

Aus dem Institut
für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. P.C. Weber

**Untersuchungen zur Wirkung
des *Pasteurella multocida* Toxins
auf die endotheliale Barrierefunktion in vitro**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der
Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu
München

Vorgelegt von

Karin Hermann

aus

Kempton

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Aepfelbacher

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. U. Welsch
Priv. Doz. Dr. Cor. De Wit
Prof. Dr. B. H. Belohradsky

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. M. Essler

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2002

*Meinen Schwestern
Angela, Elke und Susanne*

... denn jedem Anfang wohnt ein Zauber inne,
der uns beschützt und hilft zu leben
(Hermann Hesse)

INHALTSVERZEICHNIS:

1.	EINLEITUNG	13
1.1	Die Erforschung der Auswirkungen bakterieller Toxine auf menschliche Zellen	13
2.	STAND DER FORSCHUNG	17
2.1	Aktueller Wissensstand über den Erreger <i>Pasteurella multocida</i> und sein Toxin (PMT)	17
2.2	Regulation der vaskulären Permeabilität	19
2.2.1	Mechanismus der Kontraktilität in glatten Muskelzellen und im Endothel	21
2.3	Die Ras Superfamilie und ihre fünf Subfamilien	24
2.4	Die kleine GTPase Rho mit ihrer Familie und deren Funktion	26
2.5	Die Wirkung von Rho auf das Zytoskelett	26
2.6	Regulation der Rho GTPasen	28
2.6.1	Aktivierende und hemmende Regulationsproteine von Rho	29
2.6.2	Kaskadenartige Aktivierung von Rho durch Cdc42 und Rac	30
2.7	Hemmung und Aktivierung von Rho durch bakterielle Toxine	32
2.7.1	Die Hemmung von Rho durch die C3-Transferase aus <i>C. botulinum</i> und durch die Toxine A und B aus <i>C. difficile</i>	32
2.7.2	Die Aktivierung von Rho durch DNT, CNF und PMT	34

3.	ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG	37
4.	MATERIAL	41
4.1	Chemikalien und technische Geräte	41
4.2	Puffergemische der einzelnen Versuchsreihen	43
4.2.1	Messung der endothelialen Permeabilität	43
4.2.2	Herstellung rekombinanter Proteine	44
4.2.3	Mikroinjektion	44
4.2.4	Myosin-Leichtketten-Phosphorylierung	44
4.2.5	Myosinangereicherte Fraktion	45
4.2.6	Messung der myosinassoziierten Phosphataseaktivität	45
5.	METHODEN	47
5.1	Zellkultur von HUVEC	47
5.2	Die Messung der EC-Permeabilität mit Hilfe des Meerrettichperoxidase-Assays	48
5.3	Immunfluoreszenzfärbung	49
5.4	Herstellung rekombinanter Proteine	50
5.5	Die Mikroinjektion	51
5.6	Die Phosphorylierung der Myosin-Leichtkette	52
5.6.1	Durchführung des Harnstoffgels	53
5.7	Präparation der myosinangereicherten Fraktionen	54
5.8	Messung der Phosphataseaktivität	55

6.	ERGEBNISSE DER FORSCHUNGSARBEIT	57
6.1	Etablierung des Permeabilitätsassays	57
6.1.1	PMT erhöht die endotheliale Monolayerpermeabilität über einen Rho-abhängigen Mechanismus	57
6.2	<i>Pasteurella multocida</i> Toxin führt zu der Rho-abhängigen Streßfaserbildung	60
6.3	Die Aktin-Streßfaserbildung	62
6.4	PMT inaktiviert die Myosin-Leichtketten-Phosphatase und erhöht die Myosin-Leichtketten-Phosphorylierung	65
7.	ZUSAMMENFASSUNG DER FORSCHUNGSERGEBNISSE	69
8.	DISKUSSION	71
9.	LITERATURVERZEICHNIS	77

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:

ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
ATP	Adenosintrisphosphat
<i>B. bronchiseptica</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
<i>C. botulinum</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CNF	zytotoxisch nekrotisierender Faktor
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm, Erdbeschleunigung
HRP	Meerrettichperoxidase
HUVEC	humane umbilikale venöse Endothelzellen
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
LPA	Lysophosphatidsäure
M	Molar
MLC	Myosin-Leichtkette
MLCK	Myosin-Leichtketten-Kinase
MLC-P	phosphorylierte Myosin-Leichtkette
MLC-Pase	Myosin-Leichtketten-Phosphatase
MLC-Pase-P	phosphorylierte Myosin-Leichtketten-Phosphatase
PBS	phosphatgepuffertes Salz
PH	“pleckstrin homology domain”
PLC	Phospholipase C
PMT	<i>Pasteurella multocida</i> Toxin
PP1	Proteinphosphatase 1
PP2	Proteinphosphatase 2
PP1M	Myosingebundene MLC-Phosphatase
RBD	Rho bindende Domäne
TCA	Trichloressigsäure
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute

1. EINLEITUNG

1.1 DIE ERFORSCHUNG DER AUSWIRKUNGEN BAKTERIELLER TOXINE AUF MENSCHLICHE ZELLEN

Die Erforschung der morphologischen Veränderungen und der biochemischen Signalübertragungswege nach Stimulierung von humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC) mit dem bakteriellen Toxin aus *Pasteurella multocida*, war Mittelpunkt dieser Forschungsarbeit.

Die Effekte bakterieller Toxine auf Säugetierzellen rücken immer mehr in den Mittelpunkt der biochemischen Forschung. Klinisch stehen wir vor dem Problem der Antibiotikaresistenz unterschiedlichster Erreger. So wird es dringend nötig sein, die biochemischen Vorgänge, welche in den Zellen nach Exposition mit bakteriellen Toxinen ablaufen, weiter zu erforschen und zu verstehen, um neue Therapiekonzepte entwickeln zu können. Darüber hinaus gehören bakterielle Toxine zu den spezifischsten und potentesten Werkzeugen der zellbiologischen Grundlagenforschung.

Die zelluläre Mikrobiologie gewinnt in der mikrobiologischen Forschung immer mehr an Bedeutung. Die morphologischen Veränderungen von Säugetierzellen nach Inkubation mit bakteriellen Toxinen und das Verständnis der molekularen Grundlagen könnte längerfristig zu erfolgreichen neuen Therapiemaßnahmen unterschiedlichster Infektionskrankheiten verhelfen.

Gegenstand intensiver Forschung in den letzten drei Jahrzehnten war es unter anderem, die Struktur und den pathogenen Wirkmechanismus ADP-ribosylierender Toxine aufzuklären und zu verstehen. Zu diesen Toxinen zählt

man die C3-Transferase aus *Clostridium botulinum* und andere C3-ähnliche Exoenzyme, wie die von *Clostridium limosum* oder EDIN von *Staphylococcus aureus* (Dickey et al, 1992). So weiß man heute, daß diese Toxine in Säugetierzellen die kleinen GTPasen der Rho-Familie mit hoher Selektivität modifizieren, so daß Stoffwechselwege und Regulationsmechanismen, welche durch Rho kontrolliert werden, gehemmt sind. Morphologisch bedeutet das eine Hemmung der Zellkontraktion, und im Falle von Endothelzellen, eine Vermeidung der Permeabilitäts-erhöhung am Gefäßendothel.

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit über das *Pasteurella multocida* Toxin (PMT) wurde ein Rho-abhängiger Stoffwechselweg untersucht, der im Ergebnisteil dieser Arbeit zur Darstellung kommt.

Zur Verdeutlichung der Wirkweise bakterieller Toxine und ihrer klinischen Bedeutung sei im Folgenden ein bereits gut erforschtes Beispiel einer pathogenen Wirkung eines bakteriellen Toxins erwähnt, nämlich das des Toxins aus *Vibrio cholerae*. Das Cholera-toxin greift durch ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen, welche durch sogenannte "seven transmembrane spanning region"-Plasmamembranrezeptoren aktiviert werden, in verschiedene Zellfunktionen ein. Während der Vermehrung der Vibriolen im Dünndarm wird das Cholera-toxin gebildet, welches sich aus den Untereinheiten A_1 , A_2 und B zusammensetzt. Die Untereinheit B ist für die Bindung des Moleküls an Gangliosidrezeptoren G_{MI} der Enterozyten verantwortlich. Die eigentlich aktive Komponente ist die A-Untereinheit. Nach der Bindung des Toxins an die Zellen gelangen beide A-Untereinheiten über endozytotische Vesikel in das Zytosol der eukaryonten Zellen. Die A_1 -Untereinheit ADP-ribosyliert und aktiviert dadurch $G_{\alpha s}$, welches dann die Adenylatzyklase aktiviert. Dies hat einen starken Anstieg von cAMP zur

Folge, was Proteinkinasen aktiviert, welche schließlich zelluläre Regulatorproteine phosphorylieren und aktivieren, die für die Sekretion von Elektrolyten verantwortlich sind. Aus dieser beschriebenen Reaktionskette folgen die typischen Symptome der Cholera, wie wässrige Durchfälle sowie Erbrechen mit einem Flüssigkeitsverlust von bis zu 20 l am Tag (Bourne et al., 2000).

Desweiteren sei das Bakterium *Bordetella pertussis* als Erreger des Keuchhustens erwähnt. Das *Bordetella pertussis* Toxin ADP-ribosyliert und inaktiviert $G\alpha_i$. So kommt es zur Inaktivierung des auf die Adenylatzyklase hemmend wirkenden G-Proteins und als Folge zur Stimulation der Adenylatzyklase, was zu dem typischen klinischen Erscheinungsbild der krampfartigen Hustenanfälle führt (Salyers et al., 1994).

Als drittes Beispiel für die krankheitsbestimmende Wirkung einzelner Toxine sei noch auf das Toxin von *Corynebacterium diphtheriae* eingegangen. Das Diphtherie-Toxin ist ein Polypeptid, welches aus den Untereinheiten A und B besteht. Die B-Untereinheit ist für die Bindung des Toxins an seinen Rezeptor und die Einschleusung des gesamten Moleküls in die Zelle verantwortlich. Das Fragment A ist die eigentlich aktive Komponente. Es inaktiviert den Elongationsfaktor EF2, der die Translokation der Peptidyl-t-RNA von der A-(Amino) zur P-(Peptidort) Position am Ribosom in der eukaryonten Zelle katalysiert. Das klinische Erkrankungsbild, welches nach der Infektion auftritt, kann man unterteilen in eine lokale Infektion, welche v. a. auf Schleimhäuten im Rachen, in der Nase und auf den Konjunktiven auftritt und einer systemischen Intoxikation, welche bis zur Parenchymdegeneration im Herzmuskel, der Leber, den Nieren sowie zu Lähmungen der motorischen Kopfnerven führen kann (Kayser et al., 1993).

Neben dem hier im Ergebnisteil zur Darstellung kommenden Rho-abhängigen Stoffwechselweg des PMTs, sei hier auf zwei weitere wichtige Toxine eingegangen, welche Rho inaktivieren bzw. aktivieren. Die von *C. difficile* gebildeten Toxine A und B modifizieren Rho, indem sie es an der Aminosäure Threonin 37 monoglucosylieren und so das Rho-Protein inaktivieren. So ist die Zelle von den Auswirkungen des Rho-Proteins geschützt (Wilkins et al., 1996).

Der “cytotoxic necrotizing factor 1” (CNF1) aus *Escherichia coli* gewonnen, aktiviert die kleine GTPase Rho und führt so zu den typischen zellmorphologischen Veränderungen (Fiorentini et al., 1997).

Es sei an dieser Stelle nur ein kurzer Abriß der Hemmung und Aktivierung von Rho gegeben. Die Kapitel 2.7.1 und 2.7.2 geben einen genaueren Einblick.

2. STAND DER FORSCHUNG

2.1 AKTUELLER WISSENSSTAND ÜBER DEN ERREGER *PASTEURELLA MULTOCIDA* UND SEIN TOXIN (PMT)

Pasteurella multocida ist ein gramnegatives, kokkoides Stäbchen innerhalb der Gattung *Pasteurella*. Dieses Bakterium ist unbeweglich, katalase- und oxidasepositiv und ein Endotoxinbildner (Hahn et al., 1994). Dieses intrazellulär wirkende Toxin, welches durch einen noch nicht genau aufgeklärten endozytotischen Mechanismus in die Zelle gelangt, aktiviert dort verschiedene Signalwege (Rozenfurt et al., 1990). Forschungen an Oozyten des Frosches gaben Hinweise darauf, daß PMT die $G_q\alpha$ -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins stimuliert, welches dann die PLC- β 1 aktiviert, wodurch aus Phosphatidylinositol-4,5bisphosphonat (PIP₂) Inositol-1,4,5trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DG) entstehen, wodurch sowohl die Proteinkinase C aktiviert wird und es zu einer Ca^{++} -Erhöhung durch intrazelluläre Speicherentleerung kommt (Wilson et al., 1997; Staddon et al., 1991).

Die nachfolgende Abbildung 2-1 verdeutlicht den beschriebenen Reaktionsablauf.

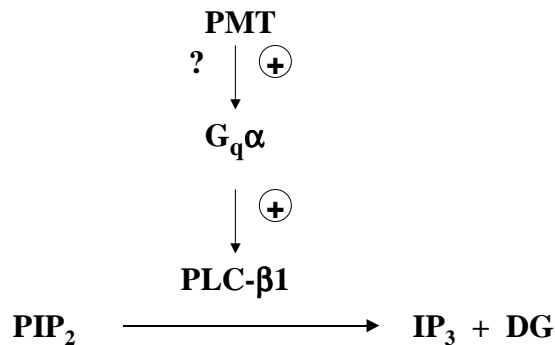


Abb. 2-1: Aktivierung der PLC-β1 nach PMT-Behandlung

Das Bakterium *Pasteurella multocida* ist sowohl für den Menschen, als auch für unterschiedliche Tierspezies ein pathogener Erreger. Zur Infektion kommt es v. a. durch Katzenbisse, da das Bakterium bei bis zu 90% der Tiere in der nasopharyngealen Flora nachweisbar ist. Es kann jedoch auch der Umgang mit erkrankten Tieren oder eine Kratzverletzung eine Infektion nach sich ziehen. Die Infektion mit *Pasteurella multocida* kann klinisch zu ganz unterschiedlichen Krankheitsbildern führen. So kann es zu einer lokalen Weichteilschwellung nach einem Tierbiß kommen, was sich zu einer abszedierenden oder phlegmonösen Entzündung bis hin zum Bild einer Osteomyelitis oder Meningitis ausweiten kann. Weiter könnte eine chronische Lungeninfektion resultieren. Vereinzelt sind auch spontane Bakteriämien mit und ohne metastatischer Läsionen beschrieben worden (Kayser et al., 1993).

Elling und seine Arbeitsgruppe konnten zeigen, daß es durch die intrakutane Injektion von PMT bei Versuchstieren zu einer deutlichen Entzündungsreaktion mit Ödembildung, Einwanderung neutrophiler Granulozyten und verstärkter Anheftung von Thrombozyten an das Gefäßlumen kommt (Elling et al., 1988). Der molekulare Mechanismus, durch den bakterielle Toxine wie

PMT die Endothelintegrität stören, war bei Beginn dieser Arbeit noch unklar. Dagegen ist von Entzündungsmediatoren, wie z. B. Thrombin bekannt, daß sie die vaskuläre Permeabilität durch einen Aktomyosin-abhängigen Signalweg mit Zellkontraktion erhöhen (Wysolmerski et al., 1990).

2.2 REGULATION DER VASKULÄREN PERMEABILITÄT

Das Endothel ist eine alle Gefäße auskleidende Zellschicht und stellt die Barriere zwischen Blutstrom und den umgebenden Geweben dar. Würde man diese aus nur einer Zellschicht bestehende Schicht eines einzigen menschlichen Körpers ausbreiten, so würde man eine mehrere tausend Quadratmeter große Fläche erhalten. Diese vaskuläre Schranke beinhaltet eine große Anzahl unterschiedlicher Mechanismen, welche am aktiven Austausch von Nährstoffen, Hormonen, Makromolekülen und Leukozyten zwischen Gefäßen und Geweben beteiligt sind. Diese Schranke kann durch verschiedene Vorgänge durchbrochen werden, was die Störung der Gefäßpermeabilität zur Folge hat (van Hinsbergh, 1997).

So konnten bisher einige molekulare Mechanismen, welche zur Zunahme der endothelialen Permeabilität führen, gefunden werden. Humorale Agonisten, wie z. B. Thrombin oder Histamin binden und aktivieren membranständige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. In der Folge lösen sich die interendothelialen Zellkontakte auf und die Endothelzellen kontrahieren sich. Dadurch entstehen Lücken im "Monolayer", die den parazellulären Austritt von Flüssigkeit in das umliegende Gewebe ermöglichen.

Durch die so gestörte vaskuläre Permeabilität kann es in vivo zu lokalen Ödemen und Entzündungen oder zu systemischen Veränderungen im Blutkreislauf, wie z. B. einer Sepsis, kommen (Simionescu et al., 1992).

Neben der Auflösung der Zellkontakte in Verbindung mit Zellschäden besteht eine andere Möglichkeit für Makomoleküle die Endothelzellschicht durch Poren zu überwinden (Essler et al., 1998).

