

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

**„Cytotoxic Necrotizing Factor“  
als Modulator  
inflammatorischer Signalwege  
in humanen Endothelzellen**

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

Vorgelegt von  
Katharina Randhahn  
aus  
Stuttgart Bad-Cannstatt  
2004

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. C. Weber

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Markus Essler

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

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2004

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1	Bakterielle Toxine . . . . .	7
1.2	Zelluläre Mikrobiologie . . . . .	8
<b>2</b>	<b>Stand der Wissenschaft</b>	<b>10</b>
2.1	Die zelluläre Wirkung bakterieller Toxine . . . . .	10
2.2	Dermonekrotische Toxine . . . . .	14
2.2.1	„Dermonecrotizing“ Toxin (DNT) . . . . .	14
2.2.2	Pasteurella multocida Toxin (PMT) . . . . .	14
2.2.3	„Cytotoxic Necrotizing Factor“(CNF) . . . . .	17
2.3	Die GTPase Rho . . . . .	21
2.4	Das Gefäßendothel . . . . .	29
2.5	Die Myosinleichtkette . . . . .	32
<b>3</b>	<b>Zielsetzung und Fragestellung</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>Material</b>	<b>34</b>
4.1	Chemikalien . . . . .	34
4.2	Reagenzien und Toxine . . . . .	34
4.3	Antikörper . . . . .	34
4.4	Puffergemische . . . . .	35
4.5	Aufreinigung von Myosin . . . . .	38
<b>5</b>	<b>Methoden</b>	<b>39</b>
5.1	Zellkultur . . . . .	39
5.2	Immunfluoreszenzfärbung . . . . .	39
5.3	Rekombinante Proteine . . . . .	40
5.4	Mikroinjektion . . . . .	40
5.5	Phosphorylierung der Myosinleichtketten . . . . .	41

5.6	Aufreinigung von Myosin . . . . .	42
5.7	Messung der MLC-Phosphatase-Aktivität . . . . .	43
<b>6</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>Diskussion</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>Literatur</b>	<b>57</b>
<b>10</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>74</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>76</b>

## Abkürzungsverzeichnis:

A	Ampère
ADP	Adenosindiphosphat
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
<i>C. botulinum</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
cm	Zentimeter
CNF	Zytotoxisch nekrotisierender Faktor
Cys	Cystein
Da	Dalton
DNT	Dermonekrotisierendes Toxin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECGS/H2	Endothelial cell growth supplement/Heparin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
G	Erdbeschleunigung
GDP	Guanindiphosphat
Gly	Glycin
GST	Glutathione S-transferase
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde
His	Histidin
HUVEC	Humane umbilikale venöse Endothelzellen

l	Liter
LPA	Lysophosphatidsäure
LPS	Lipopolysaccharide
m	Milli
M	Molar
$\mu$	Mikro
MLC	Myosinleichtkette
MLCK	Myosinleichtkettenkinase
MLC-P	Phosphorylierte Myosinleichtkette
MW	Molekulargewicht
PBS	Phosphat gepuffertes Salz
PDGF	platelet derived growth factor
PMT	<i>Pasteurella multocida</i> Toxin
RBD	C21-Rho-bindende Domäne der Rho-Kinase
TCA	Trichloroacetic Säure
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Tyr	Tyrosin
U	Unit (Enzymaktivität)
Ump	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Val	Valin

# 1 Einleitung

## 1.1 Bakterielle Toxine

1870 entdeckte Robert Koch (1843-1910), daß spezifische Mikroorganismen der Grund für den Ausbruch von Krankheiten sind. Diese revolutionäre Entdeckung löste eine wahre Entdeckungsflut aus. Immer mehr Bakterien wurden und werden als Ursache für Entzündungen entdeckt. Aber nicht nur Bakterien, sondern vor allem auch ihre Toxine machen den Menschen krank. Die ersten isolierten Toxine waren Exotoxine; Stoffe, die aktiv von Bakterien synthetisiert und sezerniert werden, wie beispielsweise bei *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani* und *-botulinum*, *Bordetella pertussis* und *Vibrio cholerae*. Exotoxine sind Proteine, die in der Regel thermolabil sind, oft Enzymeigenschaften besitzen und als Zytotoxine (Zellgifte) fungieren können. Exotoxine können durch chemische Behandlungen ihre Toxizität verlieren. Diese, als Toxoide bezeichneten inaktivierten Exotoxine, finden als Impfstoffe bei der aktiven Immunisierung Verwendung [86, 94].

Neben den Exotoxinen fand man bereits 1892 bei Untersuchungen an *Vibrio cholerae* ein weiteres, anderes Toxin: ein Endotoxin.

Endotoxine sind als hochmolekulare Lipopolysaccharidkomplexe (LPS-Komplexe) Bestandteil der gramnegativen Bakterienwand und wirken stark pyrogen sowie schwach immunogen. Bei der Freisetzung großer Endotoxinmengen beim Zerfall von gramnegativen Bakterien, z. B. bei einer gramneg. Sepsis oder bei „erfolgreicher“ Antibiotikatherapie, kann es zu einem lebensgefährlichen Endotoxinschock kommen [94]. Klinisches Beispiel hierfür ist die Jarisch-Herxheimer-Reaktion nach Penicillingabe bei *Treponema pallidum* Infektion.

## 1.2 Zelluläre Mikrobiologie

Bakterien oder ihre Toxine treten wie körpereigene Signalmoleküle (z. B. Neurotransmitter, Proteine, Hormone, Wachstumsfaktoren) mit Zellen in Verbindung. Sie passieren durch die Plasmamembran oder binden an spezifische Rezeptorproteine auf der Oberfläche der Zielzellen. Nach Bindung an einen Rezeptor werden die Toxine internalisiert und üben intrazelluläre Effekte aus. Diese intrazellulären Signale können z. B. „second messenger“ (wie cAMP) oder Phosphorylierungsreaktionen sein. Bei diesem als Signaltransduktion bezeichneten Vorgang stehen eine Reihe von Mechanismen zur Verfügung, bei denen eine Familie von Guaninnukleotid- bindenden Proteinen, die sogenannten G-Proteine, eine wichtige Rolle spielen.

Man kann die Zelloberflächenrezeptorproteine aufgrund des von ihnen benutzten Wirkmechanismus in drei Klassen einteilen.

*Kanal-gekoppelte Rezeptoren* sind Ionenkanäle, die vorwiegend bei der schnellen Signalübertragung in elektrisch reizbaren Zellen eine Rolle spielen ( z. B. das Nervenreizleitungssystem). Manche Mediatoren binden an Ionenkanäle, öffnen und schließen sie, verändern damit die Permeabilität der Plasmamembran und somit die Erregbarkeit der Zelle.

*Katalytische Rezeptoren*, die von ihren Liganden aktiviert werden, sind selbst Enzyme. Die meisten bekannten katalytischen Rezeptoren sind Proteine, die sich durch die Plasmamembran erstrecken und eine cytoplasmatische Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität haben.

*G-Protein-gekoppelte Rezeptoren* aktivieren oder inaktivieren indirekt ein weiteres membrangebundenes Enzym oder einen Ionenkanal. Die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Enzym oder Ionenkanal wird durch ein drittes Protein, das GTP- (Guanintriphosphat) bindende Regulator-Protein (oder G-Protein) vermittelt. Die G-Proteine bestehen aus einer Untereinheit  $\alpha$  und einer Untereinheit  $\beta\gamma$ . Sie kommen in zwei



unterschiedlichen Zuständen vor, die sich nur durch das jeweils gebundene Guaninnucleotid unterscheiden. In aktiver Form sind sie mit GTP beladen, in inaktiver Form mit GDP (Guanindiphosphat). Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren lösen meist eine Reaktionskette aus, die die Konzentration eines oder mehrerer kleiner, intrazellulärer Signalmoleküle, der sogenannten „second messenger“ ändert. Diese intrazellulären „messenger“ verändern ihrerseits das Verhalten anderer Zielproteine in der Zelle. Die beiden wichtigsten intrazellulären „messenger“ sind *cyclisches AMP (cAMP)* und  $Ca^{2+}$ . cAMP- und  $Ca^{2+}$ - Signale werden auf zwei verschiedenen Wegen, die beide G-Proteine einschließen, gebildet und finden sich in fast allen tierischen Zellen [8]. Wird die Adenylatcyclase aktiviert, spricht man von dem G-Protein  $G_s$  („s“ für „stimulatory“), wird sie gehemmt, dann spricht man von  $G_i$  („i“ für „inhibitory“).

