth factor on individually perfused frog mesenteric microvessels. *J Physiol* 15: 225-233, 1998.

9. Bazzoni G, Dejana E. Pores in the sieve and channels in the wall: control of paracellular permeability by junctional proteins in endothelial cells. *Microcirculation* 8: 143-152, 2001.
10. Bindewald K, Gündüz D, Härtel F, Peters SC, Rodewald C, Nau S, Schäfer M, Neumann J, Piper HM, Noll T. Opposite effect of cAMP signaling in endothelial barriers of different origin. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: 1246-1255, 2004.
11. Bloomfield GL, Holloway S, Ridings PC, Fisher BJ, Blocher CR, Sholley M, Bunch T, Sugerman HJ, Fowler AA. Pretreatment with inhaled nitric oxide inhibits neutrophil migration and oxidative activity resulting in attenuated sepsis-induced acute lung injury. *Crit Care Med* 25: 584-593, 1997.
12. Boulanger C, Schini VB, Moncada S, Vanhoutte PM. Stimulation of cyclic adenosine diphosphate, calcium ionophore A23187 and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 101:152-156, 1990.
13. Casnocha SA, Eskin SG, Hall ER, McIntire LV. Permeability of human endothelial monolayers: effect of vasoactive agonists and cAMP. *J Appl Physiol* 67: 1997-2005, 1989.
14. Chen W, Gassner B, Börner S, Nikolaev V, Schlegel N, Waschke J. ANP enhances microvascular albumin permeability by the caveolae-mediated transcellular pathway. *Cardiovasc Res* 93: 141-151, 2012.
15. Cohen P. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 58: 453-508, 1989.
16. Cohen PT. Protein phosphatase 1-targeted in many directions. *J Cell Sci* 115: 241-56, 2002.
17. Colangelo S, Langille BL, Steiner G, Gotlieb AI. Alterations in endothelial F-actin microfilaments in rabbit aorta in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 52-56, 1998.

18. Conti MA, Adelstein RS. The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle kinase by the catalytic subunit of 3':5'-cAMP dependent protein kinase. *J Biol Chem* 256: 3178-3181, 1981.
19. Curry FR, Adamson RH. Vascular permeability modulation at the cell, microvessel, or whole organ level: towards closing gaps in our knowledge. *Cardiovasc Res* 87: 195-197, 2010.
20. Curry FR, Rygh CB, Karlsen T, Wiig H, Adamson RH, Clark JF. ANP modulation of albumin clearance and contrast agent permeability in mouse skeletal muscle and skin: role in regulation of plasma volume. *J Physiol* 588: 325-339, 2010.
21. D'Angelo G, Adam LP. Inhibition of ERK attenuates force development by lowering myosin light chain phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H 602-610, 2002.
22. Dejana E, Bazzoni G, Lampugnani MG. Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Exp Cell Res* 252: 13-19, 1999.
23. De Visser YP, Walther FJ, Laghmani H, Boersma H, van der Laarse A, Wagenaar GT. Sildenafil attenuates pulmonary inflammation and fibrin deposition, mortality and right ventricular hypertrophy in neonatal hyperoxic lung injury. *Respir Res* 10: 30, 2009.
24. Dodd-o, Hrstopoulos ML, Kibler K, Gutkowska J, Mukkaddam-Daher, Gonzalez A. The role of ANP signaling in unilateral lung ischemia-reperfusion injury in the intact mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: L714-L723, 2008.
25. Draijer R, Atsma DE, van der LA, Van Hinsbergh VW. cGMP and nitric oxide modulate thrombin-induced endothelial permeability. Regulation via different pathways in human aortic and umbilical vein endothelial cells. *Circ Res* 76: 199-208, 1995a.

26. Draijer R, Vaandrager AB, Nolte C, de Jonge HR, Walter U, Van Hinsbergh VW. Expression of cGMP-dependent protein kinase I and phosphorylation of its substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein, in human endothelial cells of different origin. *Circ Res* 77: 897-905, 1995b.
27. Drenckhahn D, Mannherz HG. Distribution of actin and the actin-associated proteins myosin, tropomyosin, alpha-actinin, vinculin, and villin in rat and bovine exocrine glands. *Eur J Cell Biol* 30: 167-176, 1983.
28. Dvorak AM, Feng D. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle. *J Histochem Cytochem* 49: 419-432, 2001.
29. Egemnazarov B, Sydykov A, Schermuly RT, Weissmann N, Stasch JP, Sarybaev AS, Seeger W, Grimminger F, Ghofrani HA. Novel soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 attenuates ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296: L462-L469, 2009.
30. Essler M, Amano M, Kruse HJ, Kaibuchi K, Weber PC, Aepfelbacher M. Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells. *J Biol Chem* 273: 21867-21874, 1998.
31. Feng J, Ito M, Ichikawa K, Isaka N, Nishikawa M, Hartshorne DJ. Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem* 274: 37385-37390, 1999.
32. Förstermann U, Pollock JS, Schmidt HHHW, Heller M, Murad F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 1788-1792, 1991.
33. Gabbiani G, Gabbiani F, Lombardi D, Schwartz SM. Organization of actin cytoskeleton in normal and regenerating arterial endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2361-2364, 1983.