Der Mechanismus, welcher in Endothelzellen für die Kontraktion verantwortlich ist, ist dem in glatten Muskelzellen vergleichbar. Im Rahmen dieser Arbeit wird im Kapitel 2.2.1 genauer darauf eingegangen.

Im Folgenden werden die Strukturen der Zellkontakte, welche an der Regulation der Permeabilität beteiligt sind, näher beschrieben und erläutert.

Zum einen sind die sogenannten "tight junctions", auch als Zona occludens bezeichnete Regionen zu nennen. Diese stellen gürtelförmig verschmolzene Strecken der Zellmembran mit sehr geringer Durchlässigkeit für Ionen und Proteine dar. Desweiteren kommen "adherens junctions" als Kontakte zwischen Endothelzellen vor, die eine feste mechanische Zellverankerung darstellen, die durch Interaktionen zwischen Cadherinen gekennzeichnet sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß vasoaktive Substanzen die Permeabilität über mindestens zwei Angriffspunkte erhöhen können. Zum einen durch eine Aktomyosin bedingte Zellkontraktion. Diese ist möglicherweise koordiniert mit einer vorübergehenden Zerstörung der "tight und/oder adherens junctions" (van Hinsbergh, 1997). Die Rolle der transzellulären Poren bei diesen Vorgängen ist unklar.

2.2.1 MECHANISMUS DER KONTRAKTILITÄT IN GLATTEN MUSKELZELLEN UND IM ENDOTHEL

Die Kontraktionsvorgänge in glatten Muskelzellen und Endothelzellen unterscheiden sich erheblich von der im quergestreiften Muskel. Das Netzwerk aus Aktin- und Myosinfilamenten ist relativ ungeordnet, da es nicht in Sarkomeren gebündelt vorliegt. Der Vorgang der Kontraktion wird dabei in erster Linie durch ein sehr komplexes System von Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen der leichten Myosinketten gesteuert.

Die Regulierung der Kontraktion und der Relaxation ist am besten in glatten Muskelzellen von Vertebraten untersucht. Dabei wurden bisher vier grundlegende Mechanismen gefunden. Bei drei dieser Vorgänge wird das Myosin in entscheidender Art und Weise verändert, wobei als regulatorisch wirksames Enzym die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLC-Kinase) in erheblichem Maße beteiligt ist. In der aktiven Form phosphoryliert es die regulatorisch wirksame leichte Myosinkette. So kann Myosin mit Aktin in Wechselwirkung treten und eine Kontraktion auslösen.

Bei dem am längsten bekannten Mechanismus wird die MLC-Kinase bei einer Ca^{++} -Konzentration von etwa 10^{-6} M Ca^{++} /Calmodulin-abhängig aktiviert. So erfolgt eine Phosphorylierung der leichten Myosinkette an Serin 19 und Threonin 18, was die Aktin-stimulierte ATPase-Aktivität des Myosins stimuliert. Sinkt der Ca^{++} -Spiegel auf unter 10^{-6} M, so dissoziieren Ca^{++} und Calmodulin von der MLC-Kinase ab, so daß das Enzym inaktiv ist. Unter diesen Bedingungen wird die Myosin-Leichtkette durch eine MLC-Phosphatase, welche Ca^{++} -unabhängig ist, dephosphoryliert und der Muskel relaxiert. Diese komplexen Reaktionsabläufe sind in der Abbildung 2-2 schematisch dargestellt.

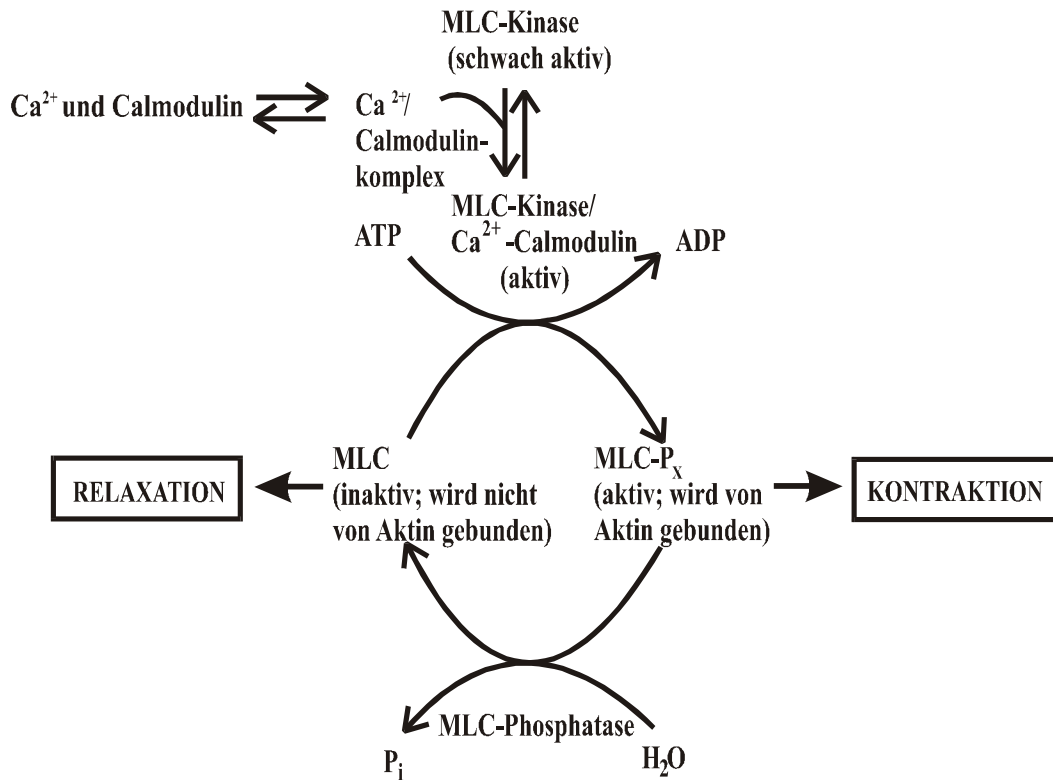


Abb. 2-2: Regulation der Relaxation und Kontraktion von Zellen durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung der MLC

Ein Mechanismus welcher zu einer Relaxation führt, wird durch cAMP-Erhöhung induziert. Die Stimulation β -adrenerger Rezeptoren durch Adrenalin zieht über die Erhöhung der Adenylatzyklase-Aktivität und cAMP-Erhöhung die Aktivierung einer cAMP-abhängigen Proteinkinase nach sich, welche die MLC-Kinase an zwei Stellen phosphoryliert und dadurch hemmt (Darnwell et al., 1993). Neuere Forschungsergebnisse erlauben an dieser Stelle den Schluß, daß cAMP auch darüber wirkt, daß es durch Hemmung von Rho die MLC-Phosphatase aktiviert (Essler et al., 2000).

Mindestens durch diese beiden beschriebenen Mechanismen wird der Phosphorylierungsgrad der MLC reduziert und es kommt zur Entspannung des Muskels bzw. der Zelle. Siehe dazu Abbildung 2-3.

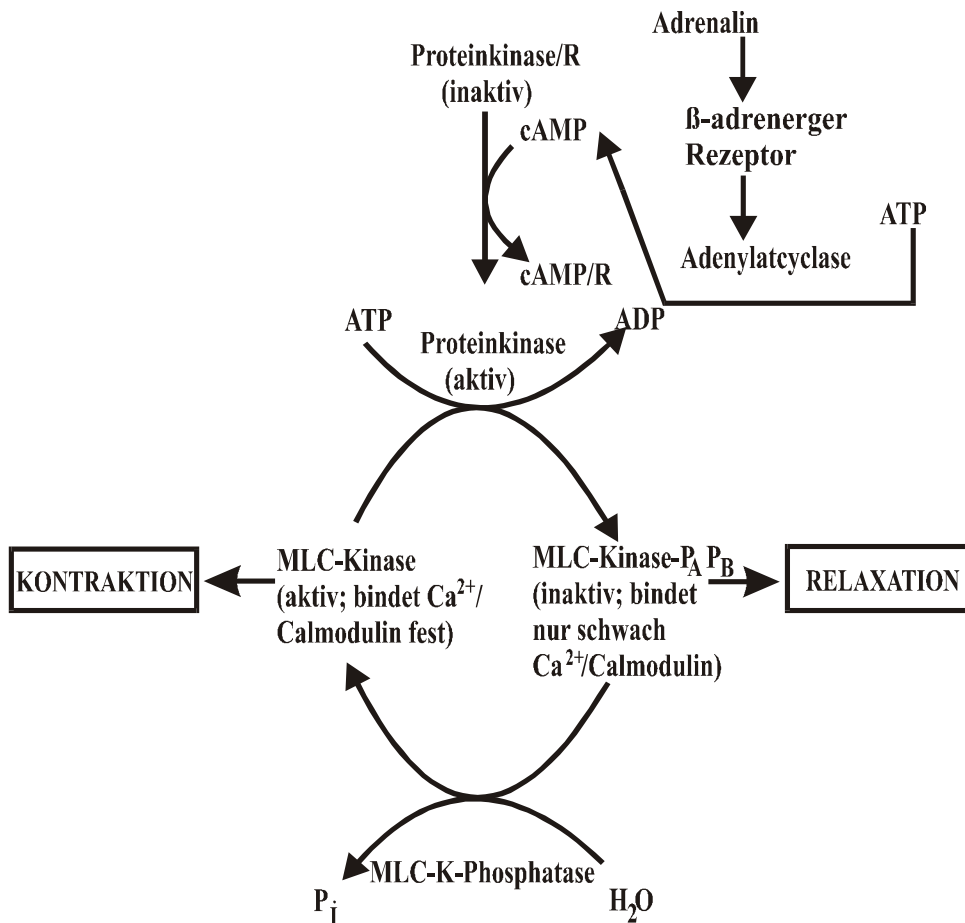


Abb. 2-3: cAMP-abhängige Verminderung der Kontraktion von Zellen

Auch die Aktivierung der Proteinkinase C durch Diacylglycerin und Ca^{++} bewirkt die Phosphorylierung der MLC-Kinase und der Myosin-Leichtketten. Die Proteinkinase C phosphoryliert Serin/ Threonin 1,2 der Myosin-Leicht-

kette und hemmt so deren ATPase-Aktivität. Da die MLC-Kinase sowie die Myosinleichtkette im phosphorylierten Zustand inaktiv sind, entspannt sich der Muskel oder eine kontraktile Zelle (Darnwell et al., 1993).

2.3 DIE RAS SUPERFAMILIE UND IHRE FÜNF SUBFAMILIEN

Die Entdeckung, daß viele Formen der Krebserkrankung onkogenetische Mutationen der Ras Gene enthalten, hat großes Interesse an der Erforschung der biologischen Rolle der Ras- und Ras-ähnlichen Proteine geweckt. So sind heute über 50 niedermolekulare GTPasen, welche mit der Ras-Familie verwandt sind, und welche eine Reihe von zellulären Prozessen regulieren, bekannt (Bishop und Hall, 2000).

Die Ras-Familie ist eine Familie von kleinen GTPasen, die heute in fünf Subfamilien unterteilt werden kann. Dazu werden die Ras-, Rab-, ARF-, Ran- und die Rho-Familie gezählt. Die Mitglieder einer Familie haben zu den Mitgliedern anderer Familien eine 30%ige Identität in ihrer Aminosäuresequenz. Die Mitglieder einer Familie haben untereinander eine Sequenzidentität von mindestens 50% (Aktories, 1997).

Das Ras-Protein spielt eine Schlüsselrolle für die Regulation von Wachstum und Differenzierung in eukaryonten Zellen. Ras gilt als ein wichtiges Bindeglied in der Signaltransduktion zwischen Rezeptor-Tyrosinkinasen und nukleären Transkriptionsfaktoren (Bokoch und Der, 1993). Als Mitglieder dieser Familie seien hier nur H-Ras und Ki-Ras erwähnt.

Der Gruppe der Rho-GTPasen kommt eine herausragende Bedeutung in der Organisation des Aktin-Zytoskeletts zu. Darauf wird im Folgenden noch genauer eingegangen. Rho wurde zuerst aus *Aplysia* cDNA isoliert. Später

konnten weitere Mitglieder dieser Familie, nämlich Rac1, 2 und 3, Cdc 42 mit den Isoformen Cdc42HS und G25K, Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7, Rnd3/RhoE, RhoD, RhoG, TC10 und TTF isoliert werden. Untereinander besitzen diese Proteine eine Sequenzhomologie von 50 - 55%.

Die Rab- und ARF-Subfamilien sind v. a. am Vesikeltransport, der Endozytose und Exozytose beteiligt.

Proteine, welche zur Ran-Familie gehören, spielen bei der Regulation des nukleären Proteinimports, bei dem nur ganz bestimmte Proteine in den Nukleus transportiert werden, eine Rolle (Bishop et al., 2000). Tabelle 1 gibt einen Überblick über die beschriebenen GTPase-Familien mit einer Auswahl von Vertretern und deren typischen Funktionen. Die am besten untersuchten Mitglieder der Rho-Familie sind Rho, Rac und Cdc42.

Subfamilie	Mitglieder	Funktion
Ras	H-Ras/Ki-Ras/	Wachstum
	N-Ras/TC21	Differenzierung
Rho	RhoA/B/C,Cdc42Hs/	Aktinzytoskelett
	G25K, Rac1,2 und 3,	Integrinkomplexe
	RhoG,Rnd1/Rho6,Rnd2/Rho7,	
	Rnd3/RhoE, RhoD, RhoG,TC10, TTF	
Rab	Rab1...Rab26	Vesikeltransport
ARF	ARF1...ARF6	Vesikeltransport
Ran	Ran1...Ran6	nukleärer Proteinimport

Tabelle 1: Die Ras-Superfamilie, modifiziert nach Bishop et al., 2000

2.4 DIE KLEINE GTPASE RHO MIT IHRER FAMILIE UND DEREN FUNKTION

Im Folgenden soll näher auf die Familie der Rho-GTPasen eingegangen werden. Zu der Familie der kleinen GTP-bindenden Proteine zählt man: RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, Rac1, Rac2, Rac3, G25K, TC10 und Cdc42Hs, TC10, TTF, Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7 und Rnd3/RhoE (Bishop und Hall, 2000). Einige Mitglieder dieser Proteinfamilie spielen eine Schlüsselrolle in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts (Tapan und Hall, 1997). Durch Mikroinjektion von rekombinantem konstitutiv aktivem V14 RhoA in Swiss 3T3 Fibroblasten konnte gezeigt werden, daß Rho für die Bildung und Regulation von Aktin-Streßfasern und fokalen Adhäsionsstellen, welche mit "Integrin Clusters" an der Zelloberfläche assoziiert sind, eine wichtige Rolle spielt. Diese Reaktionen konnten durch die Vorbehandlung der Zellen mit dem Rho-Inhibitor C3-Transferase aus *Clostridium botulinum* gehemmt werden. Andere Versuche mit 3T3 Fibroblasten führten zu dem Schluß, daß durch Mikroinjektion der C3-Transferase die Motilität, ein Mechanismus der ebenfalls in engem Zusammenhang mit der Rho-GTPase gebracht wird, gehemmt wird (Takaishi et al., 1992).

2.5 DIE WIRKUNG VON RHO AUF DAS ZYTOSKELETT

Das Aktin-Zytoskelett spielt eine wichtige Rolle für die Zellmotilität, die Zytokinese, die Phagozytose und den intrazellulären Vesikeltransport. Die Grundstruktur besteht aus Aktinfilamenten und speziellen, an Aktin gebundenen Proteinen. In ruhenden, nicht-Muskelzellen erkennt man wenig Struktur in der Anordnung der Aktin- und Myosinfilamente. Sie bilden ein loses

Netzwerk. Sobald aber ein Stimulus auf die Zellen einwirkt, wie z. B. Thrombin, kommt es zu den typischen zellmorphologischen Veränderungen wie z. B. der Ausbildung von Aktin-Streßfasern und auch zur Bildung von Löchern im Endothelzellverband mit Erhöhung der vaskulären Permeabilität. Thrombin wirkt nicht auf alle Zellen. Am besten ist seine Wirkung auf Endothelzellen und Thrombozyten beschrieben (Chrzanowska-Wodnicka und Burridge, 1996).

Eine Zelle, in der Rho aktiviert wurde, zeichnet sich durch die Organisation des bis dahin ungeordneten Aktins zu gebündeltem Aktin in Form der sogenannten Aktin-Streßfasern aus. Gleichzeitig können fokale Adhäsionsstellen nachgewiesen werden, die als Vermittler zwischen der extrazellulären Matrix und dem Intrazellulärraum fungieren, und in denen tyrosinphosphorylierte Proteine, wie z. B. Paxillin und die fokale Adhäsionskinase angereichert sind. An der zytoplasmatischen Seite haben die makromolekularen Komplexe engen Kontakt zum Aktin und gelten dort als Ansatzstellen der Aktinfilamentbündel (Machesky und Hall, 1996). Außerdem binden sie an die zytoplasmatischen Domänen von Integrinkomplexen. Hall und seine Forschungsgruppe zeigten zuerst, daß Rho am Zusammenbau dieser Komplexe unter der Kontrolle weiterer extrazellulärer Faktoren beteiligt ist (Ridley et al., 1992). Die genauen Reaktionswege, die zum Aufbau dieser fokalen Adhäsionsstellen ablaufen, sind jedoch bis heute noch nicht ausreichend verstanden und aufgeklärt.