Bei einer Bakterieninfektion oder bei bestimmten Krankheiten werden solche Signalwege aktiviert oder gehemmt. Um neue Therapiemöglichkeiten zu finden, ist es nötig, die genauen physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge der Zelle zu kennen.

## 2 Stand der Wissenschaft

### 2.1 Die zelluläre Wirkung bakterieller Toxine

Wie bereits erwähnt, können Krankheiten nicht nur durch Bakterien, sondern auch durch bakterielle Toxine ausgelöst werden. Wie verschieden die einzelnen Wirkungen von Toxinen an menschlichen Zellen sind, ist an Hand zweier bekannter Bakterientoxine zu zeigen: *Vibrio cholerae*- und *Bordetella pertussis*-Toxin

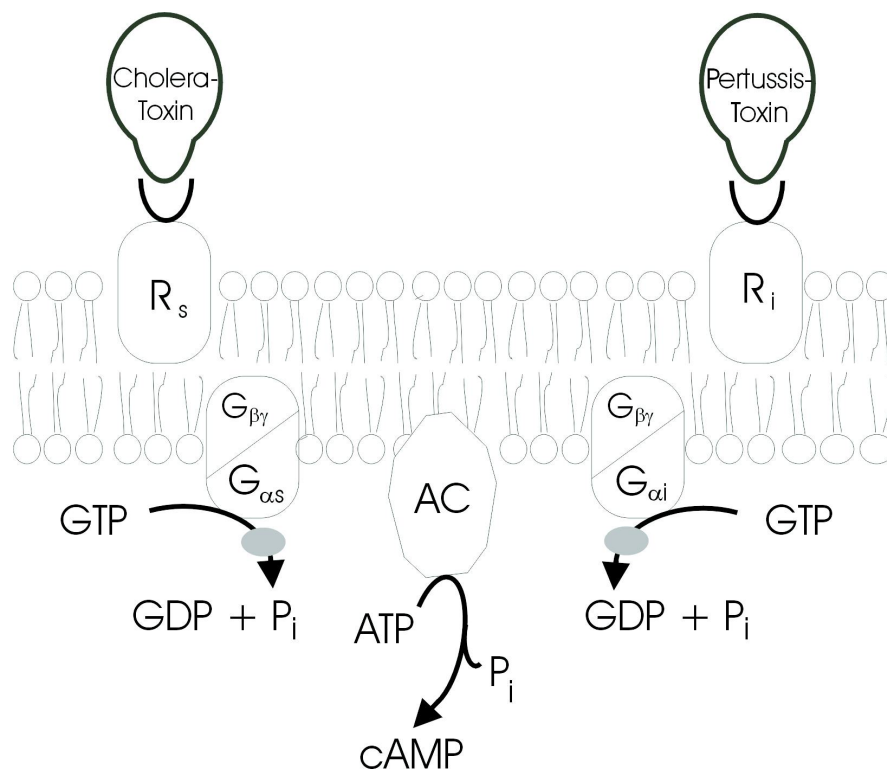


Abbildung 1: **Die Cholera- und Pertussistoxinwirkung auf die Adenylatcyclase**

R: Rezeptor; AC: Adenylatcyclase; s: stimulierend; i: inhibierend;  $G_{\alpha}$ ,  $G_{\beta\gamma}$ : G-Proteine (Untereinheit  $\alpha, \beta\gamma$ ); GTP: Guanosintriphosphat;  $GDP + P_i$ : Guanosindiphosphat und anorganisches Phosphat; ATP: Adenosintriphosphat; cAMP: 3',5'-cyclo-Adenosinmonophosphat

### 2.1.1 Cholera toxin aktiviert die Adenylatcyclase durch permanente Stimulation des $G_s$ - Proteins

Cholera ist eine Darmerkrankung, die vom Bakterium *Vibrio cholerae* ausgelöst wird. Hauptsymptom ist ein schwerer Durchfall, der unbehandelt infolge hohen Wasserverlustes häufig zum Tode führt. Das Bakterium wird fäkal-oral durch kontaminiertes Trinkwasser oder Nahrungsmittel übertragen. Epidemien brechen immer wieder an Orten mit mangelnden hygienischen Verhältnissen und großer Bevölkerungsdichte, wie z. B. in Indien oder Afrika aus [16].

Bei der Cholera dringt das Bakterium weder in das Gewebe ein, noch schädigt es dieses. Es besiedelt den Darm, nicht anders, als das dort vorkommende *Escherichia coli*. Der katastrophale Flüssigkeitsverlust, den die Cholera hervorruft (über einen Liter pro Stunde), ist die Reaktion auf das Cholera toxin, ein Protein von 87 kDa. Wird bei einem Cholerakranken der Wasser- und Salzverlust ausgeglichen, kann er die wenigen Tage überleben, bis sein eigenes Immunsystem die Bakterien eliminiert hat.

Das Cholera toxin ist ein sogenanntes AB-Toxin mit der Zusammensetzung  $AB_5$ , wobei die fünf B- Untereinheiten um die A-Kette herum ein Fünfeck bilden. Das Toxin bindet an seinen Zelloberflächenrezeptor Gangliosid  $G_{M1}$ , ein in der äußeren Lage der Plasmamembran lokalisiertes Oligosaccharidhaltiges Glycoprotein.

Anschließend wird das Toxin über rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen. Dieser Vorgang führt zur Aktivierung des Toxins: Die A-Untereinheit wird durch proteolytische Spaltung und Reduktion einer Disulfidbrücke in zwei Fragmente  $A_1$  (22 kD) und  $A_2$  (5 kD) aufgetrennt.  $A_1$  wird ins Cytosol freigesetzt (die B-Untereinheit dringt nicht in die Zelle ein). Dort katalysiert  $A_1$  eine Übertragung der ADP-Ribose-Einheit von intrazellulärem  $NAD^+$  auf einen Arg-Rest von  $G_{s\alpha}$  ( $\alpha$  - Untereinheit).

ADP-ribosyliertes  $G_{s\alpha}$  kann die Adenylatcyclase zwar aktivieren, ist aber nicht mehr in der Lage, gebundenes GTP zu hydrolysieren. Infolgedessen bleibt die Adenylatcyclase irreversibel im aktivierten Zustand (Siehe Abb.1). Die Epithelzellen des Dünndarms scheiden normalerweise als Reaktion auf einen geringen Anstieg der cAMP- Konzentration Verdauungsflüssigkeit, eine  $HCO_3^-$  reiche Salzlösung aus.

Durch die Wirkung des Cholera-Toxins steigt die cAMP- Konzentration in den Zellen ungefähr auf das Hundertfache des Normalwertes an, weshalb die Epithelzellen erhebliche Mengen von Flüssigkeit sezernieren und es zu den typischen Cholera- Symptomen kommt. *In vitro* kann das Cholera- Toxin auch andere Gewebe beeinflussen, wozu es *in vivo* nicht kommt, weil es nicht aus dem Darm ins Blut gelangen kann [9, 10, 122].

### **2.1.2 Das Pertussistoxin aktiviert die Adenylatcyclase durch permanente Inhibition des $G_i$ - Proteins**

Das Pertussistoxin führt über einen anderen Signalweg zur Erhöhung der intrazellulären cAMP- Konzentration als das Choleratoxin.

Das Bakterium *Bordetella pertussis* ist der Erreger des Keuchhustens, eine häufige Infektionskrankheit vor allem im Kindesalter. Der Mensch nimmt den Erreger über infektiöse Hustentröpfchen auf. Das Bakterium greift ausschließlich die mit Zilien besetzten respiratorischen Epithelzellen des Bronchialsystems (vom Nasopharynx bis in die Bronchiolen) an und führt dort zur starken Sekretion von zähflüssigen Schleim. Diese hohe Schleimproduktion führt dann schließlich über die charakteristischen stakkatoartigen Hustenanfällen zu gefürchteten Bronchiolitiden und Ziliennekrosen. Diese Klinik läßt sich durch eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, unter anderem dem Pertussis- Toxin, erklären.

Das Pertussistoxin ist ein Heteroprotein (MW etwa 110 kD), das aus den fünf Bausteinen  $S_{1-5}$  besteht. Es zeigt eine gewisse Konformität mit dem gebräuchlichen A-B-Modell anderer bakterieller Toxine, wobei  $S_1$  die toxische Komponente ist, das oligomere  $S_{2-5}$  dagegen unter anderem den Kontakt mit der Zelle aufnimmt.