34. Garat C, Jayr C, Eddahibi S, Laffon M, Meignan M, Adnot S. Effects of inhaled nitric oxide or inhibition of endogenous nitric oxide formation on hyperoxic lung injury. *Am J Resp Crit Care Med* 155: 1957-1964, 1997.
35. Garcia JG, Siflinger Birnboim A, Bizios R, Del Vecchio PJ, Fenton JW 2nd, Malik AB. Thrombin-induced increase in albumin permeability across the endothelium. *J Cell Physiol* 128: 96-104, 1986.
36. Garcia JG, Davis HW, Patterson CE. Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: Role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell Physiol* 163: 510-522, 1995.
37. Garcia JG, Schaphorst KL, Shi S, Verin AD, Hart CM, Gallahan HS, Patterson CE. Mechanism of ionomycin-induced endothelial cell barrier dysfunction. *Am J Physiol* 273: L 172-84, 1997
38. Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 793-805, 2001.
39. Goeckler ZM, Wysolmerski RB. Myosin light chain kinase - regulated endothelial cell contraction: the relationship between isometric tension, actin polymerisation and myosin phosphorylation. *J Cell Biol* 130: 613-627, 1995.
40. Groeneveld ABJ. Vascular pharmacology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Vasc Pharmacol* 39: 247-256, 2003.
41. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450, 1985.
42. Gündüz D, Hirsche F, Härtel FV, Rodewald CW, Schäfer M, Pfitzer G, Piper HM, Noll T. ATP antagonism of thrombin-induced endothelial barrier permeability. *Cardiovasc Res* 59: 470-478, 2003.

43. Halbrügge M, Friedrich C, Eigenthaler M, Schanzenbacher P, Walter U. Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *J Biol Chem* 265: 3088-3093, 1990.
44. Hartshorne DJ. Myosin Phosphatase: subunits and interactions. *Acta Physiol Scand* 164: 483-493, 1998.
45. Härtel FV, Rodewald CW, Aslam M, Gündüz D, Hafer L, Neumann J, Piper HM, Noll T. Extracellular ATP induces assembly and activation of the myosin light chain phosphatase complex in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 74: 487-496, 2007.
46. He P, Zeng M, Curry FE. cGMP modulates basal and activated microvessel permeability independent of $(Ca^{2+})_i$. *Am J Physiol* 274: H1865-H1874, 1998.
47. Hempel A, Noll T, Muhs A, Piper HM. Functional antagonism between cAMP and cGMP on permeability of coronary endothelial monolayers. *Am J Physiol* 270: H1264-H1271, 1996.
48. Herzig S, Neumann J. Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev* 80: 173-210, 2000.
49. Hixenbaugh EA, Goeckler ZM, Papaiya NN, Wysolmerski RB, Silverstein SC, Huang AJ. Stimulated neutrophils induce myosin light chain phosphorylation and isometric tension in endothelial cells. *Am J Physiol* 273: H981-H988, 1997.
50. Hüttelmaier S, Harbeck B, Steffens O, Messerschmidt T, Illenberger S, Jockusch BM. Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP. *FEBS Lett* 451: 68-74, 1999.
51. Ichikawa K, Hirano K, Ito M, Tanaka J, Nakano T, Hartshorne DJ. Interactions and properties of smooth muscle myosin phosphatase. *Biochemistry* 35: 6313-6320, 1996.