In der Abbildung 2-4 ist eine durch Rho aktivierte Zelle schematisch dargestellt.

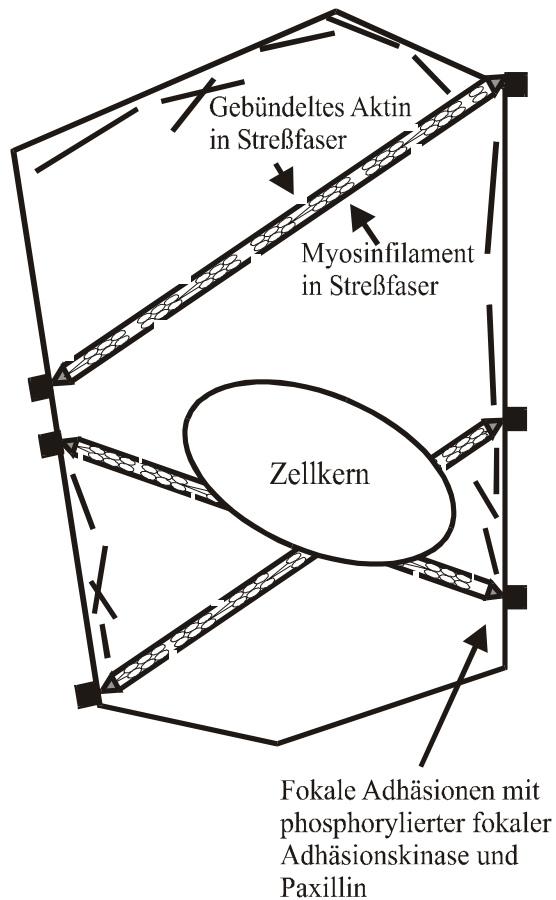


Abb. 2-4: Schematische Darstellung einer durch Rho aktivierten Zelle

2.6 REGULATION DER RHO GTPASEN

Die kleinen GTPasen der Rho-Familie werden wie die heterotrimeren G-Proteine über einen GTPase-Zyklus reguliert. So sind sie inaktiv in ihrer GDP-gebundenen Form und aktiv in der GTP-gebundenen Form. Die Bindung von GTP bringt eine Konformationsänderung mit sich, die die Rho Wechsel-

wirkung mit spezifischen Zielproteinen ermöglicht (Aspenström, 1999). Diese Vorgänge sind in der Abbildung 2-5 dargestellt.

2.6.1 AKTIVIERENDE UND HEMMENDE REGULATIONSPROTEINE VON RHO

Die Regulation der Aktivität von Rho-GTPasen erfolgt über drei Gruppen interagierender Regulationsproteine. Zur ersten Gruppe zählt man die “guanine nucleotide exchange factors” (GEFs) oder auch als “guanine nucleotide dissociation simulators” (GDS) bezeichneten Proteingruppen. Diese regulatorisch wirkenden Proteine beschleunigen die Freisetzung von GDP, erleichtern gleichzeitig die Bindung von GTP und aktivieren dadurch die GTPasen. Den aktivierenden Faktoren ist die Sequenz gemeinsam, welche das erste Mal beim Dbl, einem Proto-Oncogen, identifiziert werden konnte (Cerione et al., 1996). Die zweite Gruppe der regulatorisch wirksamen Proteine stellen die “guanine nucleotide dissociation inhibitors” (GDIs) dar. Diese verhindern den Nukleotidaustausch. Gleichzeitig kommt diesen Proteinen wohl auch eine im Detail noch nicht ganz geklärte Rolle beim Transport der GTPasen zu. Es ist aber bekannt, daß die GDIs Rho-Proteine aus der Zellmembran extrahieren und deren inaktive GDP-gebundene Form im Zytosol stabilisieren. Als typische Vertreter seien hier LyGDI und D4GDI genannt (Bourne et al., 2000).

Die an dritter Stelle aufgeführten und ebenfalls inhibitorisch wirksamen Regulationsproteine sind die “GTPase-activating proteins” (GAPs). Diese Proteine stimulieren die GTPase-Aktivität der Rho-Proteine um das 10^5 -fache und beenden so den aktiven Zustand der Rho-Proteine. Als Beispiele seien hier Bcr und Abr erwähnt, die jedoch v. a. auf Rac und Cdc42 wirken (Ridley,

1995). Eine schematische Darstellung der beschriebenen Phänomene bietet die Abbildung 2-5.

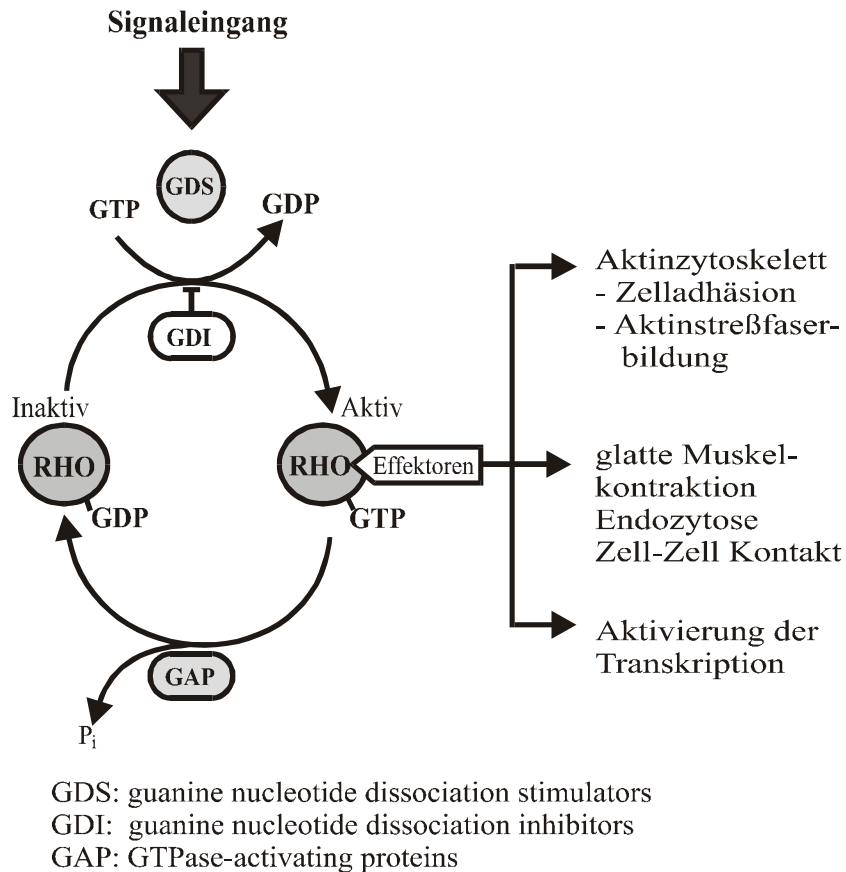


Abb. 2-5: Aktivierende und hemmende Regulationsproteine der kleinen GTP-ase Rho

2.6.2 KASKADENARTIGE AKTIVIERUNG VON RHO DURCH CDC42 UND RAC

Die Forschungsgruppe um Alan Hall fand heraus, daß die Mikroinjektion von V12Cdc42 in 3T3 Fibroblasten die Ausbildung von fingerartigen Aktin-

strukturen sogenannten Filopodien und eine Aktivierung von Rac und Rho nach sich zieht. Nach der Mikroinjektion von konstitutiv aktivem V12Rac konnte die Bildung von Aktin-ruffles (Lamellopodien) und die Rho-Aktivierung nachgewiesen werden, jedoch hatte die Mikroinjektion von V12Rac keine Aktivierung von Cdc42 zur Folge. Die Behandlung der Zellen mit V12Rho in der gleichen Art und Weise brachte schließlich zwar die Bildung von Aktin-Streßfasern, aber weder die Aktivierung von Rac noch von Cdc42 mit sich. Diese Beobachtungen ließen den Folgeschluß zu, daß in vivo aktivierte Cdc42 in der Lage ist, über eine Art Kaskade Rac und danach auch Rho in den aktiven Zustand zu versetzen.

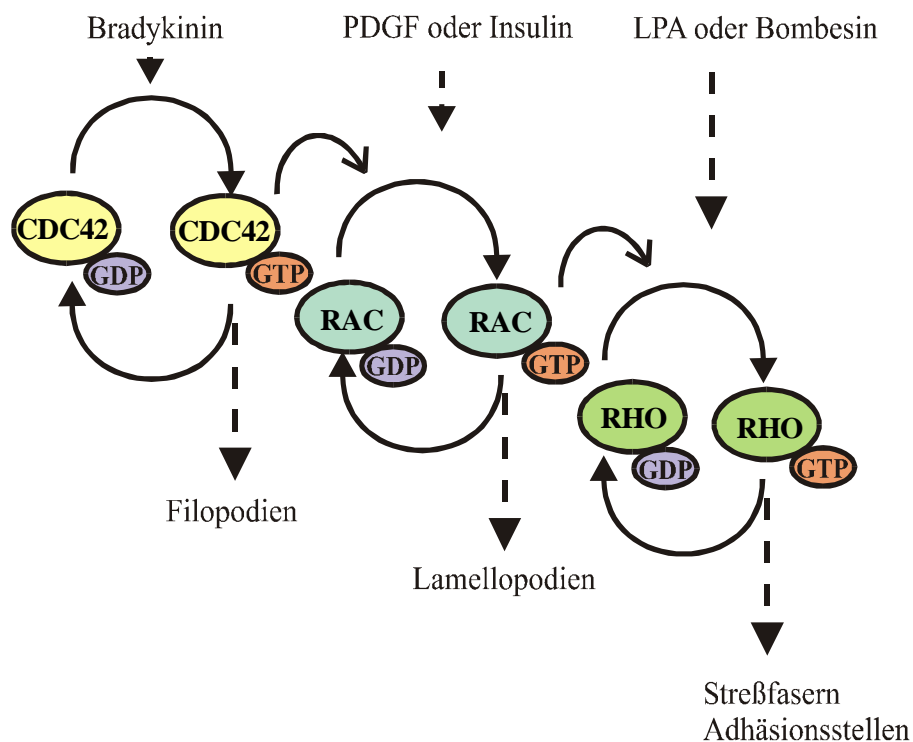


Abb. 2-6: Kaskadenartige Aktivierung der kleinen GTPasen Cdc42, Rac und Rho

Neben den erwähnten internen Stimuli, welche diese Reaktionskaskade in Gang setzen können, gibt es eine Reihe von externen Stimuli wie z. B. Bradykinin, Insulin oder Lysophosphatidsäure (LPA), die ebenfalls als Auslöser dieser Reaktionskette dienen können (Nobes und Hall, 1997). Die Abbildung 2-6 gibt einen Überblick über die beschriebenen Reaktionen.

2.7 HEMMUNG UND AKTIVIERUNG VON RHO DURCH BAKTERIELLE TOXINE

Die kleine GTPase Rho dient vielen bakteriellen Toxinen als intrazellulärer Angriffspunkt (Fiorentini et al., 1997). So ist das Rho-Protein nicht nur als molekularer Schalter und Regulator des Aktin-Zytoskeletts von größtem Interesse, sondern auch als Substrat von bakteriellen Toxinen. Diese Toxine können in eine Rho-hemmende und eine Rho-aktivierende Gruppe eingeteilt werden.

2.7.1 DIE HEMMUNG VON RHO DURCH DIE C3-TRANSFERASE AUS *C. BOTULINUM* UND DURCH DIE TOXINE A UND B AUS *C. DIFFICILE*

Die Bakterien der Spezies *C. botulinum* produzieren ein Exoenzym, die C3-Transferase, welche RhoA, B und C an der Aminosäure Asparagin 41 ADP-ribosyliert (Aktories et al., 1989). Diese sterische Veränderung in der sogenannten Effektorregion durch die Rho mit seinen Substraten in Wechselwirkung tritt, gilt als ein Erklärungsansatz für die Hemmung der Rho-Aktivität (Aktories et al., 2000). Die C3-Transferase gelangt durch einen Endozytosemechanismus in die Zellen. Die Mikroinjektion der C3-Transferase in unterschiedliche Zelllinien, wie z. B. 3T3- oder Vero-Zellen, hat den vollständigen

Verlust der Aktin-Strebfaserbildung (Chardin et al., 1989), sowie der fokalen Adhäsionsstellen zu Folge (Ridley und Hall, 1992).

Weitere Rho-hemmende Toxine sind die von *C. difficile* synthetisierten Toxine A und B. Der Erreger *C. difficile* gilt als verursachender Keim der Antibiotika-assoziierten pseudomembranösen Kolitis. Man weiß, daß verschiedene Antibiotika v. a. Clindamycin, die physiologische Darmflora stören und es so zum Überwachsen mit *C. difficile* und durch das *C. difficile* Toxin zum Ausbruch dieser sehr ernst zu nehmenden Erkrankung kommt. Es ist seit langem bekannt, daß die Toxine A und B aus *C. difficile* auf molekularer Ebene eine spezifische Wirkung auf das Aktin-Zytoskeletts haben (Ottlinger und Lin, 1988). Die Beobachtung, daß die *C. difficile* Toxine das Laufverhalten von Rho-Proteinen in der SDS-Gelelektrophorese veränderten, ließ vermuten, daß diese GTP-bindenden Proteine eine kovalente Modifikation durchmachen. Mittels der massenspektrometrischen Analyse ließ sich dann auch eine Massenzunahme von Rho um 162 Da nachweisen, was stark auf die Modifikation durch eine Hexose hindeutet. Der Wirkmechanismus, durch welchen die Toxine A und B die kleine GTPase Rho inaktivieren, ist eine Monoglykosylierung der Rho-Proteine, spezifisch an Threonin 37. Im Gegensatz zur oben erwähnten C3-Transferase, welche nur RhoA, B und C ADP-ribosyliert, glykosylieren die Toxine A und B aus *C. difficile* neben Rho auch Rac und Cdc42 (Aktories et al., 2000). Zur Verdeutlichung siehe die folgende Abbildung 2-7.

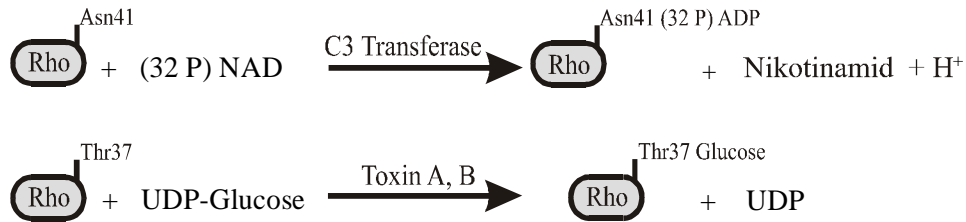


Abb. 2-7: ADP-Ribosylierung von Rho durch die C3-Transferase aus *E. coli* und Glukosylierung von Rho durch die Toxine A und B aus *C. difficile*

2.7.2 DIE AKTIVIERUNG VON RHO DURCH DNT, CNF UND PMT

Die Arbeitsgruppe um Horiguchi forschte nach den biochemischen Mechanismen und den morphologischen Veränderungen von Zellen nach Inkubation mit dermonekrotisierendem Toxin (DNT), welches aus *B. bronchiseptica* gewonnen wurde. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß DNT die Streßfaserbildung und die Entstehung fokaler Adhäsionsstellen durch einen Rho-abhängigen Signaltransduktionsweg hervorruft (Horiguchi et al., 1995).

Die Inkubation von Zellen mit dem "cytotoxic necrotizing factor" (CNF) aus *E. coli* zieht ebenfalls die typischen zellmorphologischen Veränderungen nach sich, wie sie nach Aktivierung von Rho typisch sind. Das erklärt sich durch die Tatsache, daß CNF1 den Glutaminrest 63 von Rho deaminiert und so die GTPase durch Hemmung der intrinsischen GTPase-Aktivität in ihren aktiven Zustand versetzt wird (Schmidt et al., 1997; Flatau et al., 1997). Zusammenfassend kann gesagt werden, daß CNF1 und DNT als zytosolisch wirkende Toxine mit dem intrazellulären Zielprotein Rho agieren und dann die Modifikation und Aktivierung von Rho bewirken.

Ein weiteres Rho-aktivierendes Toxin ist PMT. Untersuchungen zur Wirkung von PMT auf die endotheliale Barrierefunktion *in vitro* ist Thema der vorliegenden Arbeit. Es wurde im Verlauf dieser Arbeit von anderen gezeigt, daß PMT Rho indirekt, wahrscheinlich über die Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins, aktiviert (Wilson et al., 1997). Die genauere Betrachtung der biochemischen Stoffwechselwege nach PMT-Stimulation, d. h. der mit Rho interagierenden Proteine Rho-Kinase und Myosin-Leichtkettenphosphatase ist im Ergebnisteil der Arbeit nachzulesen.

3. ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die morphologischen und biochemischen Auswirkungen von PMT auf venöse Endothelzellen untersucht.