Normalerweise führt die Aktivierung der Adenylatcyclase zu einer Aktivierung von  $G_{i\alpha}$ , das sein gebundenes GDP in ein GTP tauscht.  $G_{i\alpha}$  dissoziiert dann von der Untereinheit  $G_{\beta\gamma}$  ab.  $G_{i\alpha}$  inhibiert direkt die Adenylatcyclase, während  $G_{\beta\gamma}$  die freien stimulierenden  $\alpha_s$ - Untereinheiten bindet, die somit keine weiteren Adenylatcyclase- Moleküle mehr aktivieren können. (Siehe Abb.1)

Die Pertussistoxinkomponente  $S_1$  (MW 28kD) besitzt enzymatische Aktivitäten einer ADP-Ribosyltransferase. Das  $G_i$ - Protein wird an seiner  $\alpha$ - Untereinheit ADP-ribosyliert und damit dessen GDP/GTP Austauschaktivität inhibiert.

Dadurch wird  $G_{i\alpha}$  daran gehindert, gebundenes GDP gegen GTP auszutauschen und kann die Adenylatcyclase nicht mehr hemmen. Durch die fehlende Hemmung kommt es zu einer permanenten Stimulation der Adenylatcyclase [11, 17, 122]. Dies führt dann unter anderem zu den typischen Symptomen des Keuchhustens.

Wie gerade an Hand dieser zwei Beispiele gezeigt, modifizieren bakterielle Toxine eukaryote, heterotrimere GTP-bindende Regulatorproteine. Die Toxine sind als Pathogenitätsfaktoren von großer klinischer Bedeutung und als pharmakologische und zellbiologische Werkzeuge in der Grundlagenforschung interessant. Neben diesen gerade beschriebenen Bakterientoxinen gibt es noch zahlreiche andere. Für die vorliegende Arbeit wurde ein Toxin aus der Gruppe der „Dermonekrotischen Toxine“ verwendet.

## 2.2 Dermonekrotische Toxine

CNF („*Cytotoxic necrotizing factor*“-1 und -2, PMT (*Pasteurella multocida* Toxin) und DNT („dermonecrotizing“-Toxin von *Bordetella bronchiseptica*) sind dermonekrotische Toxine. Diesen Namen erhielten die Toxine wegen ihrer stark hautschädigenden Wirkung. Weiterhin zeigen sich auch strukturelle Homologien und ähnliche Wirkmechanismen innerhalb dieser Toxin-Gruppe. Allerdings gibt es auch spezifische Unterschiede, die in der Erforschung der Signaltransduktion hilfreich sind. PMT aktiviert Signalwege, die über heterotrimere G-Proteine Rho regulieren. CNF und DNT hingegen zeigen ihre Zellreaktion über eine direkte Rac-, CDC42, oder Rho-Aktivierung.

### 2.2.1 „Dermonecrotizing“- Toxin (DNT)

„Dermonecrotic“- Toxin (DNT) wird von *Bordetella pertussis*, *parapertussis* und *bronchiseptica* produziert [124]. Bordetella-Bakterien sind gramnegative, in der Regel unbewegliche, kokkoide Stäbchen. Sie sind strikt aerob und zeigen ein optimales Wachstum bei einer Temperatur von 35-37°C [92]. DNT führt zu Nasen- und Lungenläsionen, zu atrophischen Rhinitis und stört die Differenzierung von Osteoblasten [55, 95, 112]. Wie DNT in die Zelle aufgenommen wird, ist noch nicht vollständig geklärt.

### 2.2.2 *Pasteurella multocida* Toxin (PMT)

*Pasteurella multocida* wurde erstmals 1878 isoliert. Es ist ein Gram negatives kokkoides aerobes bzw. fakultativ anaerobes Stäbchen. Der Keim produziert einige Endotoxine. *Pasteurella multocida* führt sowohl beim Menschen, als auch beim Tier zu polymorphen Krankheitsbildern. Die menschlichen Infektionen werden durch Tierbisse übertragen und reichen vom lokalen Abszeß bis zur schweren Sepsis. Gefürchtet sind *Pasteurella multocida* Epidemien vor allem in der Massentierhaltung, z.B. die atrophische Rhinitis

bei Zucht- und Hausschweinen. Die Hauptzeichen dieser Erkrankung sind der Verlust des Nasenmuschelknochens, Verzerrung der Schnauze und Reduktion des Gewichts [61, 98, 117].

Durch Tierversuche fand man heraus, daß für die pathologischen Effekte von *Pasteurella multocida* ein Toxin entscheidend ist [99]. Bei dem *Pasteurella multocida* Toxin (PMT) handelt es sich um ein intrazellulär wirkendes Toxin mit einem Molekulargewicht von 146 kDa.

PMT führt zu einer Umorganisation von F-Aktin zu Aktin- Streßfasern; anschließend kommt es zu einer Abrundung der Zellen. Für diese PMT-Effekte ist wahrscheinlich die GTPase Rho verantwortlich [31].

Bei der Sequenzierung von PMT fällt eine His-Glu-Trp Aminosäuresequenz auf. Diese ist unter anderem bei Cholera- und Pertussistoxinen für die ADP-Ribosylierungsaktivität notwendig [72, 90]. Wegen dieser Homologie nahm man an, daß PMT und ähnliche Toxine gleiche Funktionen (ADP-Ribosylierung) haben [115]. Diese Hypothese ließ sich leider experimentell nicht bestätigen. Mutationen in der His-Glu-Trp-Sequenz zeigten keine Veränderung in der PMT-Wirkung. Es ist also sehr unwahrscheinlich, daß PMT eine ADP-Ribosylierungsfunktion hat [125].

Zusätzlich zeigt PMT eine gewisse Homologie mit *Cytotoxic Necrotizing Factor 1* (CNF) in seiner zentralen, hydrophoben, Membran-assoziierten Domäne [40]. Allerdings besitzt CNF keine His-Glu-Trp- Sequenz. Trotzdem nimmt man an, daß eine Ähnlichkeit in der Aufnahme und im Mechanismus der beiden Toxine besteht. Zwischen PMT und DNT besteht dahingegen keine Homologie [60].

Genauso wie PMT führen CNF und DNT zur DNA-Synthese, Streßfaserbildung und zur fokalen Adhäsionsmolekülkomplexbildung [59, 70, 88].

Nach Stimulation von Endothelmonolayern mit PMT erhöht sich die

transendotheliale Permeabilität um mehr als das 10-fache [33]. Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe haben ergeben, daß sich durch Inaktivierung der MLC-Phosphatase, durch den folgenden Anstieg der MLC- Phosphorylierung, durch Endothelzellabrundung und Zerstörung der endothelialen Zell-Zellkontakte dieser Effekt erklären läßt [33]. Diverse Hemmversuche zeigten folgende Ergebnisse: Sowohl durch Vorinkubation mit dem spezifischen Rho-Inaktivator C3 Transferase von *Clostridium botulinum*, wie auch durch Mikroinjektion von der Rho binding domain und Pleckstrin Homologie Domäne der Rho-Kinase, als auch durch Mikroinjektion von konstitutiv aktiver MLC-phosphatase, konnte der „PMT-Effekt“ gehemmt werden (siehe Abb.2). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß PMT Rho/Rho-Kinase aktiviert und die MLC-Phosphatase inaktiviert.

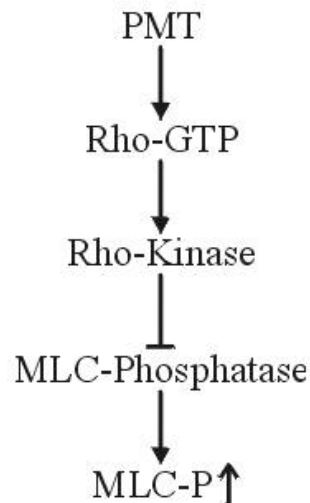


Abbildung 2: **PMT Signalweg; Übersichtsskizze**

MLC-P: Phosphorylierte Myosin-Leichtkette



### 2.2.3 „Cytotoxic Necrotizing Factor“ (CNF)

Neben DNT und PMT gehört CNF zu den Toxinen der Dermatonekrotischen Gruppe.

#### A) Allgemeines:

Harnwegsentzündungen und Gastroenteritiden können durch zahlreiche Keime ausgelöst werden. Häufig handelt es sich um Bakterien der Spezies *Escherichia coli*, die physiologisch in der Darmflora vorkommen. Einige besonders virulente *Escherichia coli*-Stämme produzieren ein Protein Namens „Cytotoxic Necrotizing Factor“ (CNF). Dabei unterscheidet man zwei Toxine. CNF-1 (früher nur CNF) ist vor allem humanpathogen, CNF-2 (erster Name Vir cytotoxin) eher veterinär-pathogen (z.B. bei Kühen und Schafen) [28].

CNF induziert eine starke dermonekrotische Reaktion in Hasen nach intradermalen Injektion und zeigt eine hohe Letalität nach Injektion des Toxins in Mäusen [21].