52. Irwin DC, Tissot van Patot MC, Tucker A, Bowen R. Direct ANP inhibition of hypoxia-induced inflammatory pathways in pulmonary microvascular and macrovascular endothelial monolayers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288: L849-L859, 2005.
53. Ishihara H, Martin BL, Brautigan DL, Karaki H, Ozaki H, Kato Y, Fusetani N, Watabe S, Hashimoto K, Uemura D, Hartshorne DJ. Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 159: 871-877, 1989.
54. Ito M, Nakano T, Erdodi F, Hartshorne DJ. Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem* 259: 197-209, 2004.
55. Kamm KE, Stull JT. Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem* 276: 4527-4530, 2001.
56. Kemp-Harper B, Schmidt HH. cGMP in the vasculature. *Hand Exp Pharmacol* 191: 447-467, 2009.
57. Khimenko PL, Moore TM, Wilson PS, Taylor AE. Role of calmodulin and myosin light-chain kinase in lung ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 271: L121-L125, 1996.
58. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273: 245-248, 1996.
59. Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P, Cheresch DA. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* 137: 481-492, 1997.

60. Klinger JR, Warburton R, Carino GP, Murray J, Murphy C, Napier M. Natriuretic peptides differentially attenuate thrombin-induced barrier dysfunction in pulmonary microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 312: 401-410, 2006.
61. Knapp J, Boknik P, Deng MC, Huke S, Lüss I, Klein-Wiele O, Linck B, Lüss H, Müller FU, Nacke P, Scheld HH, Schmitz W, Vahlensieck V, Neumann J. On the contractile function of protein phosphatases in isolated human coronary arteries. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 360: 464-472, 1999.
62. Koesling D. Studying the structure and regulation of soluble guanylyl cyclase. *Methods* 19: 485-493, 1999.
63. Kubes P. Nitric oxide affects microvascular permeability in the intact and inflamed vasculature. *Microcirculation* 2: 235-244, 1995.
64. Kyhse-Andersen J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: *J Biochem Biophys Methods* 10 (3-4): 203-209, 1984.
65. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
66. Langeler EG, van Hinsbergh VW. Norepinephrine and iloprost improve barrier function of human endothelial cell monolayers: role of cAMP. *Am J Physiol* 260: C1052-C1059, 1991.
67. Lee MR, Li L, Kitazawa T. Cyclic GMP causes Ca²⁺ desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Bio Chem* 272: 5063-5068, 1997.
68. Li Q, Altschuld RA, Stokes BT. Quantitation of intracellular free calcium in single adult cardiomyocytes by fura-2 fluorescence microscopy: calibration of fura-2 ratios. *Biochem Biophys Res Commun* 147:120-126, 1987.

69. Lincoln TM, Cornwell TL, Komalavilas P, Boerth N. Cyclic GMP-dependent protein kinase in nitric oxide signaling. *Methods Enzymol* 269: 149-166, 1996.
70. Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, de Jonge HR. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* 22: 307-312, 1997.
71. Lum H, Malik AB. Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am J Physiol* 267 (*Lung Cell Mol Physiol* 11): L223-L241, 1994.
72. Majno G, Palade GE. Studies on inflammation I. Effect of histamine and serotonin on vascular permeability. An electron microscopic study. *J Biophys Biochem Cytol* 11: 571-606, 1961.
73. Mayhan WG. Nitric oxide accounts for histamine-induced increases in macrovascular extravasation. *Am J Physiol* 266: H2369-H2373, 1994.
74. McKie PM, Sangaralingham SJ, Burnett JC Jr. CD-NP: an innovative designer natriuretic peptide activator of particulate guanylyl cyclase receptors for cardiorenal disease. *Curr Heart Fail Rep* 7: 93-99, 2010.
75. McQuaid KE, Keenan AK. Endothelial barrier dysfunction and oxidative stress: roles for nitric oxide? *Exp Physiol* 82: 369-376, 1997.
76. Meyer DJ, Huxley VH. Capillary hydraulic conductivity is elevated by cGMP-dependent vasodilators. *Circ Res* 70: 382-391, 1992.
77. Michel CC. Transport of macromolecules through microvascular walls. *Cardiovasc Res* 32: 644-653, 1996.
78. Michel CC, Curry FE. Microvascular permeability. *Physiol Rev* 79: 703-761, 1999.