In einem vorangegangenen Forschungsprojekt unserer Arbeitsgruppe, bei dem die Auswirkung der Stimulation mit Thrombin auf Endothelzellen im Vordergrund stand, konnte gezeigt werden, daß Thrombin die Rho/Rho-Kinase aktiviert und daraus eine Inaktivierung der MLC-Phosphatase in den Endothelzellen resultiert. Durch die C3-Transferase konnte dieser Schritt verhindert werden, und so durch Hemmung der Proteinphosphatase 1-Inaktivierung (PP1), die durch Thrombin induzierte MLC-Phosphorylierung und die daraus resultierende Zellkontraktion, sowie eine Erhöhung der endothelialen Permeabilität gehemmt werden (Essler et al., 1998). Die Hemmung der PP1 erhöht die MLC-Phosphorylierung und die sich anschließende Zellkontraktion (Verin et al., 1995). Durch die Mikroinjektion von aktiver PP1 wird die MLC-Phosphorylierung und die Aktin/Myosin-Interaktion verhindert (Fernandez et al., 1990). Siehe Abbildung 3-1.

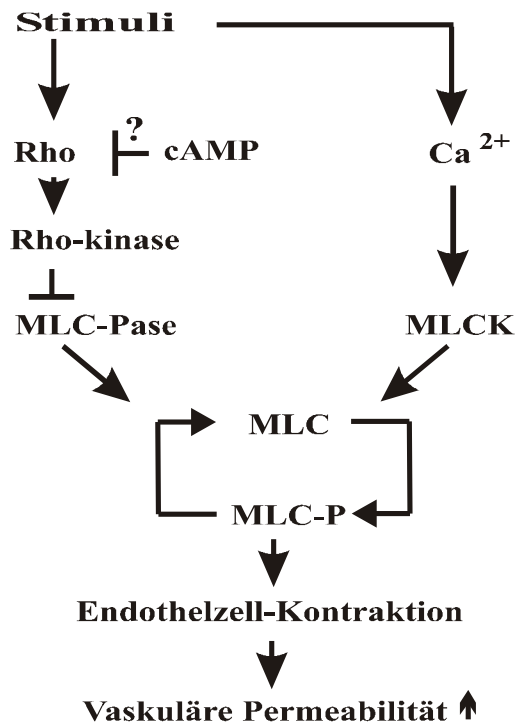


Abb. 3-1: Signalübertragung und Kontrolle der MLC-Phosphorylierung in EC über die Rho/Rho-Kinase und die MLCK

Nach der Erforschung dieses komplexen Signalweges war es nun interessant herauszufinden, wie die Endothelzellen auf das Einwirken eines bakteriellen Toxins, welches intrazelluläre Signalwege, die mit Rho-GTPasen assoziiert sind, reagieren würden. Wie in der Einleitung bereits angesprochen, wird das Verständnis über die Wirkungen bakterieller Toxine auf den menschlichen Körper immer wichtiger, zum Beispiel um den rasant zunehmenden Antibiotikaresistenzen entgegenzuwirken. Immer spielt bei solchen grundlagenorientierten Fragestellungen auch der Erkenntnisgewinn über zelluläre Funktionen eine Rolle.

Die folgenden Fragen sollen nacheinander beantwortet werden:

1. Welche morphologischen und zytoskelettalen Veränderungen werden durch PMT in venösen Endothelzellen induziert?
2. Ist an den PMT-Wirkungen die GTPase Rho beteiligt?
3. Welche molekularen Mechanismen der Zellkontraktion werden durch Rho reguliert? Spielen die Rho-Kinase und die Phosphorylierung von Myosin dabei eine Rolle?

4. MATERIAL

4.1 CHEMIKALIEN UND TECHNISCHE GERÄTE

Acrylamid/ bis-Acrylamid	Biomol
Amicon Centricon-30R concentrator	Amicon, Beverly
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Anti-Maus-IgM	Amersham, Arlington Heights
Anti-MLC-IgM-AK	Dianova, Hamburg
Anti-PP1-AK	Dianova, Hamburg
Anti-Ratten-IgG	Dianova, Hamburg
Anti-Ratten-IgG-AK	Dianova, Hamburg
Aprotinin	Boehringer, Mannheim
β -Mercaptoethanol	Boehringer, Mannheim
Caffeine	Calbiochem, Bad Soden
Deckgläschen	Eppendorf, Hamburg
Densitometer von Sharp XL-325 mit Image Master Software	Sharp, USA
DDT (Dithiothreitol)	Merck, Darmstadt
ECL Western Blotting detection reagens	Amersham, Arlington Heights
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Boehringer, Mannheimer
EGM (endothelial growth medium)	Promo cell, Heidelberg
Endothelzell-Wachstumssupplement	Promo cell, Heidelberg
FCS (fetales Kälberserum)	Sigma, Deisenhofen
Falcon konische Zentrifugenröhrchen	Beckton Dickinson
Guaiacol	Calbiochem, Bad Soden
Glutathion-S-Sefarosebeads	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
Glycin (Puffersubstanz)	Pharmacia, Freiburg
Haereus sepatech, Omnifuge	Heareus
HRP (Meerrettichperoxidase;	

0,34 mg/ml; IV-A-type; 44,000 Mr)	Sigma, Deisenhofen
Kodak T-Max 400 Filma	Eastman Kodak, Rochester
Kodak X-OMAT-Filme	Eastman Kodak, Rochester
KT 5926	Calbiochem, Bad Soden
Labsonic U Sonicator	B. Braun AG, Melsungen
LB-Medium Bio101	Vista, CA
Leica RBM 3 Fluoreszenzmikroskop	Bemsheim, Deutschland
Leupeptin	Boehringer, Mannheim
Lochplatte für 24 Polyethyleneinsätze	Beckton Dickinson
Luminol-Lösung	Pierce
Magnetrührer	Jahnke & Kunkel KG, Staufen
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
Mikropipetten (0.01-1000 µl mit Einmal spitzen)	Eppendorf, Ismanning
Mini-Gelsystem	Biorad
Moviol	Calbiochem, Bad Soden
NaCl	Merck, Darmstadt
p-Aminobenzamidinbeads	Sigma, Deisenhofen
PBS (Phosphate buffered Saline)	Sigma, Deisenhofen
Pefablock	Boehringer, Mannheim
Pepstatin	Boehringer, Mannheim
Polyethyleneinsätze für Zellkulturen mit einer Porengröße von 3µm	Beckton Dickinson
PP1 a-Isoform	Calbiochem, Bad Soden
P-Phenylenediamine	Sigma, Deisenhofen
Protein Assay Kit	Pierce, Rockford
Protein Assay System	GIBCO
Proteinmarker für SDS-Page	Novex, San Diego
Proteinphosphatase Assay System	Life Technologies, Gaithers- burg
Rhodamin Phalloidin	Molecular Probes, Oregon
rPMT	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure 37% rauchend	Merck, Darmstadt
SDS (Sodecylsulfat Natriumsalz)	Bio Rad
Spectrophotometer UVICON 930	Kontron Instruments, USA

Tautomycin	Calbiochem, Bad Soden
TBS (Tris-gepuffertes Salz)	Sigma, Deisenhofen
TCA (Trichloressigsäure)	Sigma, Deisenhofen
TEMED(N,N,N',N'-Tetramethylethylen diamin)	Sigma, Deisenhofen
Thrombin aus humanem Plasma	Boehringer, Mannheim
Tischzentrifuge (5415 C)	Eppendorf, Ismanning
Transfermembran	Millipore
Tris (Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan)	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
WallacR 1410 liquid Szintillationszähler	Wallac, Gaithersburg
Zellkulturkolben	Beckton Dickinson

Alle weiteren Materialien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von den üblichen Herstellern in höchst möglicher Reinheit bezogen.

Als Lösungsmittel dient in der Regel Aqua dest. Prozentangaben sind als w/v (Gewicht pro Volumen, 100 Prozent entsprechen 1000 g auf 1000 ml) angegeben. Die Lösungen werden in Glasgefäßen mit Hilfe eines Magnet-
rührers angesetzt und aufbewahrt.

4.2 PUFFERGEMISCHE DER EINZELNEN VERSUCHSREIHEN

4.2.1 MESSUNG DER ENDOTHELIALEN PERMEABILITÄT

Reaktionspuffer:

NaH ₂ PO ₄	50 mM
Guaiacol	5 mM

4.2.2 HERSTELLUNG REKOMBINANTER PROTEINE

Lysepuffer:

Aqua dest.	100 ml
Tris-Lsg. (pH:8,2)	5 ml
NaCl-Lsg. (3 M)	1,65 ml
MgCl ₂ (1M)	0,5 ml
DTT	15,4 ml
Leupeptin	1µg/ml
Pepstatin	1µg/ml
Aprotinin	1µg/ml

Thrombinpuffer:

Aqua dest.	100 ml
Tris-Lsg.(pH:8,2)	5 ml
NaCl-Lsg. (3 M)	5 ml
MgCl ₂ (1M)	0,5 ml
DTT	15,4 ml

4.2.3 MIKROINJEKTION

Mikroinjektionspuffer pH: 7,5

NaCl	150 mM
Tris-HCl	50 mM
MgCl ₂	5 mM

Phosphatasepuffer pH: 7,3

K ⁺ -Glutamat	100 mM
K ⁺ -Zitrat	39 mM

4.2.4 MYOSIN-LEICHTKETTEN-PHOSPHORYLIERUNG

Sample Puffer pH: 9,0

Harnstoff	6,7 M
Tris-HCl	20 mM
Glycin	22 mM
DTT	10 mM

Harnstoffgel:**Reagentien für das Sammel- bzw. Trenngel:**

Acrylamidlösung:

40%ige Lösung enthält 1,08% Bisacrylamid

12 x konzentrierter Tris-Glycin Puffer entspricht 0,24 M Tris-Glycin (29,2 g/l Tris base und 40 g/l Glycin)

Sammelgel 3,5%

Harnstoff	6 g
Tris-Glycin Puffer (pH8,2)	1,04 ml
Acrylamidlg. (40%)	1,1 ml
H ₂ O ₂	5,1 ml
TEMED	5 µl
Ammoniumpersulfat 10% frisch angesetzt	100 µl

Trenngel 10%

Harnstoff	14,4g
Tris-Glycin Puffer (pH8,2)	2,5 ml
Acrylamidlg. (40%)	7,5 ml
H ₂ O ₂	7,5 ml
TEMED	15 µl
Ammoniumpersulfat 10%	180 µl

4.2.5 MYOSINANGEREICHETERTE FRAKTION**Homogenisierungspuffer pH: 7,5**

Tris-Aminomethan	50 mM
EDTA	28 mM
Leupeptin	1µg/ml
Pepstatin	1µg/ml
Pefablock	1µg/ml
Aprotinin	1µg/ml

Salzangereicherter Puffer

NaCl	0,6 M
Tween 20	0,1%
Leupeptin	1µg/ml
Pepstatin	1µg/ml
Pefablock	1µg/ml
Aprotinin	1µg/ml

Assaypuffer pH:7,0

Tris-HCl (pH: 8,2)	50 mM
EDTA	0,1 mM
β-Mercaptoethanol	28 mM

4.2.6 MESSUNG DER MYOSINASSOZIIERTEN PHOSPHATASEAKTIVITÄT**Phosphorylierungspuffer pH: 7,0**

Tris-HCl	250 mM
MgCl ₂	16,7 mM
ATP	1,67 mM
CaCl ₂	0,83 mM
2-Mercaptoethanol	133mM

Assaypuffer pH: 7,0

Tris-HCl	50 mM
EDTA	0,1 mM
β-Mercaptoethanol	28 mM
Caffeine	6,2 mM

5. METHODEN

5.1 ZELLKULTUR VON HUVEC

Alle in dieser Arbeit aufgeführten Versuche wurden mit HUVEC (humane umbilikale venöse Endothelzellen) durchgeführt. Die Zellen wurden aus menschlichen Nabelschnüren gewonnen und nach dem Herauslösen aus den venösen Gefäßen in Zellkulturflaschen mit 75cm² Wachstumsfläche, bei 37 °C und 5% CO₂ Wasserdampf gesättigter Luft im Brutschrank inkubiert. Die Passagierung erfolgte durch zweimaliges Waschen der Zellen mit 10 ml PBS, gefolgt von der Zugabe von 4 ml Trypsin. Sobald sich die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst hatten, wurden 10 ml des Nährmediums (Gemisch aus Endothelzell-Wachstumsmedium mit 2 ml Endothelzell-Wachstumssupplement und 10% FCS zugegeben, das Gemisch mit den Zellen abpipettiert und 5 Minuten bei 20 °C auf 800 Upm in der Haereus Sepatech Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die verbliebenen Zellen mit frischem Medium wieder in Lösung gebracht. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in einer Zelldichte von 200.000 Zellen /ml auf kollagenisierte Kolben, Petrischalen oder Deckgläschen ausgesät. Das entspricht einer Zelldichte von 2×10^4 Zellen pro cm². Es folgte ein Mediumwechsel alle zwei bis drei Tage. Zur Versuchsanwendung kamen nur die Zellen, welche nach mikroskopischer Beurteilung einen konfluenten Monolayer aufwiesen, was in der Regel nach 10 Tagen der Fall war.

5.2 DIE MESSUNG DER EC-PERMEABILITÄT MIT HILFE DES MEERRETTICHPEROXIDASE-ASSAYS

Für diesen Versuchsaufbau wurden HUVEC (2×10^4 Zellen/cm²) auf speziellen, mit Kollagen beschichteten Polyethyleneinsätzen kultiviert. Der Boden dieser Einsätze besteht aus einer Porenmembran mit Poren von ca 3 µm Durchmesser. Diese Einsätze wurden in eine Platte, welche mit 24 Versuchsinsätzen ausgestattet ist, eingesetzt (siehe Abbildung 5-1).

Meerrettichperoxidase-Zugabe vor und nach Behandlung der HUVEC (siehe Text)

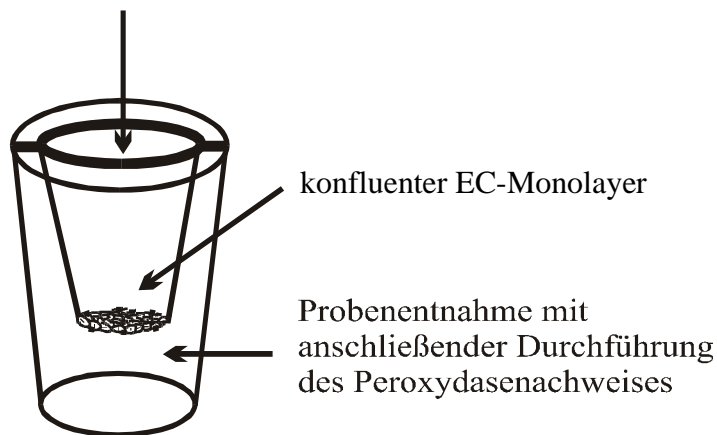


Abb. 5-1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des Meerrettichperoxidase-Versuchs

Die Endothelzellen, welche 10 Tage mit zwei- bis dreitägigem Mediuemwechsel angezüchtet wurden, konnten nach mikroskopischer Überprüfung des konfluenten EC-Monolayers zum Versuch verwendet werden. Dazu gab man in beide Kompartimente 500 µl Kulturmedium, wobei das Medium im oberen Kompartiment mit 40 ng/ml PMT versetzt war. Nach einer Inkubationszeit von

60 Minuten, wurde im oberen und unteren Kompartiment das Medium erneuert. In das untere Reaktionsgefäß gab man 500 µl neues Kulturmedium und im oberen wurde das Toxin/Mediumgemisch durch je 500 µl frisches Medium, welches 0,34 mg/ml Meerrettichperoxidase enthielt, ersetzt.

Die Probengewinnung erfolgte dann nach einer Minute, indem man 60 µl aus dem unteren Kompartiment entnahm, mit 860 µl Reaktionspuffer und 100 µl frischer H₂O₂-Lösung (0,6 mM in H₂O) versetzte. Die Auswertung erfolgte photometrisch bei 470 nm.

5.3 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG

Für den Immunfluoreszenzversuch wurden Eppendorf Deckgläschen, welche zur leichteren Orientierung unter dem Mikroskop ein feines Gitternetz eingeschliffen haben, für 24 Stunden mit 100 µg/ml Kollagen G beschichtet. Danach wurden je 2×10^4 HUVEC auf diese Deckgläschen ausgesät. Die Zellen wurden für ca. 10 Tage bei zwei- bis dreitägigem Mediumwechsel kultiviert. Um später im Immunfluoreszenzmikroskop das Aktin zu erkennen, war folgendes Procedere nötig:

Die Zellen wurden für 10 Minuten mit 3,7%igem Formaldehyd in PBS, welches 1 mM Ca⁺⁺ und 1 mM Mg⁺⁺ enthielt, behandelt und danach 5 Minuten in -20 °C kaltem Azeton permeabilisiert, bevor die Deckgläschen mit den so behandelten Zellen luftgetrocknet wurden. Anschließend wurden die Zellen für 20 Minuten mit 10 µl Rhodamin Phalloidin in 100 µl PBS in einer Feuchtkammer inkubiert, anschließend mit PBS, welches mit 2% FCS versetzt war gewaschen und schließlich in Moviolfixiert. Sämtliche beschriebene Reaktionsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die mikroskopische Beurteilung erfolgte mit dem LEICA RBM 3 Fluoreszenzmikroskop. Die Photographien wurden mit einem Kodak-T-Max 400 Film aufgenommen.