#### B) Aufbau:

CNF-1 ist ein 108 kDa schweres A-B Proteintoxin. Es ist aus drei Domänen aufgebaut. Die N-Terminale Domäne enthält die Zellbindungsfunktion und bindet mit hoher Affinität an einen bis jetzt unbekanntem Rezeptor. Das Rezeptor-gebundene Toxin wird über eine Clathrin-unabhängige Endozytose in die Zelle aufgenommen und in Endosomen transportiert [27]. Die mittlere, sogenannte T-Domäne enthält zwei hydrophobische Helices, die bei dem Durchtritt durch die Zellmembran eine Rolle spielen. Die katalytische Domäne befindet sich am COOH-Terminal. Diese Domäne ist für die Deamidierung von Rho, Rac und CDC42 zuständig [38, 73]. Die spezielle Struktur dieser Domäne erlaubt eine spezifische Andockung an Rho und ermöglicht damit

eine sehr spezifische Deamidierung von Glutamin. Dieses Prinzip gilt für alle Toxine mit dieser katalytischen Domäne [19]. Der N-Terminus von CNF-1 und -2 zeigt eine auffallende Homologie (27% Identität und 80% konservierte Reste) zum N-Terminus von PMT, aber keinerlei Ähnlichkeit zum C-Terminus .

### **C) Zellbiologische Effekte:**

Stimuliert man Zellen mit CNF, kommt es nicht nur zu einer Aktivierung von Rho. Je nach Versuchsmodell zeigen sich zum Teil gegensätzliche Reaktionen. Z. B. steigert CNF-1 die intestinale Permeabilität in Caco-2 Zellschichten, scheint aber die tight-junctions in T84-intestinalen Epithelzellschichten überhaupt nicht zu beeinflussen [52, 58]. Überraschend ist auch die Wirkung auf HUVEC: Einerseits führt CNF zu Zellausbreitung und Verbesserung der endothelialen Barrierfunktion [77]. Andererseits sollte es über die dauerhafte Aktivierung von Rho, via Rho-Kinase und Inaktivierung von MLC-Phosphatase zur MLC-Phosphorylierung, Endothelzellkontraktion und zu einer erhöhten Permeabilität kommen [42, 43, 44].

Mikroskopisch beobachtet man nach CNF-Stimulation von HUVEC eine Entstehung von Streßfasern, ein typisches morphologisches Korrelat der Rho-Aktivierung. Neben Streßfaserbildung werden auch Ruffles und Filopodien gebildet! Dieses spricht für eine Mitbeteiligung von Rac und CDC42.

CNF scheint die Zellmorphologie wahrscheinlich nicht nur über die Rho-Aktivierung (wie PMT), sondern durch Aktivierung einer Vielzahl von GTPasen und deren Interaktionspartnern zu steuern.

### **D) Deamidierung und Polyaminierung von Glutamin:**

Wie bereits erwähnt, kommt es bei CNF- Stimulation sowohl zur Aktivierung von Rho A, als auch von Rac und CDC42.

In der Zelle deamidiert CNF-1 Glutamin-63 von Rho zu Glutaminsäure und

überführt Rho A so in eine aktive Form [42, 45, 103]. CDC 42 und Rac werden an Glutamin-61 deamidiert [75]. Die Deamidierung des Glutamins blockiert die intrinsisch induzierte Hydrolyse von GTP, was zu einer permanenten Aktivierung führt. Die GTPase behält ihre GTP-bindende Aktivität, d.h. sie aktiviert „downstream“ Signaltransduktion. Unterschiede gibt es in den spezifischen Angriffsmodi der Toxine [46, 75, 79, 103, 105].

Deamidiertes Rho A zeigt einen Mobilitätsshift, d. h. es wandert geringgradig langsamer in der SDS-PAGE als natives Rho A [75]. CNF-2 modifiziert Rho A so, daß es hyperaktiver als die Naturform ist [88]. Ziele von CNF und DNT sind GTPasen der Rho-Familie, Rho, Rac und CDC42.

#### **E) Allgemeine Zellreaktionen:**

CNF-1 und PMT induzieren einen dosis- und zeitabhängigen Anstieg der Phosphorylierung von FAK („Focal adhesion kinase“) an Tyr 397 in Swiss 3T3 Zellen. Weiterhin führen sie zu einer Komplexbildung zwischen FAK und Src-Familienmitgliedern (Src, Yes, Fyn). Wurden die Zellen mit p160/ROCK-Inhibitoren (HA1077 und Y-27632) vorinkubiert, wurde die FAK-Phosphorylierung, die Komplexbildung und die Streßfaserbildung nach Toxingabe verhindert. Daraus folgt, daß die Aktinstreßfaserbildung über p160/ROCK und die Autophosphorylierung von FAK in Swiss 3T3 Zellen läuft [118]. CNF-1 induzierte RhoA-abhängige Expression des Cyclooxygenase-2-Gens (COX-2) findet auf einem von p160/ROCK-unabhängigen Weg statt [119].

Rac spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung von freien Radikalen. CNF-1 induziert die phagozytose-ähnliche Aufnahme von Partikeln in Endothelzellen (Rac-Aktivierung). Nach der schnellen Phagozytose folgt ein erhöhter Sauerstoffverbrauch der Zelle und eine Zunahme der Superoxid-Anion-Bildung. Diese Effekte können zusätzlich noch durch Latexkügelchen getriggert werden

[41]. Daneben können CNF-1 exponierte Zellen spezifisch Apoptosezellen (nicht lebende Zellen) nach Ruffle-Bildung aufnehmen (Makropinozytose). Die Aufnahme hängt von der koordinierten Aktivierung der Rho GTPasen ab. Schließlich wird das Material in Rab-7 und Lamp-1-positiven, sauren, lysosomalen Vesikeln transportiert und dort degradiert. Somit zeigen auch einfache Epithelzellen Makrophagen- Charakter, d. h. sie haben u. a. die Möglichkeit, Apoptosezellen abzubauen [39].

## 2.3 Die GTPase Rho

### 2.3.1 Zytoskelett

Da Rho-GTPasen an der Regulation des Aktinzytoskeletts maßgeblich beteiligt sind, soll zunächst einmal ein Überblick über die Funktion des Aktinzytoskeletts gegeben werden. Das Zytoskelett aller Eukaryonten vermittelt eine Vielfalt an essentiellen biologischen Funktionen. Es hält die zelluläre Gestalt aufrecht und spielt eine entscheidende Rolle in der Zellmotilität, Zytokinese, Phagozytose und bei intrazellulären Transportprozessen. Das Zytoskelett besteht unter anderem aus Aktin-/Myosinfilamenten [78]. Die Aktinfilamente (7nm) bestehen aus monomeren  $\beta$  und  $\gamma$ -Aktinen.  $\beta$ -Aktin ist mit Myosin assoziiert und ist bei der Zellkontraktion und der Phagozytose beteiligt.  $\gamma$ -Aktin ist assoziiert mit Tropomyosin, Filamin, Fimbrin, Profilin, Villin, Gelsolin oder Vinculin und ist z.B. ein Bestandteil der Mikrovilli, Stereocilien oder der Zonula adhaerens (Schlußleiste zwischen zwei benachbarten Zellen) oder bildet einen kontraktilen Ring bei der Zellteilung [78].

Nur der Vollständigkeit halber sind noch die  $\alpha$ -Aktinfilamente zu erwähnen, die in verschiedenen Muskelzellen vorkommen und zusammen mit Myosin für die Muskelkontraktion sorgen. Während in Muskelzellen Aktin-Myosin-Filamente permanente Strukturen sind, treten sie bei Nichtmuskelzellen häufig nur in bestimmten Situationen z.B. während bestimmter Stadien des Zellzyklus auf und verschwinden dann anschließend wieder [78].

Das Aktinzytoskelett weist je nach Stimulationsgrad der Zelle eine Vielzahl an unterschiedlichen Formen wie Streifzfaser, „Ruffles“ oder Filopodien auf. Aktinstreifzfaser bestehen aus langen Filamentbündeln, die die Zelle durchziehen und durch Integrine und fokale Adhäsionsmoleküle an der extrazellulären Matrix befestigt sind. Dagegen findet sich am Zellrand ein hoch kompaktes Netzwerk aus Aktinfasern in Form von Lamellipodien und

Ruffles [20, 113, 114]. Kleine Aktinfaserbündel stehen oft auch aus der Zelloberfläche hervor, vor allem bei beweglichen Zellen und Neuronen in Form von Mikrospiques und Filopodien [26]. Während der Mitose verschwinden die verschiedenen Aktinstrukturen und ein kontraktiler Aktinring bildet sich an der Spaltungsfurche während der Zytokinese [22]. Dieser Regelmechanismus der hoch dynamischen Strukturen aus polymerisiertem Aktin ist von größter Bedeutung in der Zellbiologie und unterliegt einem komplizierten Regulationssystem.