79. Moldobaeva A, Welsh-Servinsky LE, Shimoda LA, Stephens RS, Verin AD, Tudor RM, Pearse DB. Role of protein kinase G in barrier-protective effects of cGMP in human pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L919-L930, 2006.
80. Niebuhr K, Ebel F, Frank R, Reinhard M, Doman E, Carl UD, Walter U, Gertler FB, Wehland J, Chakraborty T. A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *EMBO J* 16: 5433-5444, 1997.
81. Nielsen LB. Transfer of low density lipoprotein into the arterial wall and the risk of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 123: 1-15, 1996.
82. Nishikawa M, Hidaka H, Adelstein RS. Phosphorylation of smooth muscle heavy meromyosin by calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. The effect on actin-activated MgATPase activity. *J Biol Chem* 258: 14069-14072, 1983.
83. Okubo S, Erdödi F, Ito M, Ichikawa K, Konishi T, Nakano T, Kawamura T, Brautigan DL, Hartshorne DJ. Characterization of a myosin-bound phosphatase from smooth muscle. *Adv Prot Phosphatases* 7: 295-314, 1993.
84. Okubo S, Ito M, Takashiba Y, Ichikawa K, Miyahara M, Hartshorne DJ, Nakano T. A regulatory subunit of smooth muscle myosin bound phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 429-434, 1994.
85. Patterson CE, Garcia JG. Regulation of thrombin-induced endothelial cell activation by bacterial toxins. *Blood Coagul Fibrinolysis* 5: 63-72, 1994.
86. Paul R, Zhang ZG, Eliceiri BP, Jiang Q, Boccia AD, Zhang RL, Chopp M, Cheresh DA. Src deficiency or blockade of Src activity in mice provides cerebral protection following stroke. *Nat Med* 7: 222-227, 2001.

87. Persechini A, Kamm KE, Stull JT. Different phosphorylated forms of myosin in contracting tracheal smooth muscle. *J Biol Chem* 261: 6293-6299, 1986.
88. Ramirez MM, Kim DD, Duran WN. Protein kinase C modulates microvascular permeability through nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 271: H1702-H1705, 1996.
89. Rheinhard M, Halbrugge M, Scheer U, Wiegend C, Jockusch BM, Walter U. The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *EMBO J* 11: 2063-2070, 1992.
90. Reinhard M, Zumbunn J, Jaquemar D, Kuhn M, Walter U, Trueb B. An alpha-actinin binding site of zyxin is essential for subcellular zyxin localization and alpha-actinin recruitment. *J Biol Chem* 274: 13410-13418, 1999.
91. Riegger GA, Elsner D, Forssmann WG, Kromer EP. Effects of ANP in dogs before and after induction of heart failure. *Am J Physiol* 259: H1643-H1648, 1990.
92. Rippe B, Haraldsson B. Transport of macromolecules across microvascular walls: the two-pore theory. *Physiol Rev* 74: 163-219, 1994.
93. Rotrosen DD, Gallin JI. Histamine Type I receptor occupancy increases endothelial cytosolic calcium, reduces F-actin, and promotes albumin diffusion across cultured endothelial monolayers. *J Cell Biol* 103: 2379-2387, 1986.
94. Sakamoto Y, Mashiko K, Saito N, Matsumoto H, Hara Y, Kutsukata N. Effectiveness of human ANP supplementation in pulmonary edema patients using the pulse contour cardiac output system. *Yonsei med J* 51: 354-359, 2010.

95. Sarker MH, Fraser PH. The role of guanylyl cyclases in the permeability response to inflammatory mediators in pial venular capillaries in the rat. *J Physiol* 540: 209-218, 2002.
96. Sayner SL. Emerging themes of cAMP regulation of the pulmonary endothelial barrier. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300: L667-L678, 2011.
97. Schini VB, Vanhoutte PM. Inhibitors of calmodulin impair the constitutive but not the inducible nitric oxide synthase activity in the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 261: 553-559, 1992.
98. Schmidt EP, Dammara M, Rentsendorj O, Servinsky LE, Zhu B, Moldobaeva A, Gonzales A, Hassoun PM, Pearse DB. Soluble guanylyl cyclase contributes to ventilator-induced lung injury in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295: L1056-L1065, 2008.
99. Schreier B, Börner S, Völker K, Gambaryan S, Schäfer SC, Kuhlencordt P. The heart communicates with the endothelium through the guanylyl cyclase-A receptor: acute handling of intravascular volume in response to volume expansion. *Endocrinology* 149: 4193-4199, 2008.
100. Scott RS, Rentsendorj O, Servinski LE, Moldobaeva A, Damico R, Pearse DB. Cyclic GMP increases antioxidant function and attenuates oxidant cell death in mouse lung microvascular endothelial cells by protein kinase G-dependent mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 299: L323-L333, 2010.
101. Schnittler NJ, Wilke A, Gress T, Suttorp N, Drenckhahn D. Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium. *J Physiol* 431: 379-401, 1990.
102. Shin WS, Sasaki T, Kato M, Hara K, Seko A, Yang W-D, Shimamoto N, Suigimoto T, Toyo-oka T. Autocrine and paracrine effects of endothelium-derived relaxing factor on intracellular Ca²⁺ of endothelial cells and vascular