5.4 HERSTELLUNG REKOMBINANTER PROTEINE

Die rekombinante C3-Transferase, die "Rho binding domain" (RBD) und die "pleckstrin homology domain" (PH) der Rho-Kinase wurden wie bei Ridley und Hall beschrieben (Ridley und Hall, 1992) als Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase (GST-Träger) in *E. coli* exprimiert und durch Affinitätschromatographie auf Glutathion-S-Sepharose "beads" gereinigt. Der GST-Träger wurde durch Thrombin vom Fusionsprotein abgespalten. Das Thrombin wurde dann wiederum durch die Inkubation mit p-Aminobenzamidinbeads entfernt. Die genauen Herstellungsschritte waren folgende: Je eine Pipettenspitze der Bakterien (*E. coli*) wurde über Nacht in 25 ml LB-Medium, unter Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin inkubiert. Am nächsten Morgen wurde 1 Liter LB-Medium hinzugefügt und die Bakterien bis zu einer optischen Dichte von 0,3 - 0,5 bei 600 nm angezchtet (die Messung erfolgte mit dem UVICON Spectrophotometer). Nach der Induktion mit 0,5 mmol/l IPTG wurden den Bakterien erneut drei Stunden Zeit zum Wachstum gegeben. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 20 min. bei 4000 Upm mit einer HAEREUS Sepatech Zentrifuge zentrifugiert. Die "Pellets" wurden dann zweimal in PBS gewaschen, je in 10 ml Lysepuffer resuspendiert und anschließend 6 mal 10 Sekunden mit dem Labsonic U Sonicator sonifiziert. Die Lysate wurden daran anschließend 30 Minuten bei 100.000 g in der Ultrazentrifuge bei 4 °C zentrifugiert. Zu dem Überstand wurden 4 ml in

Lysepuffer äquilibrierte Glutathion-Sepharose “beads” hinzugeben. Dieses Gemisch wurde über Nacht im Kühlraum auf einem Schüttler gleichmäßig bewegt. Im nächsten Schritt wurden die “beads” für 10 Minuten bei 4000 Upm abzentrifugiert, im Anschluß daran dreimal mit 10 ml Thrombinpuffer gewaschen und erneut über Nacht im Kühlraum auf einem Schüttler mit 3 U/ml Thrombin inkubiert. Am Morgen erfolgte die erneute Zentrifugation, um im Anschluß daran die Proben für drei Stunden mit p-Aminobenzamidinbeads zu inkubieren, um das noch vorhandene Thrombin zu binden. Der Überstand, welcher nach einer erneuten Zentrifugation gewonnen wurde, enthielt schließlich die C3-Transferase, die RBD oder PH-Domäne der Rho-Kinase in einer Konzentration von 1 - 3 µg/ml. Die gewonnenen Proteine wurden bis zu ihrer Verwendung unter Zusatz von 10% Glycerol bei -80 °C eingefroren.

5.5 DIE MIKROINJEKTION

Die Mikroinjektion wurde mit Hilfe des Eppendorf Transjektors 5246 und des Eppendorf Manipulators 5171 durchgeführt.

Die Zellen wurden, wie unter 5.3 beschrieben, auf speziellen Coverslips, welche eine mikroskopisch erkennbare Gitternetzeinteilung eingeschliffen haben, gezüchtet.

Die zu mikroinjizierenden Proteine, also die RBD und die PH-Domäne der Rho-Kinase, wurden mit dem Mikroinjektionspuffer verdünnt. Die RBD wurde in einer Konzentration von 0,64 µg/µl und die PH-Domäne mit 0,96 µg/µl ins Zytoplasma der HUVEC mikroinjiziert. Die katalytische Unter-einheit der Proteinphosphatase 1 (PP1) α-Isoform wurde mit dem Phosphatasepuffer verdünnt und in einer Konzentration von 200 U/ml

mikroinjiziert. Das mikroinjizierte Volumen betrug ca. $1 - 3 \times 10^{-15}$ l pro Zelle. Die Zellen, welche mit einem der Proteine mikroinjiziert wurden, bekamen mit dem gleichen Puffer auch Ratten-IgG in einer Konzentration von 5 mg/ml injiziert. So waren sie dann nach Färbung mit FITC-konjugiertem anti-Ratten-IgG wieder aufzufinden. Auf den mit einem Gitternetz eingeschliffenen Coverslips, waren bei genauer Dokumentation die mikroinjizierten Zellen leicht aufzufinden. Für jedes der Experimente wurden mindestens 100 Zellen mit dem Protein mikroinjiziert und mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

5.6 DIE PHOSPHORYLIERUNG DER MYOSIN-LEICHTKETTE

Die Myosinleichtkettenphosphorylierung, d. h. die mono- bzw. diphosphorylierte Form wurde mit Hilfe eines speziellen Harnstoffgels aufgetrennt und analysiert (Daniel und Sellers, 1992).

Als Versuchszellen dienten wieder HUVEC, welche in Zellkulturkolben gezüchtet wurden. Durch die Zugabe von Thrombin wurden die Zellen stimuliert und die Reaktion nach 1 Minute durch die Zugabe von 1,5 ml eiskaltem 10%igem TCA (Trichloressigsäure) abgestoppt. Die Zellen wurden im Anschluß daran aus dem Kolben entnommen und für zwanzig Minuten bei 14.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen. Die verbliebenen "Pellets" wurden mit destilliertem Wasser gewaschen, um die TCA zu entfernen und dann schließlich in 1,5 ml "sample"-Puffer gelöst. Die einzelnen Proben wurden dann auf das vorbereitete Harnstoffgel aufgetragen, das 45 Minuten an eine Spannung von 9 mA angeschlossen wurde. Dann wurden die Proteine für 1,5 Stunden auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membranen wurden über Nacht mit einem anti-MLC-IgM-Antikörper,

welcher im Verhältnis 1:100 mit TBS und 0,3%igem Tween gemischt war, inkubiert. Im Anschluß fanden drei Waschschritte statt, bevor die Membran für eine Stunde mit dem anti-Mause-IgM-Antikörper, welcher im Verhältnis 1:500 mit TBS gemischt war, inkubiert wurde. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die Membran 30 Minuten lang mit Meerrettichperoxidase, welche mit TBS im Verhältnis 1:1000 gemischt wurde, inkubiert. Anschließend konnte die Membran mit einer Luminol-Lösung entwickelt und auf einen Kodak X-OMAT Film belichtet werden.

Die Versuchsauswertung erfolgte mittels einer quantitativ densitometrischen Methode, d. h. daß die un-, mono- bzw. diphosphorylierte MLC, welche mit dem anti-MLC-Antikörper reagiert hatte, genau quantitativ erfaßt wurde. Das erfolgte mit Hilfe des Sharp XL-325 Densitometers und der Pharmacia Image Master Software unter Verwendung der Formel: $P1 + 2 \times P2 / P0 + P1 + P2$.

P0, P1 und P2 sind je die un-, mono- bzw. diphosphorylierten Formen der MLC.

5.6.1 DURCHFÜHRUNG DES HARNSTOFFGELS

Es werden Gele mit 10%igem Trenngel und 3,5%igem Sammelgel gegossen, wobei durch die Änderung des pH-Wertes zwischen Sammel- und Trenngel eine besonders gute Auflösung der Proben erreicht wird. Die unter 4.2.4 angegebenen Mengen werden für ein 1 mm dickes Gel benötigt. Um die Trennlinie zwischen den einzelnen Schichten möglichst glatt zu bekommen, muß vorsichtig etwas Aqua dest. auf die jeweilige Schicht gegeben werden. Vor dem Gießen der nächsten Schicht wird das Aqua dest. wieder abgegossen. Die Proben können nun aufgetragen werden und unter einer Spannung von 9 mA werden die Proteine nach Molekülmassen aufgetrennt.

5.7 PRÄPARATION DER MYOSINANGEREICHERTEN FRAKTIONEN

Die Präparation der myosinangereicherten Fraktionen wurde wie bei Verin beschrieben durchgeführt (Verin et al., 1995). Zunächst wurden HUVEC in Zellkulturkolben mit 100 mm Durchmesser für 10 Tage mit zwei- bis dreitägigem Mediumwechsel gezüchtet. Zur Zellgewinnung wurden die dichten Monolayer zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, gefolgt von der Zugabe von 200 µl Homogenisierungspuffer. Das gewonnene Lysat wurde dann bei -80 °C inkubiert, mit einem Schaber vom Zuchtgefäßboden abgelöst und durch 5- bis 10maliges Aufziehen mit einer Spritze homogenisiert. Anschließend wurden die Homogenisate für eine Stunde bei 4 °C mit einem stark mit Salzen angereicherten Puffer behandelt und dann für 30 Minuten bei 4 °C und 4.500 g zentrifugiert. Das behandelte Lysat wurde nun 10 mal mit einem speziellen Assaypuffer verdünnt und für 30 Minuten bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert.

Das nun entstandene "Pellet" wurde in 10 µl des salzreichen Puffers gelöst. Diese myosinangereicherte Zellfraktion enthält vor allem PP1- und nahezu keine PP2-Aktivität (Verin et al., 1995). Um sicher gehen zu können, daß in den gewonnenen Proben gleiche Mengen PP1 vorhanden sind, wurde ein Western Blot mit anti-PP1-Antikörpern durchgeführt. Im folgenden Schema ist dieser Präparationsablauf schematisch skizziert.

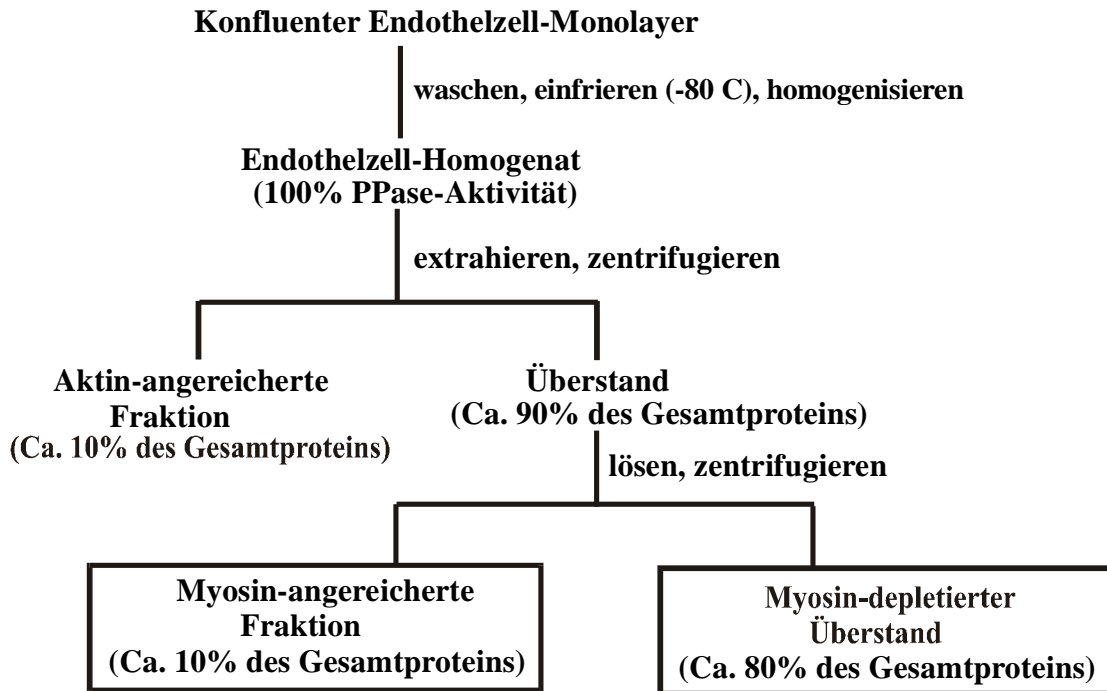


Abb. 5-2: Präparation der myosinangereicherten Fraktion

5.8 MESSUNG DER PHOSPHATASEAKTIVITÄT

Um die myosinassoziierte Phosphataseaktivität in den oben beschriebenen myosinangereicherten Fraktionen zu messen, wurde das Protein-Assay-System von GIBCO nach den Empfehlungen des Herstellers benutzt. Dieses System basiert auf einer Methode, welche bei Chisholm und Cohen 1988 beschrieben ist (Chisholm und Cohen, 1988).

Vereinfacht funktioniert der Assay folgendermaßen:

Phosphorylase b wird in einer Konzentration von 0,1 mM in vitro durch eine Phosphorylase-Kinase in einer Konzentration von 0,1 mg/ml in Anwesenheit

von c^{32} -P-ATP (5mCi/ml) für eine Stunde bei 30 °C phosphoryliert. Diese Reaktion wird mit 90%iger Ammoniumpersulfatlösung bei 4 °C, anschließender einstündiger Inkubation auf Eis und 10minütiger Zentrifugation bei 12.000 g gestoppt. Das "Pellet" wird dann resuspendiert und viermal mit der Ammoniumpersulfatlösung gewaschen. Das Protein wird mit Hilfe des Amicon Centricon-30^R concentrators in die endgültige Konzentration von 3 mg/ml gebracht. Die Phosphataseaktivität konnte über die Radioaktivität und die Zerfallsgeschwindigkeit der mit c^{32} -P-markierten Phosphorylase gemessen werden. Zu diesem Zweck war die myosinangereicherte Fraktion mit 30 µl Assaypuffer verdünnt und mit 20 µl des radioaktiven Substrates gemischt worden. Die Reaktion lief 10 Minuten lang bei einer Temperatur von 30°C ab und wurde dann mit eiskalter 20%iger TCA gestoppt. Schließlich wurden die gewonnenen Proben für zehn Minuten auf Eis inkubiert und für drei Minuten bei 12.000 g zentrifugiert. Die zurückbleibende Radioaktivität wurde mit Hilfe des Wallack^R1410 liquid Szintillationszählers gemessen und in einer Grafik skizziert.

6. ERGEBNISSE DER FORSCHUNGSARBEIT

6.1 ETABLIERUNG DES PERMEABILITÄTSASSAYS

Der genaue Versuchsaufbau dieses Assays ist unter dem Gliederungspunkt 5.2 dargestellt. Die Ergebnisse sind im Folgenden beschrieben.

6.1.1 PMT ERHÖHT DIE ENDOTHELIALE MONOLAYERPERMEABILITÄT ÜBER EINEN RHO-ABHÄNGIGEN MECHANISMUS

Der Einfluß von PMT auf die Permeabilität des Endothels wurde mit Hilfe eines “Transwell Assays” in vitro untersucht. Mittels dieses Assays wurde versucht, die zelluläre Auskleidung von Blutgefäßen zu simulieren (Details siehe unter Gliederungspunkt 5.2). Dieser Assay erlaubt zwar nicht zwingend Rückschlüsse auf die in vivo vorliegenden Bedingungen, ist allerdings zur Untersuchung von Signalwegen, die zur Änderung der endothelialen Permeabilität führen, sehr brauchbar. Weiter muß eingeräumt werden, daß mit diesem Assay die Permeabilität niedermolekularer Substanzen nicht untersucht werden kann.

Zunächst wurde als Kontrolle die Diffusion von Meerrettichperoxidase durch einen konfluenten Endothelzellmonolayer, der sich auf einer mit Kollagen beschichteten Porenmembran befand, gemessen. Die photometrische Auswertung ergab unter diesen Bedingungen eine sehr geringe Durchgängigkeit des Monolayers für die Meerrettichperoxidase.

Nach einstündiger Stimulation der Zellen mit PMT (40 ng/ml) konnte eine um das zehnfache angestiegene Diffusion ermittelt werden (siehe Abbildung 6-1). Um die Beteiligung von Rho bei diesem Effekt zu untersuchen, wurden die Endothelzellen in einem weiteren Versuch 24 Stunden lang mit dem spezifischen Rho-Inhibitor, der C3-Transferase aus *C. botulinum*, in einer Konzentration von 5 µg/ml inkubiert. Die Behandlung mit C3-Transferase alleine hatte keinen Effekt auf die Permeabilität (wie in der Abbildung 6-1 veranschaulicht). Der zuvor beschriebene PMT-induzierte Permeabilitätsanstieg konnte aber durch die C3-Behandlung nahezu vollständig aufgehoben werden. Eine frühere Arbeit unserer Forschungsgruppe zeigte, daß unter diesen Bedingungen 70 - 80% des vorhandenen RhoA in den Endothelzellen ADP-ribosyliert wird (Aepfelbacher et al., 1997).

Da bereits bekannt war, daß Rho mittels Rho-Kinase die MLC-Phosphatase inaktivieren kann (Kimura et al., 1996) und falls dieser Mechanismus für unser System ebenfalls von Bedeutung ist, dann sollte Tautomycin (ein PP1-Hemmstoff), die durch C3-Transferase blockierte Hemmung der PP1-Aktivität unterbinden. Die Konsequenz daraus wäre, daß der PMT-Effekt in den mit C3-Transferase behandelten Zellen durch Zugabe von Tautomycin wiederhergestellt werden kann. Dazu wurde die Diffusion von Meerrettichperoxidase durch den Zellmonolayer gemessen, welcher mit C3-Transferase vorinkubiert und dann mit PMT und Tautomycin für 15 Minuten in einer Konzentration von 6 µM behandelt wurde. C3-Transferase in Kombination mit Tautomycin, C3-Transferase allein oder Tautomycin allein (nicht gezeigt), hatten keinen Effekt auf die Monolayerpermeabilität. Das Ergebnis war, daß - wie vorher abgeleitet - in den Endothelzellen, welche mit C3-Transferase und PMT vorinkubiert

wurden, der PMT-Effekt durch Tautomycin fast wiederhergestellt werden konnte.