### **2.3.2 Kleine GTPasen**

Die kleinen GTP-bindenden Proteine (GTPasen) werden heute in mindestens fünf „Subfamilien“ untergliedert. Hierzu gehören die Ras-, Rab-, Ran-, ARF- und Rho-Familien. Die einzelnen Familien zeigen untereinander eine 30%ige Identität in ihrer Aminosäuresequenz. Innerhalb der einzelnen Familien besteht eine Aminosäure-Sequenzhomologie von mindestens 50%. Besonders konserviert sind die Regionen, die für Nukleotidbindungen verantwortlich sind [6]. In ihrer Funktion sind sich die kleinen GTPasen ebenfalls sehr ähnlich. Über 50 Mitglieder in der Ras- Superfamilie der kleinen GTPasen regulieren nahezu alle zellbiologischen Prozesse in Eukaryonten. Ras z. B. kontrolliert Wachstum und Differenzierung durch Regulation von der „mitogen-activated protein“(MAP)- Kinaseaktivität. Die ungefähr 25 Mitglieder der Rab Subfamilie kontrollieren wichtige Schritte im intrazellulären Vesikeltransport. Die GTPase Ran kontrolliert Protein- und RNA-Transport durch die Kernmembran [14, 53, 91, 107].

### **2.3.3 Rho**

Die Rho-Subfamilie der kleinen GTPasen besteht aus mehr als 30 Proteinen, darunter RhoA, RhoB, RhoC, Rac 1 und 2, zwei CDC42Hs-Isoformen, TC10 und RhoG [53, 54, 110, 121]. Rho muß GTP binden, um in einen aktiven

Status übergeführt zu werden. Nach Hydrolyse von GTP zu GDP kehrt Rho in den inaktiven Zustand zurück. Zwei Domänen der Rho-Proteine, „Switch 1 und 2“, unterlaufen einen Wechsel zwischen GTP- zum GDP-gebundenen Zustand. „Switch 1“ (RhoA Aminosäuren 34-42) beeinflusst die Aktivierung von Effektoren downstream von Rho, „Switch 2“ (RhoA Aminosäuren 63-79) spielt eine Rolle in der GTP Hydrolyse [15, 126, 127].

### A) Regulation von Rho:

Wie alle kleinen RAS-ähnlichen GTPasen binden und hydrolysieren Rho-Proteine GTP. Reguliert werden die GTPasen der Rho-Familie durch mindestens drei Gruppen interagierender Proteine.

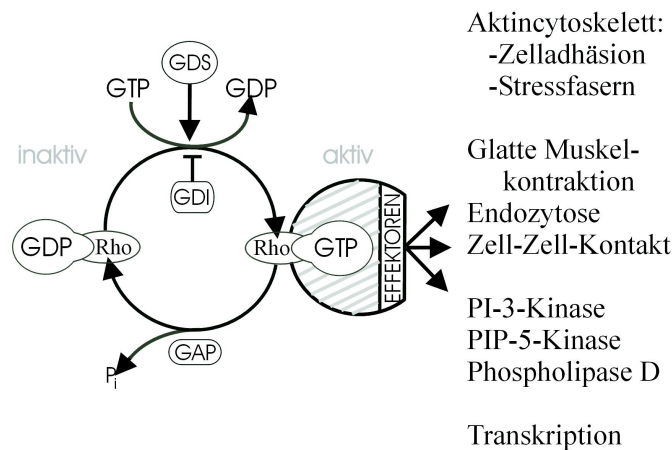


Abbildung 3: **Regulation von Rho über GDS, GDI und GAP**

GDS: „Guanine nucleotide Dissociation Stimulators“; GDI: „Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors“; GAP: „GTPase-Activating Proteins“

Nukleotidaustauschfaktoren, die „Guanine nucleotide Exchange Factors“ (GEFs) die auch „Guanine nucleotide Dissociation Stimulators“ (GDS) bezeichnet werden, beschleunigen die Freisetzung von GDP, erleichtern die Bindung von GTP und aktivieren damit die GTPasen. Gemeinsam ist diesen aktivierenden Faktoren eine Sequenz, die erstmals beim Dbl, einem Proto-Oncogen identifiziert wurde [6] (Siehe Abbildung 3).

Eine zweite Gruppe von regulatorischen Proteinen (GDIs, „Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors“) verhindert den Nucleotidaustausch. GDIs „extrahieren“ Rho-Proteine aus der Zellmembran und stabilisieren die inaktive GDP gebundene Form im Zytosol (Siehe Abbildung 3).

Schließlich sind noch Proteine zu nennen, die die intrinsische GTPase Aktivität der Rho-Proteine stimulieren, die „GTPase-activating proteins“ (GAPs) und dadurch den aktiven Zustand der Rho-Proteine beenden. Eine Ausnahme scheint RhoE zu sein, das weder eine intrinsische GTPase Aktivität besitzt, noch durch Rho-spezifische GTPasen stimuliert wird [47]. Mutation der Aminosäure 14 von Gly in Val, entsprechend der Val-12 Onkogenmutation in Ras, läßt die intrinsische GTPase-Aktivität in Rho ansteigen und macht sie unempfindlich für Rho-GAP [51]. Rho-GAP stimuliert auch Rac, wohingegen zwei Proteine mit Sequenzhomologien zu Rho-GAP, *Bcr* („the breakpoint cluster region gene product“) und *n-chimerin*, allein nur bei Rac, nicht aber bei Rho wirken [29, 47, 49, 57, 80] (Siehe Abbildung 3).

Während ursprünglich angenommen wurde, daß Rho-Proteine spezifisch in die Regulation des Aktinzytoskeletts eingeschaltet sind, ist heute davon auszugehen, daß diese GTPasen zusätzlich an einer Vielzahl von anderen Zellfunktionen beteiligt sind. Es gibt z.B. Hinweise dafür, daß Rho-Proteine an der Kontrolle der Endozytose [71, 102], der Gen-Transkription [56], der Zellzyklusregulation [87], der Apoptose [81] und der Transformation [68]



beteiligt sind. Um Prozesse wie direkte Zellbewegung und axonale Extension zu regulieren, muß die Rho-GTPase Aktivität genau auf intrazelluläre Standorte eingeschränkt werden, damit eine exakte Reaktion auf extrazelluläre Signale möglich ist.

Neben der Regulation der GTPasen durch GEFs, GDIs und GAPs, hat sich gezeigt, daß auch die einzelnen GTPasen untereinander interagieren können. Nach Mikroinjektion von CDC42 in konfluente Swiss3T3-Zellen kommt es zu einer hierarchischen, kaskadenartigen Aktivierung von endogenem Rac und dadurch zur Aktivierung von Rho. Die einzelnen kleinen GTPasen führen ihrerseits zur Ausbildung von Filopodien (CDC42), Lamellopodien (Rac) und Streißfaser (Rho) [84, 93].