- smooth muscle cells: identification by two-dimensional image analysis in coculture. *J Biol Chem* 267: 20377-20382, 1992.
103. Simionescu N. Cellular aspects of transcapillary exchange. *Physiol Rev* 63: 1536-1579, 1983.
104. Smolenski A, Poller W, Walter U, Lohmann SM. Regulation of human endothelial cell focal adhesion sites and migration by cGMP-dependent protein kinase I. *J Biol Chem* 275: 25723-25732, 2000.
105. Somlyo AP, Xuqiong W, Walker LA, Somlyo AV. Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 134: 203-234, 1999.
106. Spahr R, Piper HM. Microcarrier cultures of endothelial cells. *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research*. Piper HM. (Hrsg). Springer-Verlag, Heidelberg: 220-229, 1990.
107. Stevens T, Garcia JG, Shasby DM, Bhattahacharya J, Malik AB. Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L419-422, 2000.
108. Stull JT, Hsu L, Tansey MG, Kamm KE. Myosin light chain kinase phosphorylation in tracheal smooth muscle. *J Biol Chem* 265: 16683-16690, 1990.
109. Suizu F, Ueda K, Iwasaki T, Murata-Hori M, Hosoya H. Activation of actin-activated MgATPase activity of myosin II by phosphorylation with MAPK-activated protein kinase-1b (RSK-2). *J Biochem* 128: 435-440, 2000.
110. Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, Georgescu SP, Tang KM, Ito M, Lincoln TM, Mendelsohn ME. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase α . *Science* 286: 1583-1587, 1999.

111. Tansey MG, K. Luby-Phelps, K.E. Kamm, J.T. Stull. Ca^{2+} -dependent phosphorylation of myosin light chain kinase decreases the Ca^{2+} -sensitivity of light chain phosphorylation within smooth muscle cells. *J Biol Chem* 269: 9912-9920, 1994.
112. Terrak M, Kerff F, Langsetmo K, Tao T, Dominiguez R. Structural basis of protein phosphatase 1 regulation. *Nature* 429: 780-784, 2004.
113. Van Nieuw Amerongen GP, Van Hinsbergh VWM. Cytoskeletal effects of rho-like small guanine nucleotide-binding proteins in the vascular system. *Arteroscler Thromb Vasc Biol* 21: 300-311, 2001.
114. Verin AD, Patterson CE, Day MA, Garcia JGN. Regulation of endothelial cell gap formation and barrier function by myosin-associated phosphatase activities. *Am J Physiol* 269: L99-108, 1995.
115. Verin AD, Cooke C, Herenyiova M, Patterson CE, Garcia JGN. Role of Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphatase 2B in thrombin-induced endothelial cell contractile responses. *Am J Physiol* 275: L788-799, 1998.
116. Verin AD, Csontos C, Durbin SD, Aydanyan A, Wang P, Patterson CE, et al., Characterisation of the proteinphosphatase 1 catalytic subunit in endothelium: involvement in contractile responses. *J Cell Biochem* 79: 113-125, 2000a.
117. Verin AD, Wang P, Garcia JG. Immunochemical characterization of myosin-specific phosphatase 1 regulatory subunits in bovine endothelium. *J Cell Biochem* 76: 489-98, 2000b.
118. Walter U. Physiological role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in the cardiovascular system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 113: 41-88, 1989.
119. Westendorp RGJ, Draijer R, Meinders AE, van Hinsbergh VWM. Cyclic-cGMP-mediated decrease in permeability of human umbilical and pulmonary artery endothelial cell monolayers. *J Vasc Res* 31: 42-51, 1994.