Diese Daten legen den Schluß nahe, daß PMT die endotheliale Permeabilität durch die Aktivierung von Rho und durch die Hemmung der PP1M-Aktivität steigern.

Die beschriebenen Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 6-1 veranschaulicht.

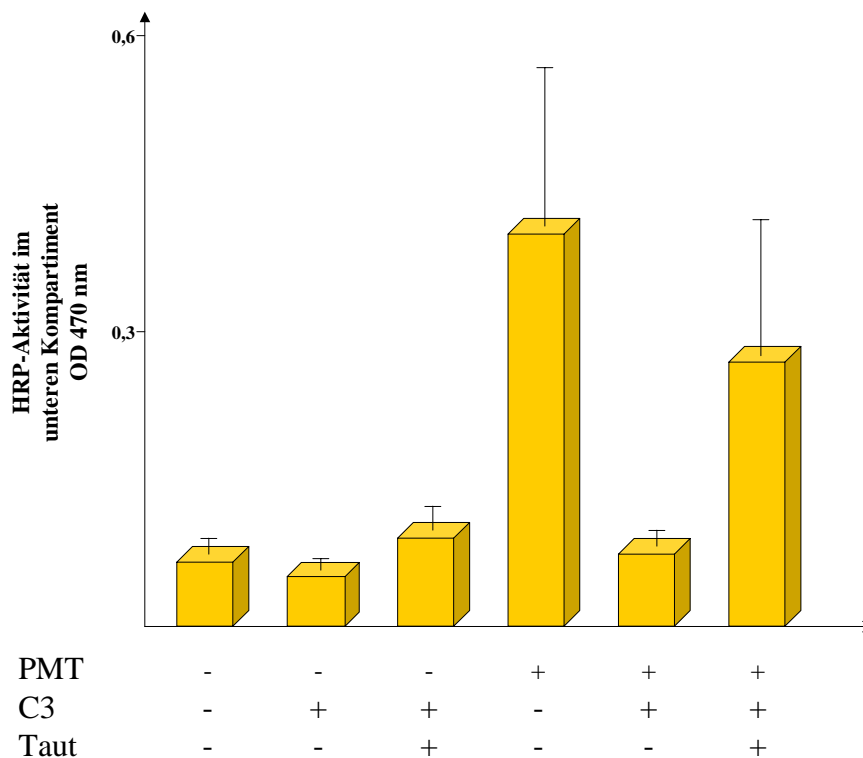


Abb. 6-1: Ergebnisse des Meerrettichperoxidaseassays

PMT erhöht die Permeabilität. HUVEC wurden nicht vorbehandelt oder mit den angegebenen Substanzen vorbehandelt (C3-Transferase 24 h, Tautomycin (Taut) 15 min.) und dann mit PMT (1 h, 40 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurde die Durchlässigkeit des Monolayers für die Meerrettichperoxydase (HPR) bestimmt. (Siehe Methoden). Die Säulen entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von einem Experiment mit Vierfach-Proben.

6.2 PASTEURELLA MULTOCIDA TOXIN FÜHRT ZU DER RHO-ABHÄNGIGEN STREİFASERBILDUNG

Nach dem oben dargestellten zellbiologischen Weg der PMT-Wirkung auf das Endothel wurde versucht, die oben aufgestellte Hypothese durch Mikroinjektion von Rho- und Rho-Kinase-Hemmstoffen weiter zu untermauern.

Dazu wurde mittels einer Färbung mit Rhodamin Phalloidin das Aktinzytoskelett von HUVEC im Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Die Bilder 1 und 2 zeigen Kontrollzellen, bei denen das Aktin v. a. an den Zellgrenzen als peripherer Ring, der die Zelle markiert, zur Darstellung kommt. Die Monolayer der Zellen, welche mit C3-Transferase behandelt waren, unterscheiden sich insofern von der Kontrolle, als daß nun der Aktinring deutlich dünner als Zellbegrenzung sichtbar wurde. Jedoch war der Zellkontakt nur wenig beschädigt worden (siehe Bild 3 und 4). Nach einstündiger PMT-Inkubation waren deutliche Aktinstreifasern und interzelluläre Lücken erkennbar (siehe Bild 5 und 6). Wurden die Zellen mit C3-Transferase vorbehandelt, so konnte der PMT-induzierte Effekt der Aktin-Streifaserbildung durch die Hemmung von Rho aufgehoben werden (siehe Bild 8). Weiter konnte die Entwicklung von Riesenzellen sichtbar gemacht werden. Dafür gibt es im Augenblick noch keine Erklärung, jedoch könnte es sein, daß PMT in Kombination mit der C3-Transferase über Aktivierung der GTPase Rac einen Signalweg aktiviert, durch welchen es zu einer Zellausbreitung kommt. Dieses Phänomen ist sehr gut auf der Phasenkontrastaufnahme erkennbar (siehe Bild 7).

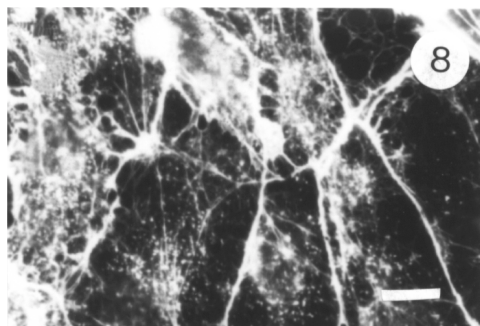
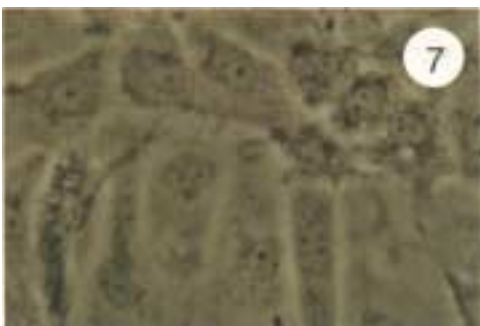
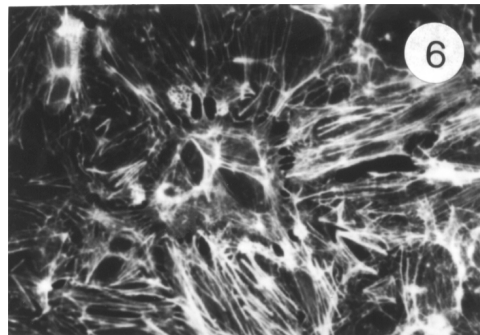
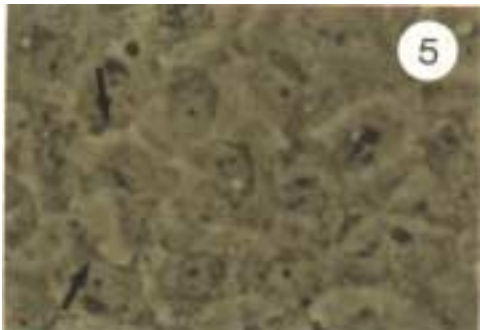
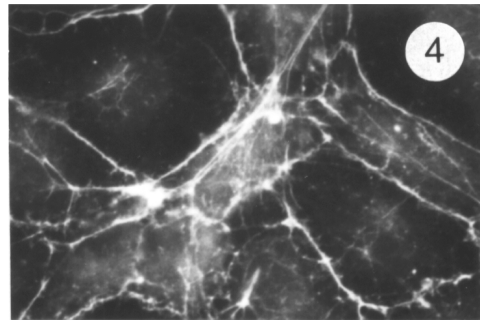
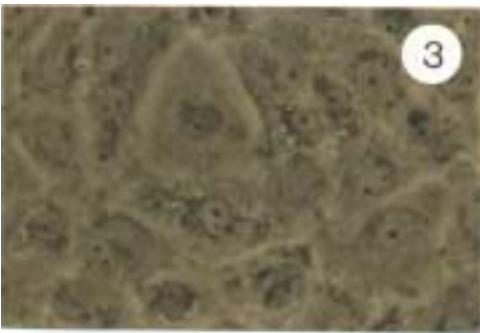
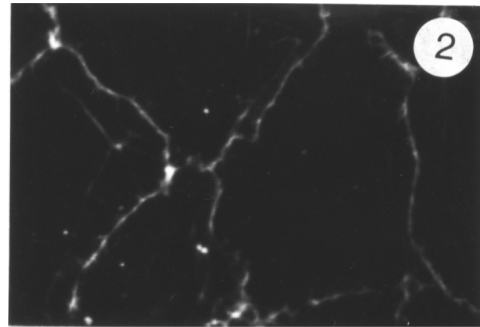
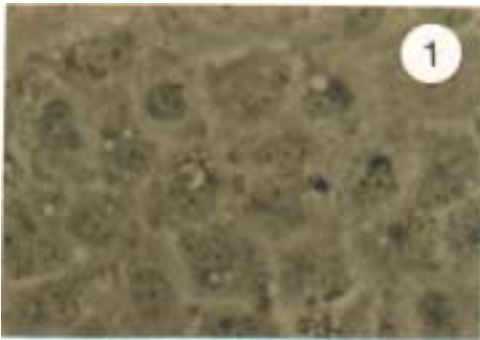


Abb. 6-2:

PMT-induzierte Lücken im Zellverband und die Aktin Umorganisation sind Rho abhängig. HUVEC, die nicht stimuliert wurden (Bild 1 und 2), mit C3-Transferase behandelt wurden (24 h, 5 µg/ml; Bild 3 und 4), mit PMT stimuliert wurden (1 h, 40 ng/ml; Bild 5 und 6), oder mit C3-Transferase vorbehandelt (24 h, 5 µg/ml) und dann mit PMT stimuliert wurden (1 h, 40 ng/ml; Bild 5 und 6). Die Bilder 1, 3, 5 und 7 sind Phasenkontrastaufnahmen. Die Bilder 2, 4, 6 und 8 sind Aktinfärbungen mit Rhodamin Phalloidin. Die Pfeile in Bild 5 deuten auf Lücken im Endothelzellverband hin. Der Balken entspricht 30 µm.

6.3 DIE AKTIN-STREßFASERBILDUNG

Um herauszufinden, ob die Interaktion von Rho mit der Rho-Kinase für die durch PMT-induzierte Streßfaserbildung nötig ist, wurde die rekombinante Rho-bindende Domäne (RBD) bzw. die “pleckstring homology” (PH)-Domäne der Rho-Kinase in einzelne Endothelzellen mikroinjiziert. Sowohl die isolierte RBD, als auch die PH-Domäne verhindern die Interaktion von Rho mit der endogenen Rho-Kinase durch Konkurrenz (Amano et al., 1997).

Das Ergebnis war, daß sowohl durch Mikroinjektion der RBD als auch der PH-Domäne die durch PMT induzierte Streßfaserbildung vollständig verhindert werden konnte (siehe Bilder 9, 10, 11 und 12). Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß durch PMT die Rho/Rho-Kinase Interaktion stimuliert wird.

Die Methode der Mikroinjektion ist im Methodenteil unter dem Gliederungspunkt 5.5 erklärt. Um eine Kontrolle zu haben, daß in die einzelnen Zellen die gewünschten Stoffe mikroinjiziert wurden, hat man mit der gleichen Injektion auch Ratten-IgG injiziert und dann mit Hilfe von FITC-konjugiertem anti-Ratten-IgG sichtbar gemacht. So und durch das eingeschliffene Gitternetz in die Deckgläschen auf denen die HUVEC gezüchtet waren, konnte man die mikroinjizierten Zellen gut wieder auffinden.

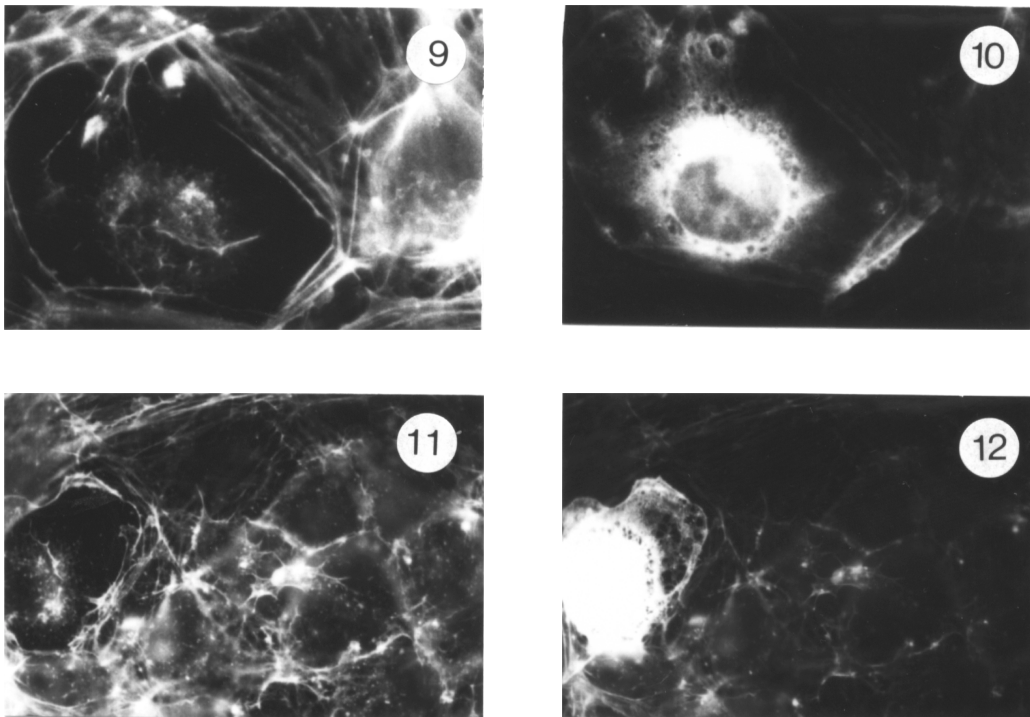


Abb. 6-3:

Die PMT-induzierte Aktin Umorganisation läuft über die Rho/Rho-Kinase und PP1. Einzelne Zellen wurden mit der RBD der Rho-Kinase (Bild 9 und 10) oder der PH-Domäne der Rho-Kinase mikroinjiziert (Bild 11 und 12) und dann mit PMT (1 h, 40 ng/ml) stimuliert. Bild 9 und 11 sind Aktinfärbungen, Bild 10 und 12 Färbungen des koinjizierten Ratten-IgGs als Injektionskontrolle.

Falls die Inaktivierung der MLC-Phosphatase durch die Rho-Kinase für die Aktin-Reorganisation durch PMT nötig ist, sollte die Mikroinjektion von konstitutiv-aktiver katalytischer Domäne der PP1, deren Aktivität nicht durch Regulationsmechanismen gehemmt werden kann, den PMT-Effekt aufheben.

Um die Rolle der MLC-Phosphatase für den PMT-induzierten Effekt auf das Aktinzytoskelett weiter zu erforschen, wurde die katalytische Domäne der MLC-Phosphatase in die Zellen mikroinjiziert und dann mit PMT stimuliert

(siehe Bild 13 u. 14). Diese Experimente zeigten, daß der durch PMT verursachte Effekt der Streßfaserbildung durch Injektion von PP1 gehemmt wird.

Insgesamt sprechen diese Ergebnisse dafür, daß PMT die MLC-Phosphatase-Aktivität in Endothelzellen durch die Rho-Kinase herabsetzt und es dadurch zu einer Phosphorylierung von MLC und der Bildung von Streßfasern kommt.

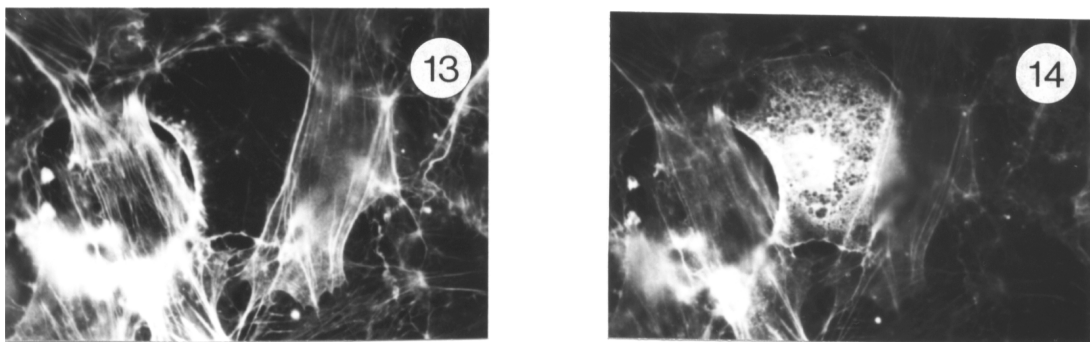


Abb. 6-4:

HUVEC, die mit PMT (40 ng/ml) stimuliert und dann mit der katalytischen Domäne der PP1 mikroinjiziert wurden (Bild 13 und 14).

Um herauszufinden, inwieweit der PMT-Effekt von der “myosin light chain kinase” (MLCK)-Aktivität abhängt, wurden Endothelzellen mit KT 5926, einem selektiven MLCK-Hemmer, vorbehandelt. Die Beobachtung war, daß die Aktin-Reorganisation durch KT 5926 verhindert werden konnte (siehe Bild 15). Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß auch eine basale MLCK-Aktivität zur PMT-induzierten Aktin-Umverteilung erforderlich ist.