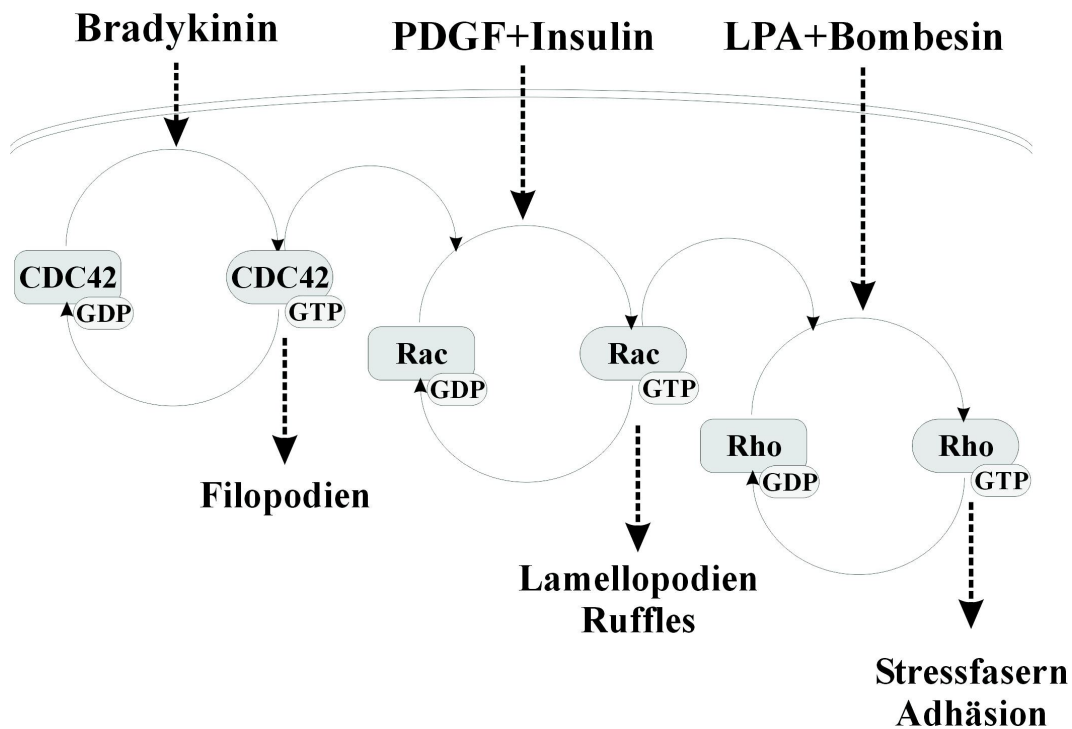


Abbildung 4: Regulationskaskade von CDC42, Rac und Rho

## **B) Rho-Aktivatoren:**

Die kleinen GTPasen unterliegen nicht nur einem intrazellulärem Regulationssystem, sondern können ebenfalls von extrazellulären Liganden über entsprechende Rezeptoren modifiziert werden. Rho kann durch extrazelluläre Zugabe von Lysophosphatidsäure oder Bombesin aktiviert werden [53]. Der Wachstumsfaktor PDGF (platelet derived growth factor) und Insulin stimulieren Rac und somit die Ruffle-Ausbildung [85]. Bradykinin aktiviert CDC42 und führt so zu Filopodien und zur weiteren Aktivierung von Rac [69].

## **C) Hemmung von Rho durch bakterielle Toxine:**

Rho-Proteine kann man spezifisch durch bakterielle Toxine hemmen. Hier ist zunächst die Familie der C3-ähnlichen Transferasen zu nennen [5]. Mitglieder dieser Toxinfamilie sind *Clostridium botulinum* C3 ADP-Ribosyltransferase [7], *Clostridium limosum* Transferase [62], *Bacillus cereus* Transferase [63] und EDIN („Epidermal Cell Differentiation Inhibitor“) [116], eine ADP-Ribosyltransferase, die von *S.aureus* gebildet wird. Die C3-ähnlichen Transferasen haben ein Molekulargewicht von ca. 25 kDa, sind stark basische Proteine und weisen auf Proteinebene eine Sequenzidentität von 30%- 70% auf. C3-Transferasen besitzen offenbar keine spezifische Translokations- und Rezeptorbindungsdomäne. Werden diese Toxine allerdings mikroinjiziert, z.B. in Verozellen, so führen sie zu massiven zytotoxischen Effekten. Sämtliche C3-Transferasen ADP-ribosylieren Rho-Proteine an Asparagin-41 [106] (Siehe Abb.5). Da diese Rezeptor-Aminosäure in der sog. Effektor-domäne des Rho-Proteins lokalisiert ist, führt diese Modifikation zu einer Blockade Rho-abhängiger Signalwege und hemmt somit die Bildung von Aktinstreißfasern und führt zum Verlust von fokalen Adhäsionskomplexen. Substrate für die ADP-Ribosylierung durch C3-Transferasen sind nur RhoA, B, C [18, 23]. Rac

wird in Gegenwart niedriger Konzentrationen an Detergens (z.B. 0,01%SDS) zu maximal 5% modifiziert. CDC42 ist kein Substrat der C3-Transferase [63]. Die hohe Spezifität der C3-Transferasen macht diese Enzyme zu Werkzeugen, mit denen die zellbiologische Rolle und Bedeutung von Rho untersucht werden kann. Weitere Rho hemmende Toxine sind die Toxine A und B von *Clostridium difficile*. *Clostridium difficile* spielt eine entscheidende Rolle bei der durch Antibiotika (hauptsächlich Clindamycin, Ampicillin, Cephalosporine) ausgelösten pseudomembranösen Colitis. Durch eine Homöostasestörung der physiologischen Darmflora kann sich der opportunistische Keim ungehemmt vermehren und führt durch seine Toxine zu einer sehr starken Entzündung der Darmschleimhaut. Toxin A (MG 308 kDa) und Toxin B (MG 270 kDa) zeigen eine ca. 48% Identität und sind ca. 63% homolog untereinander. Es ist schon seit 1998 bekannt, daß *Clostridium difficile* Toxine auf das Zytoskelett wirken und spezifisch das Aktin-Zytoskelett angreifen, während der mikrotubuläre Apparat weit weniger betroffen ist [89]. Erste Hinweise auf den molekularen Wirkmechanismus der *Clostridium difficile* Toxine ergaben Untersuchungen, die zeigten, daß eine Vorbehandlung von CHO (Chinese Hamster Ovary)- Zellen mit *Clostridium difficile* Toxin B zu einer Steigerung der ADP-Ribosylierbarkeit von Rho-Proteinen durch C3 führte [64, 65]. Da die *Clostridium difficile* Toxine das gelelektrophoretische Laufverhalten von Rho-Proteinen verändert, wurde eine kovalente Modifikation der GTP-bindenden Proteine vermutet, die durch massenspektrometrische Analyse bestätigt werden konnte [66, 67]. Hierbei stellte man fest, daß die Toxine zu einer Massenzunahme der Rho-Proteine um 162 Da führen. Dieser Befund wies auf die Modifikation durch eine Hexose hin und führte zur Aufklärung des molekularen Mechanismus der Wirkung von *Clostridium difficile* Toxin A und B als Monoglucosylierung von Rho-Proteinen. Weitere Untersuchungen zeigten, daß die Toxine UDP-Glucose als Kosubstrat verwenden, nicht aber

andere Zucker (Siehe Abb. 5). Im Gegensatz zu C3, das ausschließlich RhoA, B, C ADP-ribosyliert, glucosylieren die Toxine A und B Rho, Rac und CDC 42. Andere GTPasen wie Ras, Rab, Arf und Ran Proteine stellen keine Substrate dieser Toxine dar [66, 67]. Die Glucosylierung von Rho erfolgt spezifisch an Threonin-37 (entspricht Threonin-35 in Rac, CDC 42 und in den Ras-Proteinen).

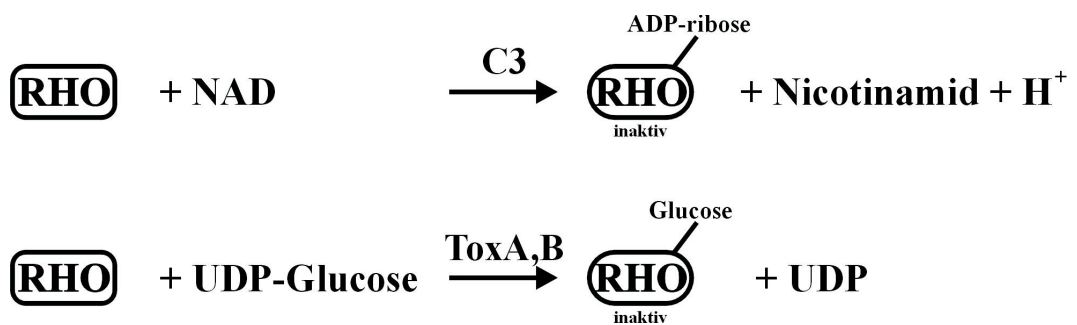


Abbildung 5: Modifikation und Hemmung von Rho durch C3-Transferase und Toxin A,B (*Clostridium Difficile*)

Bakterielle Toxine eignen sich, wie bereits schon einige Male erwähnt, sehr gut als Werkzeuge in der Grundlagenforschung. So ist die Anwendung von C3-Transferasen zur Inaktivierung von Rho zweifellos entscheidend für eine rasche Aufklärung der Rolle und Bedeutung dieser GTPase gewesen. Im Vergleich zu C3-ähnlichen Transferasen sind die clostridialen Toxine gut zellgängig, was ihren Einsatz als Werkzeuge wesentlich erleichtert. Dieser Vorteil wird allerdings durch eine breitere Proteinsubstratspezifität relativiert.