120. Word RA, Tang DC, Kamm KE. Activation properties of myosin light chain kinase during contraction/ relaxation cycles of tonic and phasic smooth muscles. *J Biol Chem* 269: 21596-21602, 1994.
121. Wu H, Huang Q, Yuan Y, Granger HJ. VEGF induces NO-dependent hyperpermeability in coronary venules. *Am J Physiol* 271: H2735-H2739, 1996.
122. Wysolmerski RB, Lagunoff D. Involvement of myosin light chain kinase in endothelial cell retraction. *Proc Natl Acad Sci US* 87:16-20, 1990.
123. Wysolmerski RB, Lagunoff D. Regulation of permeabilized endothelial cell retraction by myosin phosphorylation. *Am J Physiol* 261: C32-40, 1991.
124. Xing J, Moldobaeva N, Birukova AA. ANP protects against Staphylococcus aureus induced lung injury and endothelial barrier dysfunction. *J Appl Physiol* 110: 213-224, 2011.
125. Yamada Y, Furumichi T, Furui H, Yokoi T, Ito T, Yamauchi K, Yokota M, Hayashi H, Saito H. Roles of calcium, cyclic nucleotides, and protein kinase C in regulation of endothelial permeability. *Arteriosclerosis* 10: 410-420. 1990.
126. Yin J, Hoffmann J, Kaestle SM, Neye N, Wang L, Baeurle J, Liedtke W, Wu S, Kuppe H, Pries AR, Kuebler WM. Negative-feedback loop attenuates hydrostatic lung edema via a cGMP-dependent regulation of transient receptor potential vanilloid 4. *Circ Res* 102: 966-974, 2008.
127. Yuan SY. Protein Kinase signaling in the modulation of microvascular permeability. *Vasc Pharmacol* 39: 213-223, 2003.
128. Yuan SY, Granger HJ, Zawieja, Chilian WM. Histamine increases venular permeability via a phospholipase C-NO synthase-gyanylate cyclase cascade. *Am J Physiol* 264: H1734, 1993.

Danksagung

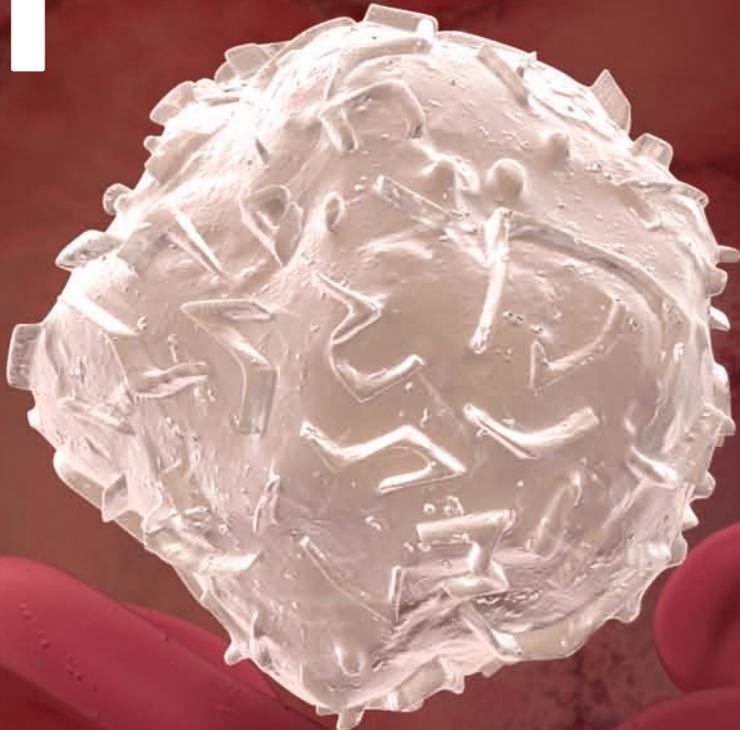
Hiermit bedanke ich mich bei Prof. Dr. Dr. H. M. Piper, Prof. Dr. R. Schulz, Prof. Dr. M. Bergmann und PD Dr. C. Rummel für die Unterstützung und fachliche Betreuung meiner Dissertation sowie bei Prof. Dr. T. Noll darüber hinaus für die vielen guten Gespräche.

Für die gute Zusammenarbeit während des praktischen Teils der Doktorarbeit bedanke ich mich bei meinen damaligen Kollegen, v. a. bei Dr. Claudia Schäfer, Dr. Matthias Schäfer, Dr. Yasser Abdallah sowie Ulrike Newport, die mich besonders freundschaftlich unterstützt haben.

Für die freundschaftliche Unterstützung danke ich auch Eva Goldberg und Dr. Maria Deike.

Lieben Dank an meine Eltern Wilga und Heinz Nau, meine Schwestern Dr. Claudia Nau und Dr. Patricia Nau, meinen Onkel Rainer Küllenberg und meinen Mann Gerd Niggemann, die mir stets ungefragt zur Seite standen und mir den erfolgreichen Abschluß der Dissertation ermöglichten.

Meinen geliebten Kindern Anna, Linda und Paula danke ich, weil sie einfach toll sind.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6189-0



9 783835 196189 0