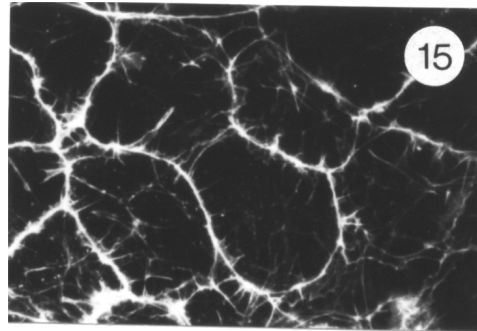


Abb. 6-5:

HUVEC, die mit dem selektiven MLCK-Inhibitor KT 5926 (24 h, 5 μ M) vorinkubiert und dann mit PMT (1 h, 40 ng/ml) stimuliert wurden (Bild 15).

Schließlich wurde die Rolle der Ca⁺⁺-Ionen in diesen komplexen Reaktionsabläufen genauer untersucht. Dazu wurden die Zellen mit BAPTA-AM, einem Ca⁺⁺-Chelator, in einer Konzentration von 400 μ M eine Stunde lang inkubiert und im Anschluß mit PMT behandelt. Dabei wurde kaum Streßfaserbildung erkennbar, und es bildeten sich nur vereinzelt intrazelluläre Lücken aus. Die durch PMT induzierte Zellkontraktion und Aktin-Reorganisation setzt also zumindest Basalwerte von Ca⁺⁺ voraus (Daten nicht gezeigt).

6.4 PMT INAKTIVIERT DIE MYOSIN-LEICHTKETTEN-PHOSPHATASE UND ERHÖHT DIE MYOSIN-LEICHTKETTEN-PHOSPHORYLIERUNG

Zunächst wurde die Modulation der Myosin-assoziierten MLC-Phosphataseaktivität durch PMT mit Hilfe des unter Punkt 5.8 beschriebenen Phosphatase-Assays untersucht.

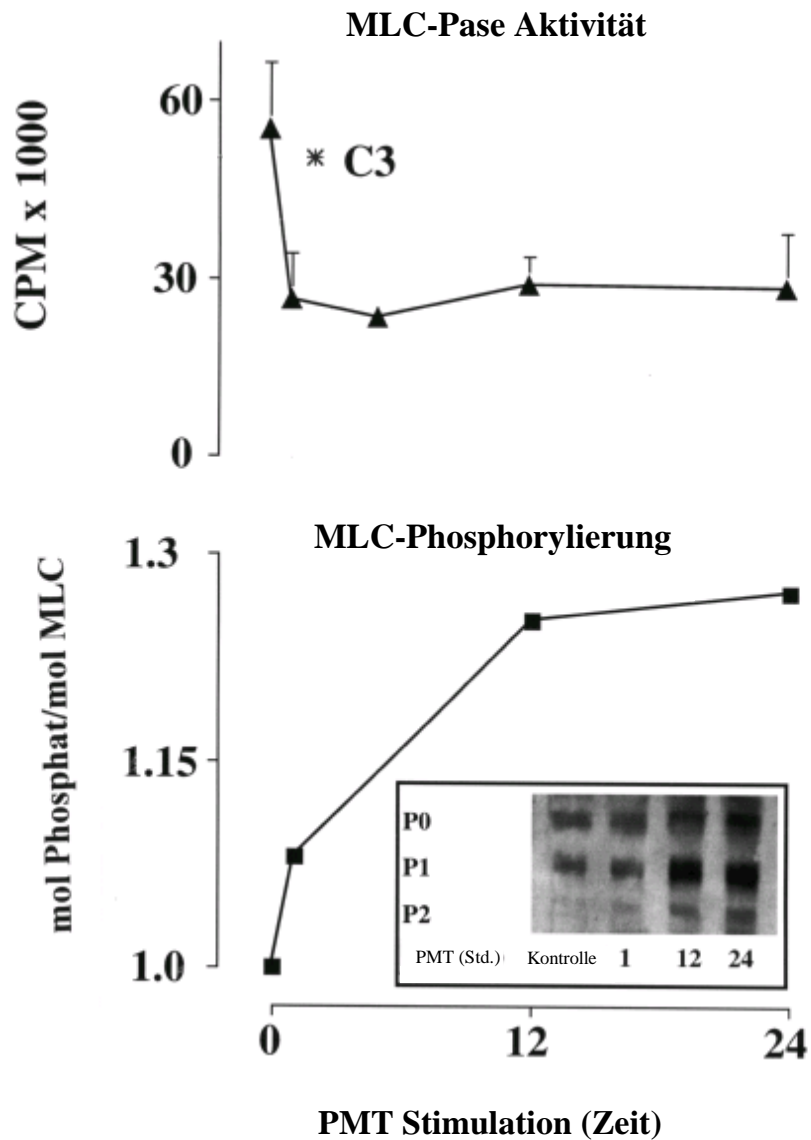


Abb. 6-6: PMT-induzierte Hemmung der Myosin-Leichtketten-Phosphatase-Aktivität und MLC-Phosphorylierung. Die Werte der MLC-Phosphatase entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von drei Experimenten. Der Unterschied zwischen dem ersten und zweiten Wert ist signifikant ($p \leq 0,05$, t-Test für verbundene Stichproben).

* C3 gibt den Wert der MLC-Pase in Gegenwart von C3-Transferase (24 h, 5 $\mu\text{g/ml}$) wieder. Die Werte der MLC- Phosphorylierung entsprechen dem Mittelwert von Dreifach-Proben eines repräsentativen Experimentes. Die Standardabweichungen sind kleiner als die Symbole.

Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 6-6 dargestellt. Die Inkubation der Zellen mit PMT für 1 - 24 Stunden in einer Konzentration von 40 ng/ml zeigt eine klare und nachhaltige Hemmung der PP1M-Aktivität. Diese Hemmung wurde bereits nach der ersten Stunde der PMT-Inkubation deutlich. Im Verlauf der nachfolgenden 23 Stunden stellte sich dann ein mehr oder weniger konstantes Niveau der Phosphatase-Aktivität ein. Wurden die Zellen jedoch mit 5 µg/ml C3-Transferase für 24 Stunden behandelt, so war die PMT-induzierte Abnahme der PP1M-Aktivität fast vollständig aufgehoben. Schlußfolgerung aus diesen Beobachtungen ist, daß PMT die PP1M in HUVEC über einen Rho-abhängigen Mechanismus inaktiviert (siehe Abbildung 6-6).

Es war bei Beginn der Arbeit bekannt, daß die Hemmung der PP1M in HUVEC einen Anstieg der Myosinleichtkettenphosphorylierung, der Zellkontraktilität und der Permeabilität zur Folge hat (Verin et al., 1995).

Um herauszufinden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Inaktivierung der PP1M durch PMT und einen Anstieg der Myosin-Leichtketten-Phosphorylierung gibt, wurden die Phosphorylierungen der Myosin-Leichtkette nach 1- bis 24stündiger PMT-Inkubation gemessen. Die unphosphorylierte, mono- bzw. diphosphorylierte Myosin-Leichtkette wurde mittels eines Harnstoffgels elektrophoretisch aufgetrennt und durch Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Anschließend wurden die Proteinbanden mit spezifischen Antikörpern, gefolgt von einer Chemolumineszenz- Detektionsmethode sichtbar gemacht. Es konnte festgestellt werden, daß schon nach einer Stunde ein Anstieg von phosphorylierten Myosin-Leichtketten nachweisbar war, der nach vier Stunden noch stärker ausgeprägt war. Nach 24stündiger PMT-Behandlung waren zweimal mehr monophosphorylierte und viermal mehr diphosphorylierte Myosin-Leichtketten als in den Kontrollzellen

densitometrisch nachweisbar. Es kann also von einer Zeitabhängigkeit zwischen der PMT-Stimulation und Myosin-Leichtketten- Phosphorylierung ausgegangen werden.

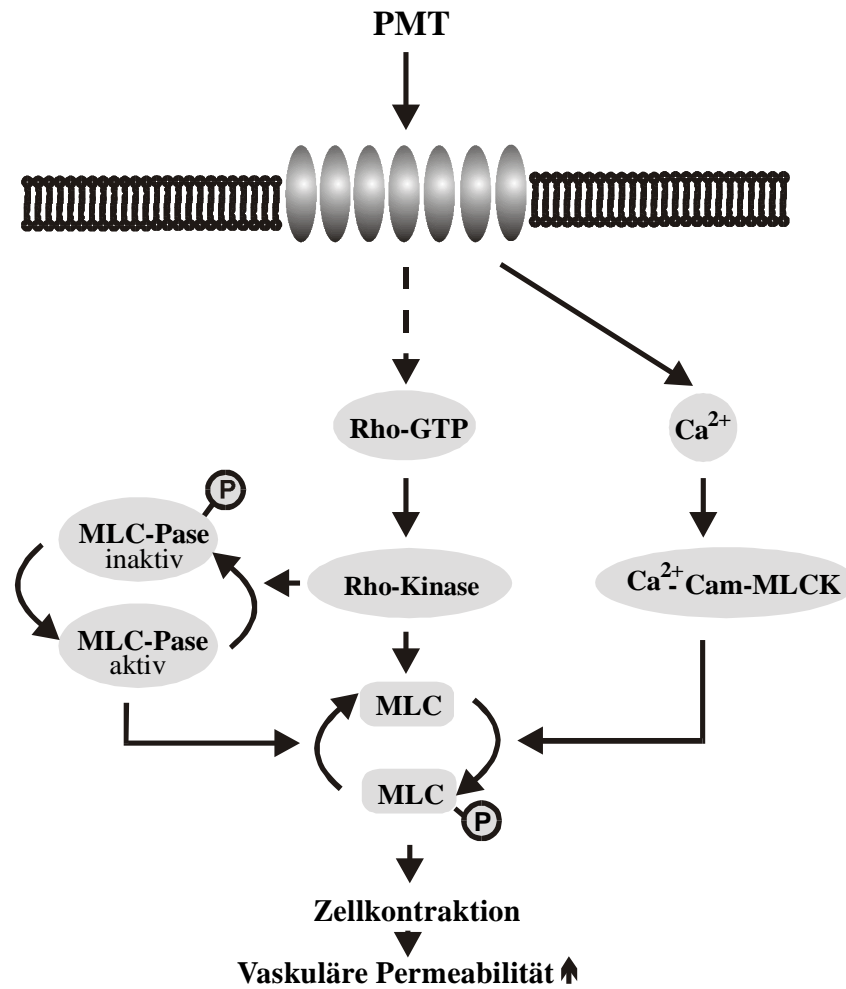
Zusammenfassend kann man sagen, daß PMT über den Rho/Rho-Kinase-abhängigen Weg die PP1M inaktiviert und es schließlich zu einem Anstieg der Myosin-Leichtketten-Phosphorylierung kommt.

7. ZUSAMMENFASSUNG DER FORSCHUNGSERGEBNISSE

Ziel der Arbeit war es, die molekularen Mechanismen zu erforschen, durch die das *Pasteurella multocida* Toxin zu einer Aktivierung von Endothelzellen mit anschließender Störung der Barrierefunktion des Endothels führt. Dafür wurden humane Endothelzellen (HUVEC) verwendet, die für Permeabilitätsmessungen auf Porenmembranen bis zur Entstehung eines dichten Monolayers kultiviert wurden. Als Maß für die endotheliale Permeabilität wurde die Durchlässigkeit des endothelialen Monolayers für Meerrettichperoxidase verwendet. Zur Sichtbarmachung des endothelialen Zytoskeletts wurden die Zellen mit Rhodamin Phalloidin gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Mit Hilfe spezifischer Hemmstoffe, die teilweise in die Zellen mikroinjiziert wurden, sowie der biochemischen Messung von Enzymaktivitäten bzw. Phosphorylierung, erhielten wir folgenden Ergebnisse:

1. Das *Pasteurella multocida* Toxin führt zu einer Erhöhung der Permeabilität des endothelialen Monolayers über einen Rho-GTPase-abhängigen Signalweg.
2. Die Stimulierung der Endothelzellen mit dem *Pasteurella multocida* Toxin führt zur massiven Bildung von Aktinstreißfasern, die von Rho, seinem Zielprotein der Rho-Kinase als auch von der MLC-Phosphatase abhängig sind. Diese morphologischen Veränderungen stellen vermutlich die Basis für die Erhöhung der endothelialen Permeabilität dar.
3. *Pasteurella mulocida* Toxin führt über Rho und mit großer Wahrscheinlichkeit auch über die Rho-Kinase zu einer Inaktivierung der MLC-Phosphatase mit anschließender Erhöhung der MLC-Phosphorylierung.

Als Ergebnis unserer Arbeiten ergibt sich ein Signalweg, in dessen Zentrum die GTPase Rho steht und dessen Details noch einmal in der Abbildung 7-1 zusammengefaßt werden.



Rho-GTP: GTP-gebundenes Rho
 Ca⁺⁺-Cam: Calciumcalmodulin
 MLC-P: phosphorylierte MLC
 MLC-Pase: Proteinphosphatase 1 (PP1)
 MLC-Pase-P: phosphorylierte PP1
 EC: Endothelzelle

Abb. 7-1: Durch PMT induzierte Signalwege der MLC-Phosphorylierung in Endothelzellen

8. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde über die Auswirkungen der Interaktion des Pasteurella multocida Toxins mit Endothelzellen (HUVEC) berichtet.

Der Ansatz zur Erforschung der durch dieses Toxin aktivierten Signalwege waren:

1. ein zellphysiologischer, mittels eines Permeabilitätassays
2. ein zellbiologischer mittels Immunfluoreszenzfärbung und Mikroinjektion und
3. ein biochemischer Ansatz, anhand eines Phosphorylierungs- und Phosphataseassays.

PMT stimuliert die Aktin-Reorganisation in HUVEC und erhöht so die Permeabilität des Endothelzellmonolayers. Es kann davon ausgegangen werden, daß durch PMT die GTPase Rho aktiviert wird und es so, vermittelt über die aktivierte Rho-Kinase, zu einer Hemmung der myosin gebundenen Leichtketten-Phosphatase (PP1M) kommt. Die Hemmung der PP1M führt zu einer Erhöhung der MLC-Phosphorylierung, weil dann eine basal immer vorhandene MLC-Kinase-Aktivität überwiegt. Es kann von einer basalen MLC-Kinase-Aktivität in nicht stimulierten Endothelzellen ausgegangen werden (Verin et al., 1995), welche z. B. durch den PMT-induzierten intrazellulären Ca^{++} -Anstieg weiter aktiviert werden könnte (Staddon et al., 1991). Diese Ca^{++} -Erhöhung ist jedoch im Vergleich zum Anstieg nach Einwirkung anderer Mediatoren, wie z. B. Histamin oder Thrombin, sehr moderat und kann mit klassischen Methoden der Messung intrazellulärer Ca^{++} -Konzen-

trationen (fura-2 Methode) nicht nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang ist bekannt, daß Thrombin über die intrazelluläre Ca^{++} -Erhöhung eine Aktivierung der Ca^{++} /Calmodulin-abhängigen MLCK verursacht. Versuchsergebnisse unserer Arbeitsgruppe zu diesem Thema zeigten, daß die Ca^{++} -Mobilisation durch Thrombin ein Maximum nach 30 Sekunden hat und sich nach 3 - 5 Minuten ein Plateau einstellt, wobei hier keine Abhängigkeit von der Rho-GTPase hergestellt werden konnte, da sich dieser Anstieg nicht durch den spezifischen Hemmstoff C3-Transferase hemmen ließ (Essler et al., 1998). Im Rahmen dieser Arbeit konnte weiter gezeigt werden, daß PMT die MLC-Phosphataseaktivität hemmt, wobei gleichzeitig eine wahrscheinlich geringe basale MLC-Kinaseaktivität, die mit Sicherheit in Abhängigkeit des Ca^{++} /Calmodulin-Komplexes steht, vorliegt.

Dies läßt sich folgern, weil Versuche mit dem spezifischen Inhibitor der MLC-Kinase (KT 5926), die Hemmung der Aktin-Reorganisation zur Folge hatten. PMT erhöht nach unseren Ergebnissen die MLC-Phosphorylierung, indem es die MLC-Phosphatase hemmt. Unter diesen Bedingungen liegt gleichzeitig eine basale MLC-Kinase-Aktivität vor und bekommt ein Übergewicht. Im Gegensatz zu dem oben erwähnten sehr schnellen Ca^{++} -Anstieg nach Stimulation von EC mit Thrombin, zieht die EC-Stimulation mit PMT einen sehr moderaten, sich über 24 Stunden erstreckenden Ca^{++} -Anstieg nach sich. (unpublizierte eigene Beobachtung). Als Schluß dieser Beobachtungen kann gelten, daß PMT die Veränderungen im Endothelzellverband durch langsame, jedoch stetige Erhöhung der MLC-Phosphorylierung bewirkt. So folgt, wie in der Abbildung 7-1 dieser Arbeit dargestellt, daß PMT die Zellretraktion und Permeabilitätserhöhung über bisher noch nicht gezeigte Signalwege bewirkt.