## 2.4 Das Gefäßendothel

Grundsätzlich ist die Wand der Blutgefäße aus drei verschiedenen Schichten aufgebaut: *Tunica intima, media und externa*! Die *Intima* begrenzt das Gefäßlumen lückenlos durch eine einfache Lage von spindelförmigen, flachen, 50-150  $\mu\text{m}$  langen Endothelzellen, die in Richtung des Gefäßverlaufs ausgerichtet sind. Einzelne Zellen sind relativ flach und die Zytoskelettproteine wie Aktin und Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle sind an der Zell-Zellgrenze konzentriert [3]. Diese Endothelschicht stellt eine Barriere zwischen Gefäßwand und Blut dar. Sie gibt der Gefäßwand eine glatte Oberfläche, deren Unversehrtheit die Blutgerinnung und Entzündungsreaktionen in der Gefäßwand verhindert. Die *Media* besteht aus annähernd zirkulär verlaufende Strukturen: glatte Muskelzellen, elastische Fasernetze, Kollagenfasern und Grundsubstanz (Proteoglykane). Die *Externa* ist, wie die *Intima*, aus längsgerichteten Elementen zusammengesetzt, aus Bindegewebe und, bei Venen, aus glatter Muskulatur [74]. Die drei Wandschichten sind bei Arterien und Venen in Anpassung an deren unterschiedliche Aufgaben im Kreislauf verschieden gebaut, die Kapillarwand ist auf die *Tunica intima* reduziert [48]. Durch Einwirkung von zahlreichen exogenen und endogenen Faktoren, wie Entzündungsmediatoren (z.B. Histamin), Komplementfaktoren, artherogenetischen Molekülen (z.B. modifizierte Low-density Lipoproteine, Thrombin) [96] oder Bakterientoxine (z. B. Lipopolysaccharide, Endotoxine) können Endothelien geschädigt werden. Im einfachsten Fall kommt es zu einer reversiblen Auflockerung der Zellkontakte. Dabei kommt es zur Abrundung der Zellen durch Aktivierung von aktinhaltigen und kontraktilen Proteinen. Es entstehen interzelluläre Lücken. Dadurch gelangen Flüssigkeit und Blut transendothelial in tieferliegende Schichten und führen so zu einem Ödem. Thrombozyten adhäreren an das freiliegende Kollagen, Monozyten wandern in die Gefäßwände ein und durch weiterer Freisetzung von Prostaglandinen,

Interleukinen und Komplementaktivierung kommt es zu Blutgerinnung und Entzündungsreaktionen. Diese Mechanismen führen unter physiologischen Bedingungen zu einer Ausheilung des geschädigten Gewebes. Ist die Heilung gestört, kommt es zu einem bleibenden Funktionsausfall, z.B. zu Arteriosklerose [83, 96, 108, 109, 128]. Die Plasmaprotease Thrombin ist Teil der Koagulationskaskade und induziert auch Endothelzellkontraktion. Im Falle einer überschießenden Entzündungsreaktion kommt es zur massiven Endothelzellkontraktion mit starkem Flüssigkeitsverlust bis hin zum kardiovaskulären Schock [50]. Es konnte gezeigt werden, daß dieser Thrombineffekt zum Teil auf einer Aktivierung von Rho und Rho-Kinase beruht. Dadurch kommt es zu einer zeitweiligen Inaktivierung der Myosinleichtkettenphosphatase und einem Anstieg der Myosinleichtkettenphosphorylierung [12, 32]. Die Thrombin-stimulierte Aktinstreßfaserausbildung über Myosinleichtkettenphosphorylierung kann durch Mikroinjektion von i) C3-Transferase, von ii) isolierter Rho-bindender Domäne von Rho-Kinase oder von iii) MLC Phosphatase in Endothelzellen verhindert werden. Neben Thrombin konnte auch bei Stimulation von Endothelzellen mit „mildly oxidised low-density- Lipoprotein“(moxLDL) und LPA eine Zellkontraktion und Aktinstreßfaserbildung gesehen werden. Dieser Effekt konnte durch LPA-Inhibitoren gehemmt werden [111]. Weder moxLDL, noch LPA steigerten die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration in HUVEC. Aber ihr Effekt auf Aktin konnte ganz durch C3-Transferase und Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 gehemmt werden [34, 35]. Genauso wie Thrombin zeigt moxLDL einen zeitweiligen, minutenlangen Abfall der MLC-Phosphataseaktivität, die parallel zum Anstieg der MLC-Phosphorylierung [34]. LPA induziert MLC-Phosphorylierung via Rho/Rho-Kinase-vermittelte Hemmung von MLC-Phosphatase in HUVEC. Diese MLC-Phosphorylierung kann durch den Transkriptionshemmer Actinomycin

D und den Translationshemmer Cycloheximide gehemmt werden [35].

Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß cAMP-erhöhende Medikamente, von denen bekannt ist, daß sie vasoprotektiv sind, zu einer Hemmung der LPS-Wirkung in HUVEC über Hemmung des Rho/Rho-Kinase-Signalwegs führen [35]. Das bedeutet, daß Medikamente, die als Rho-Inhibitoren wirken, in der Zukunft vielleicht nützlich für die Protektion des Gefäßendothels sein könnten. Es zeigt sich außerdem, daß sie Endothelzellen vor der schädlichen Wirkung von Thrombin und oxLDL in vitro und in Tiermodellen schützen können [36]. Wieder scheint hier die Hemmung der Rho-vermittelten MLC-Phosphorylierung verantwortlich zu sein. Zusammenfassend kann man sagen, daß die Inaktivierung von Rho zu einem Schutz des Endothels führt [2, 33].

Endothelzellkontraktion ist vor allem von dem Phosphorylierungszustand der Myosinleichtketten abhängig. Dieser wird von zahlreichen Faktoren und Signalwegen beeinflusst und seine Regulation ist stark zelltypabhängig.

## 2.5 Die Myosinleichtkette

Myosin sind in Muskel- und Nichtmuskelzellen sowie in Zellen höherer Pflanzen und eukaryotischer Mikroorganismen enthalten. Besonders eingehend hat man sich mit Myosin Typ 2 aus Muskel- und Nichtmuskelzellen beschäftigt. Es besteht aus einem globulären Anteil, der eine Bindungsstelle für Aktin aufweist, und einem fibrillärem Abschnitt, der nach Aggregation Filamente bildet. Myosin Typ 1 enthält nur den globulären, Aktin-bindenden Teil des Moleküls, während der stabförmige „Schwanz“ fehlt. Diese Myosinmoleküle kommen nur in Nichtmuskelzellen vor und sind an verschiedenen Zellbewegungen beteiligt. Myosin Typ 2 besteht aus einem langen stabförmigen „Schwanz“ und zwei globulären Köpfen, die sich an einem Ende befinden. Ein Myosinmolekül ist immer aus zwei identischen schweren Ketten (MG 230 kDa) und zwei Paar leichter Ketten (MG 15 und 22 kDa) zusammengesetzt.

Die Kontraktion glatter Muskelzellen wird durch die Calcium-abhängige Aktivierung und durch ein kompliziertes System von Phosphorylierung und Dephosphorylierung der leichten Myosinketten gesteuert. Die Aktin-stimulierbare ATPase-Aktivität des Myosins wird durch eines der beiden Leichtketten- (LC-)Paare gehemmt. In glatten Zellen wird die Hemmwirkung des LC-Paares nicht direkt durch  $Ca^{2+}$  aufgehoben, sondern durch eine Phosphorylierung mit Hilfe der *Myosin-Leichtketten-Kinase (MLC-Kinase)*, wodurch eine Kontraktion stattfindet. Da aber  $Ca^{2+}$  für die Aktivierung der LC-Kinase benötigt wird, reguliert der  $Ca^{2+}$ - Spiegel das Ausmaß der LC-Phosphorylierung und damit die Kontraktion.  $Ca^{2+}$  wird zunächst durch Calmodulin gebunden, wodurch sich der entstandene Komplex mit der MLC-Kinase vereinigt und dabei das Enzym aktiviert.

Tritt Myosin mit Actin in Wechselwirkung erfolgt eine Muskelkontraktion.



### 3 Zielsetzung und Fragestellung

Viele Reaktionen in Endothelzellen laufen unter Vermittlung kleiner G-Proteine ab. In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe eines Toxins (CNF) vor allem die Rolle der GTPase Rho bei Aktinfaserbildung, MLC-Phosphorylierung und MLC-Phosphatase untersucht werden.

Nacheinander sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- 1.) Wie verhält sich die MLC-Phosphorylierung nach CNF-Stimulation?  
Lassen sich diese Effekte durch Rho-Kinase-Hemmer beeinflussen?
- 2.) Kommt es zu einer Aktinfaserumorganisation? Ist Rho in diesem Signalweg involviert?
- 3.) Wie verhält sich die MLC-Phosphatase?
- 4.) Wie verhalten sich Rac und CDC42 nach CNF-Stimulation?
- 5.) Kommt es bei der Zellausbreitung nach CNF-Stimulation zu einer Inaktivierung von Rho?