Die neuesten Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, daß auch Lysophosphatidsäure (LPA) die endotheliale Permeabilität über den Rho/Rho-Kinase-Signalweg steigert. Die Behandlung von EC mit LPS hat die Abnahme der MLC-Phosphataseaktivität und die Zunahme der MLC-Phosphorylierung zur Folge. Da sich diese Signalwege mit dem GTPase-Inhibitor C3-Transferase aus *C. botulinum* und dem Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 hemmen lassen, liegt der Schluß nahe, daß auch LPA die MLC-Phosphorylierung über einen Rho/Rho-Kinase vermittelten Mechanismus der Hemmung der MLC-Phosphatase reguliert. Da bekannt ist, daß LPA während der gramnegativen Sepsis die endotheliale Permeabilität steigert und so den massiven Austritt von Flüssigkeit ins Interstitium bewirkt, und es in der Folge zum kardiogenen Schock kommen kann, ist es in Zukunft vielleicht möglich, daß sich durch die medikamentöse Hemmung des Rho/Rho-Kinase-Systems eine Therapiestrategie zur Behandlung der Sepsis entwickelt (Essler et al., 2000).

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die lange bekannte Tatsache, daß die Erhöhung von cAMP auch einen vasoprotektiven Effekt hat. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe lassen vermuten, daß dieser Effekt dem nach C3-Transferase Inkubation oder nach Y-27632-Behandlung ähnelt. Das Ergebnis all dieser Arbeiten ist, daß das Rho/Rho-Kinase-System eine zentrale Rolle in der Entstehung von Gefäßschädigung durch bakterielle Toxine spielt. Dabei konnte durch uns auch gezeigt werden, daß cAMP durch die Hemmung eines Mechanismus, der in der Reaktionsabfolge vor der Aktivierung der Rho/Rho-Kinase steht, einen gefäßschützenden Effekt hat (Essler et al., 2000). Medikamente, welche cAMP erhöhen, könnten ihren vasoprotektiven Effekt also ebenfalls durch Hemmung des Rho-Signalweges ausüben.

Da die bakteriellen Toxine und ihre Auswirkungen auf menschliche Zellen, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, immer mehr Aufmerksamkeit in der Forschung erfordern, soll am Ende dieser Arbeit noch einmal darauf eingegangen werden. Das in dieser Arbeit näher erforschte und beschriebene bakterielle Toxin aus *Pasteurella multocida* scheint nach den Ergebnissen unserer und anderer Forschungsgruppen (Lacerda et al., 1996) nicht direkt Rho zu aktivieren, sondern über die Stimulation eines Signalweges, in welchem auch Rho involviert ist, zu wirken. Die Gruppe um Wilson, die an *Xenopus* Oozyten arbeiteten, spekulierte, daß PMT mit dem membranständigen Gq α reagiert, dieses aktiviert und modifiziert (Wilson et al., 1997). Gq α wiederum aktiviert die PLC- β 1, wodurch es zur Bildung von Inositol-1,4,5-triphosphat und Diacylglycerin aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat kommt. In der gleichen Studie konnte gezeigt werden, daß durch die Mikroinjektion von anti-RhoA- und anti-RhoB-Antikörpern der PMT-Effekt nicht aufgehoben werden konnte. Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß die GTPase Rho nicht an der durch PMT induzierten IP₃-Konzentrationserhöhung beteiligt ist. Dazu wurde gezeigt, daß Gq β /PLC- β oder das dadurch produzierte Phosphatidylinositoltriphosphat Rho in EC aktiviert wird, oder die Rho-Aktivierung in keinem Zusammenhang mit diesem Signalweg steht. Es konnte interessanterweise auch schon darüber berichtet werden, daß Rho durch die aktive PLC in seinen aktiven Zustand übertritt (Wilson et al., 1997).

Gleichzeitig stößt man bei weiterem Literaturstudium auf die Vermutung, daß die Rho-Aktivierung durch PMT auch über Tyrosinkinasen vermittelt sein könnte (Lacerda et al., 1996; Nobes et al., 1995 und Gohla et al., 1998). PMT könnte z. B. ein heterotrimeres G-Protein modifizieren, das zur Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors führt. Im Weiteren könnte die EGF-

Rezeptor-Tyrosinkinase zur Aktivierung von Rho führen. An der Aufklärung dieser Signalwege wird gegenwärtig intensiv von mehreren Arbeitsgruppen geforscht (Choy et al., 2000).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit über die endothelialen Auswirkungen von PMT zeigten eine zellmorphologische Veränderung von HUVEC insofern, als daß nach Inkubation mit PMT Aktinstreißfasern und intrazelluläre Lücken auftraten, welche mit großer Wahrscheinlichkeit für die Permeabilitäts-erhöhung verantwortlich sind.

Im Gegensatz zum *Pasteurella multocida* Toxin zeigen Arbeiten mit CNF oder DNT, daß diese Toxine im Gegensatz zum PMT die direkte Modifikation von Rho durch Deamidierung bewirken und als zytosolisch wirkende Toxine mit Rho reagieren (Horiguchi et al., 1995 und Schmidt et al., 1997). Interessant ist außerdem, daß bis heute noch keine Sequenzhomologie gefunden werden konnte, welche diesen drei Toxinen gemeinsam ist.

Zusammenfassend kann man sagen, daß PMT den Rho/Rho-Kinase-Stoffwechselweg aktiviert, was die Inaktivierung der MLC-Phosphatase und damit die Erhöhung der MLC-Phosphorylierung zur Folge hat. Dieser Mechanismus kann als Ursache für die Zerstörung des EC-Monolayers und die sich daraus ergebende Infektions- und Entzündungsreaktion, verursacht durch PMT, angesehen werden.

9. LITERATURVERZEICHNIS

Aelst van, L. und D´Souza-Schorey, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes & Development* 11: 2295-2322

Aepfelbacher, M., Essler, M., Huber, E., Sugai, M. und Weber, P.C. (1997). Bacterial toxins block endothelial wound repair. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1623 - 1629

Aktories, K., Braun, S., Rösener, S., Just, I. und Hall, A. (1989). The rho gene product expressed in *E. coli* is a substrate for botulinum ADP-ribosyltransferase C3. *Biochem. Res. Commun.* 158: 209 - 213

Aktories, K. (1997). Rho-Proteine: Molekulare Schalter und Substrate bakterieller Toxine; Glukosylierung von Rho-Proteinen durch *Clostridium difficile* Toxine. *DGPT-Forum* 20: 22 - 28

Aktories, K., Schmidt, G. und Just, I. (2000). Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol. Chem.* 381: 421 - 426

Aspenström, P. (1999). Effectors for the rho GTPases. *Cell Biol.* 11: 95 - 102

Bishop, A. und Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* 348: 241 - 255

Bokoch, G. und Der, C.J. (1993). Emerging concepts in the ras superfamily of GTP-binding proteins. *FASEB J.* 7: 750-759

- Bourne, H. und Danders, D. (2000). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349: 117 - 127
- Buselmaier, W. (1990). *Biologie für Mediziner*. 6. Auflage im Springer Verlag: 42 - 45
- Cerione, R. und Zheng, Y. (1996). The dbl family of oncogenes. *Cell Biol.* 8: 216 - 222
- Chardin, P., Boquet, P., Madaule, P., Popoff, M.R., Rubin, E.J. und Gill, D.M. (1989). The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by *Clostridium botulinum* exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in vero cells. *EMBO J.* 8: 1087 - 1092
- Chisholm, A.A. und Cohen, P. (1988). Identification of a third form of protein phosphatase 1 in rabbit skeletal muscle that is associated with myosin. *Biochem. Biophys. Acta.* 968: 392 - 398
- Choy, S.B., Maudsley, S., Miller, W.E., Wilson, B.A. und Luttrell, L.M. (2000). *Pasteurella multocida* toxin stimulates mitogen-activated protein kinase via G(q/11)-dependent transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 275: 2239 - 2245
- Chrzanowska-Wodnicka, M. und Burridge, K. (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J. Cell Biol.* 6: 1403 - 1415
- Daniel, J.L. und Sellers, J.R. (1992). Purification and characterisation of platelet myosin. *Methods Enzymol.* 215: 83 - 87

Darnwell, J., Lodish, H. und Baltimore, D. (1993). Molekulare Zellbiologie, de Gruyter Verlag: 234 - 238

Dickey, B.F. und Birnbaumer, L. (1992). GTPases in Biology I, 2. Auflage im Springer Verlag: 87 - 112

Elling, F., Pederson, K.B., Hogh, P. und Foged, N.T. (1988). Characterisation of the dermal lesions induced by a purified protein from toxigenic *Pasteurella multocida*. Acta. Pathol. Microbiol. Infektio. Scand. 96: 50 - 57

Essler, M., Mutsuki, A., Kozo, K., Weber, P.C. und Aepfelbacher, M. (1998). Thrombin controls myosin light chain phosphatase via rho and its target rho-kinase in human endothelial cells. J. Biol. Chem. 34: 21867 - 21874

Essler, M., Hermann, K., Mutsuki, A., Kaibuchi, K., Heesemann, J., Weber, P.C. und Aepfelbacher, M. (1998). *Pasteurella multocida* toxin increases endothelial permeability via rho kinase and myosin light chain phosphatase. J. Immunol. 161: 5640 - 5646

Essler, M., Weber, P.C. und Aepfelbacher, M. (2000). Cyclo-AMP blocks bacterial lipopolysaccharide-induced myosin light chain phosphorylation in endothelial cells through inhibition of Rho/Rho-Kinase. J. Immunol. 164: 6543 - 6549

Fernandez, A., Brautigan, D.L., Mumby, M. und Lamb N.J.C. (1990). Protein phosphatase type-1, not type2-A modulates actin microfilament integrity and myosin light chain phosphorylation in living nonmuscle cells. J. Cell Biol. 111: 103 - 112

Fiorentini, C., Fabbri, A., Flatau, G., Donelli, G., Matarrese, P., Lemichez, E., Falzano, L. und Boquet, P. (1997). *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1), a toxin that activates the rho GTPase. *J. Biol. Chem.* 31: 19532 - 19537

Flatau, G., Lemichez, E., Gauthier, M., Chardin, S., Paris, S., Fiorentini, C. und Boquet, P. (1997). Toxin-induced activation of the G-protein p21 rho by deamidation of glutamine. *Nature* 387: 729 - 735

Glomset, L. und Farnsworth, C. (1994). Role of protein modification reaktionen in programming ineraktionen between ras-related GTPases and cell membranes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10: 181 - 205

Gohla, A., Harhammer, R. und Schultz, G. (1998). The G-protein G 13 but not G 12 mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho. *J. Biol. Chem.* 273: 4653 - 4663

Hahn, H., Falke, D. und Klein, P. (1994). *Medizinische Mikrobiologie*, 2. Auflage im Springer Verlag, 387 - 388

Hall, A. (1994). Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 10: 31 - 54

Hinsbergh van, M. (1997). Endothelial permeability for macromolecules. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1018 - 1023

Horiguchi, Y., Senda, T., Sugimoto, N., Katahira, J. und Matsuda, M. (1995). *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin stimulates assembly of actin stress fibers and focal adhesions by modifying the small GTP-binding protein rho. *J. Cell. Sci.* 108: 3243 - 3251

Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J. und Lindermann, J. (1992). *Medizinische Mikrobiologie*, 8. neubearbeitete Auflage im Thieme Verlag: 225 - 228

Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, Y., Fukata, M., Nakafuku, B., Yamamori, F., Nakano, T. und Okawa, K. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-Kinase). *Science* 273: 245 - 251

Lacerda, H.M., Lax, A.J. und Rozengurt E. (1996). *Pasteurella multocida* toxin, a potent intracellularly acting mitogen, induces p125 FAK and paxillin tyrosine phosphorylation, actin stress fiber formation and focal contact assembly in swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 271: 439 - 446

Machesky, L. und Hall, A. (1996). Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Trends Cell. Biol.* 6: 304 - 311

Nobes, C.D. und Hall, A. (1995). Rho, rac and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellopodia and filopodia. *Cell* 8: 53 - 62

Nobes, C.D., Hawkins, P., Stephens, L. und Hall, A. (1995). Activation of the small GTP-binding proteins rho and rac by growth factor receptors. *J. Cell Sci.* 108: 225 - 233

Oswald, E., Sugai, M., Labigne, A., Wu, H.C., Fiorentini P. und O'Brian, A. (1994). Cytotoxic necrotising factor type 2 produced by virulent *Escherichia coli* modifies the small GTP-binding protein Rho involved in assembly of actin stress fibers. Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 3814 - 3821

Ottinger, M.E. und Lin, S. (1988). *Clostridium difficile* toxin B induces reorganisation of actin, vinculin and talin in culture cells. Exp. Cell Res. 174: 215 - 229

Ridley, A. und Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesion and actin stress fibers in response to growth factors. Cell 70: 389 - 399

Ridley, A. (1995). Rho-related proteins: actin cytoskeleton and cell cycle. Genes & Development 5: 24 - 30

Rozengurt, E., Higgins, T., Chanter, N., Lax, A.J. und Staddon, J.M. (1990). *Pasteurella multocida* toxin: Potent mitogen for cultured fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 123 - 127

Salyers, A. und Whitt, D. (1994). Bacterial pathogenesis: A molecular approach. ASM Press Washington D.C.: 254 - 263

Schmidt, G., Sehr, P., Wilm, M., Selzer, J., Mann, M. und Aktories, K. (1997). Gln63 of rho is deamidated by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1. Nature 387: 725 - 728

Sekine, A., Fujiwara, M. und Narumiya, S. (1989). Asparagine residue in the rac gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 264: 8602 - 8605

Simionesku, N. und Simionesku M. (1992). Endothelial cell dysfunction. Plennium Press: 365 - 373

Staddon, J.M., Barker, C.J., Murphey, A.J., Chanter, N., Lax, A.J., Michell, R.H. und Rozengurt, E. (1991). *Pasteurella multocida* toxin, a potent mitogen increases inositol 1,4,5-trisphosphate and mobilises Ca⁺⁺ in swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 266: 4840 - 4847

Takai, Y., Sasaki, K. und Nakanishi, T. (1995). Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Transbiochem. Sci.* 20: 227 - 229.

Takaishi, K., Kikuchi, A., Kuroda, S., Kotant, K., Sasaki, K. und Takai, Y. (1993). Involvement of rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI) in cell motility. *Mol. Cell. Biol.* 13: 72 - 79.

Tapon, N. und Hall, A. (1997). Rho, rac and cdc42 GtPases regulate the organisation of the actin cytoskeleton. *Cell Biol.* 9: 86 - 92

Verin, A.D., Patterson, C.E., Day, M.A. und Garcia J.G.N. (1995). Regulation of endothelial cell gap formation and barrier function by myosin-associated phosphatase activities. *Am. J. Physiol.* 269: 99 - 108

Wilkins, T.D. und Lyerly, D.M. (1997). *Clostridium difficile* toxins attack rho. *Trends Microbiol.* 2: 49 - 51

Wilson, B.A., Zhu, X., Ho, M. und Lu, L. (1997). *Pasteurella multocida* toxin activates the inositol triphosphate signalling pathway in *Xenopus* oocyte via Gq α -coupled Phospholipase C- β 1. *J. Biol. Chem.* 272: 1268 - 1275

Wysolmerski, R.B. und Lagunoff, D. (1990). Involvement of myosin light chain kinase in endothelial cell retraction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 16 - 20

DANKSAGUNG:

Ich möchte mich bei allen ganz herzlich bedanken, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher danke ich für die Überlassung des Themas und die Korrektur der Arbeit. Herrn Prof. Dr. med. P.C. Weber danke ich für die Möglichkeit sie am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten durchzuführen.

Mein Dank gilt besonders Herrn Dr. med. Markus Essler für die engagierte Betreuung.

Frau Barbara Böhlig danke ich für die Unterstützung bei der Laborarbeit.

Herrn Dr. Bauer danke ich für die Unterstützung bei der Densitometrie

Ein rießiges Dankeschön an Klaus, der mir mit Rat, großer Tat und endloser Geduld zur Seite stand.

Ganz großer Dank gilt meiner Freundin Isa, die mir seit Beginn des Studiums eine treue Begleiterin geworden ist.

Weiterer Dank gilt Sigrid, Sylvia, Barbara, Katja und Henriette für ihre Unterstützung und Freundschaft.

Michaela danke ich für ihren großen Einsatz bei der Fertigstellung der Arbeit.

Meiner Mutter und meinen Geschwistern sage ich ein großes Dankeschön dafür, daß sie mich unterstützt haben und immer für mich da sind.

LEBENS LAUF:

Name Karin Gertrud Hermann

Geburtstag 03.10.1970

Geburtsort Kempten/Allgäu

Schulbildung und Studium

1977-1981 Grundschule Kempten Nord

1981-1990 Allgäu-Gymnasium, Kempten

1990-1992 Studium für Grundschullehramt, Universität Augsburg

1992-1999 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Beginn an der Universität zu Lübeck (11/92-03/93)

06/1996 Beginn der Dissertation am Institut für Epidemiologie und Prophylaxe der Kreislaufkrankheiten der Ludwig-Maximilians-Universität München

11/1999 Teilapprobation

06/ 2001 Vollapprobation

Seit 07/01 Assistenzärztin in der Abteilung für Innere Medizin bei Professor Bartels im Krankenhaus Martha-Maria, Nürnberg