## 4 Material

### 4.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien stammen von der Firma Sigma (Ausnahmen sind besonders gekennzeichnet).

### 4.2 Reagenzien und Toxine

Y-27632 von Calbiochem, Bad Soden, Deutschland

Die Expressionssvektoren von GST-PAK-CRIB und GST-C21 sind Geschenke von Dr. Jahn Collard (Amsterdam, Netherlands).

Der Vektor von GST-N17Rac1 ist ein Geschenk von Dr. Alan Hall (MRC Laboratory, London, UK).

Cytotoxic necrotizing factor-1 wurde amplifiziert mit PCR-Primer (5'CACAGAGGAGTTAAAGGATCCATGGGTAACCAATGGC3' und 5'GGCCAATAAATAATTTGAATTCTCAAAATTTTTTTTG3') und geklont in *Bam*HI und *Eco*RI Restriktions Stellen von Vektor pGEX-2T (Pharmacia, Freiburg). Der Vektor wurde in *E.coli* Strängen DH5 $\alpha$  transformiert. Die Proteinexpression wurde mit 20 $\mu$ M IPTG induziert.

### 4.3 Antikörper

1. Antikörper:

Aktin (Rhodamin Phalloidin)

Anti-Phospho-MLC, polyklonal

2. Antikörper:

Anti-mouse/rabbit/goat-horseradish

Anti-mouse/rabbit- IgG Antikörper

## 4.4 Puffergemische

### Westernblot:

#### SDS-Page Ladepuffer:

Tris (ultra)	0,025 M
Glycerin	0,192 M
SDS (Laurylsulfat)	0,1%
pH 7,4	

#### TBST:

Tris	10mM
NaCl	150mM
Tween 20	0,05%
pH 7,4	

#### Lämmli-Puffer (Sample Puffer) 5x:

Tris-HCl	5 ml 0,5 M (pH 6,8)
SDS	0,4%
Glycerol	2ml
SDS	0,8g
Bromphenolblau	1ml 0,5%
Aqua dest.	2ml

Vor Verwendung mit Aqua dest. auf 1x Puffer verdünnen + 5% Mercapto-Ethanol.

**Resolvinggel (12,5%):**

H <sub>2</sub> O	3,2 ml
Resolvingpuffer	2,5 ml
Acrylamid	4,16 ml
APS(100mg/ml)	50 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l

Rezept für zwei Gele mit 1mm Dicke.

**Stockingel:**

H <sub>2</sub> O	1,55 ml
Stocking	0,625 ml
Acrylamid	0,325 ml
APS	12,5 $\mu$ l
TEMED	2,5 $\mu$ l

**Blotting:**

**Anodenpuffer 1:**

Tris	0,3 M
Methanol	20%

**Anodenpuffer 2:**

Tris	25 mM
Methanol	20%

**Kathodenpuffer:**

e-Aminocarbonsäure	40 mM
Methanol	20%

**Blottingmilk:**

BSA	2%
Milkpulver	5% in TBST

**Entwicklerlösungen:**

Pierce No. 1856135

Pierce No. 1856136

(Super Signal Chemiluminescent Substrate stable peroxide Solution und Luminal/Enhancer)

**Sonstige Materialien:**

1 Gelkassette (Glasplatten, Spacer, Seitenteile, ect. )

Isopropanol und Aceton zum Reinigen

**Immunfluoreszenz:**

3,7% Formalin in PBS

Methanol oder Aceton: eiskalt

**Mikroinjektion:**

**Mikroinjektionspuffer:**

NaCl 150 mM

Tris 50 mM

*MgCl<sub>2</sub>* 5 mM

pH 7,5

## 4.5 Aufreinigung von Myosin

### Homogenisierungspuffer:

Tris-Aminomethan	50 mM
EDTA	0,1 mM
$\beta$ - Mercaptoethanol	28mM
Leupeptin	1 $\mu$ g/ml
Pepstatin	1 $\mu$ g/ml
Pefablock	1 $\mu$ g/ml
Aprotinin	1 $\mu$ g/ml
pH	7,5

### Salzangereicherter Puffer:

NaCl	0,6 M
Tween-20	0,1 %
Leupeptin	1 $\mu$ g/ml
Pepstatin	1 $\mu$ g/ml
Pefablock	1 $\mu$ g/ml
Aprotinin	1 $\mu$ g/ml

### Assaypuffer:

Tris	50 mM
EDTA	0,1 mM
$\beta$ - Mercaptoethanol	28mM
pH	7,0

## 5 Methoden

### 5.1 Zellkultur

In allen Versuchen, die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden, werden humane umbilikale venöse Endothelzellen (=HUVEC) verwendet. Die Endothelzellen werden aus Venen von menschlichen Nabelschnüren herausgelöst und in Zellkulturkolben mit  $75\text{cm}^2$  Wachstumsfläche bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank bebrütet. Um die Zellen nach ausreichendem Wachstum zu teilen, werden sie erst einmal mindestens drei mal mit 10 ml sterilem PBS gewaschen, um Nährmedium vollständig zu entfernen. Nach gründlichem Absaugen werden die Zellen mit 4 ml Trypsin behandelt. Sobald sich die Zellen von der Unterfläche ablösen, stoppt man diese Reaktion durch Zugabe von 10 ml Nährmedium. Die Zellen werden dann für 5 Minuten bei  $24^\circ\text{C}$  auf 800 Upm (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert. Um das Trypsin vollständig zu entfernen wird der Überstand vollständig abgesaugt. Die verbleibenden Zellen werden mit frischem Nährmedium wieder aufgelöst. Dann werden die Zellen mit einer Konzentration von 200.000 Zellen pro ml auf kollagenisierte Kolben, „six-well-Platten“ oder Glasdeckgläschen ausgesät (24 h Vorinkubation mit  $100\mu\text{g/ml}$  Kollagen-G). Die Zellen erhalten alle 3-4 Tage einen Mediumwechsel (Endothelial Wachstumsmedium + ECGS/H2 (Endothelial cell growth supplement/Heparin)+ 2%FCS), sollten aber spätestens 24 Stunden vor dem Versuch den letzten Wechsel erhalten. Die Zellen wachsen ca. 10 Tage bis sich ein konfluenter Monolayer gebildet hat.

### 5.2 Immunfluoreszenzfärbung

Um die Umorganisation des Aktinskeletts in Endothelzellen beurteilen zu können, werden HUVEC auf Deckgläschen ( $2 \times 10^4$  Zellen/ $\text{cm}^2$ ) ausgesät und

im konfluenten Zustand entweder mit CNF stimuliert. Um die Reaktion zu stoppen, werden die Zellen mit 3,7%igem Formaldehyd behandelt und anschließend einmal in PBS ( 1mM  $Ca^{2+}$  und 1mM  $Mg^{2+}$  ) gewaschen. Danach werden sie für 5 Minuten in  $-20^{\circ}C$  kaltem Aceton inkubiert. Nachdem die Zellen luftgetrocknet wurden, werden sie für 20 Minuten mit einer Rhodamin-Phalloidin-Lösung (1:100 in PBS) inkubiert. Anschließend werden sie drei mal je 5 Minuten in PBS gewaschen bevor sie auf Objektträger mit Moviol fixiert werden.

Die mikroskopische Beurteilung erfolgt mit einem LEICA RBM 3-Fluoreszenzmikroskop.

### 5.3 Rekombinante Proteine

Rekombinante C3-Transferase, CNF, PAK-CRIB-Domäne, C21-Rho-bindende Domäne (RBD) der Rho-Kinase und N17 Rac werden [93] als Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase (GST) in *E. coli* exprimiert und durch Affinitätschromatographie gereinigt. Der GST-Träger werden durch Thrombin von den Fusionsproteinen abgespalten. Thrombin wird dann durch Inkubation mit p-Aminobenzamin entfernt und anschließend werden die Proteine konzentriert und mit Mikroinjektionspuffer dialysiert. Mit Hilfe von SDS-PAGE und Coomassie Staining wird die Reinheit der Proteine und das vollständige Entfernen von Thrombin überprüft. Die Proteinkonzentration wird determiniert mit BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford. II. ) mit BSA als Kontrolle. In den Kontrollen zeigen sich nur reine Proteine mit einer einzelnen Bande.

### 5.4 Mikroinjektion

Um spezifische Effekte an einzelnen Zellen unabhängig vom Zellverband zu untersuchen, eignet sich die Mikroinjektion von Proteinen in die einzelne Zelle



sehr gut.

Die Mikroinjektion wird mit Hilfe des Eppendorf Transjektor 5246 und dem Eppendorf Manipulator 5171 durchgeführt. Die Zellen werden auf speziellen Deckgläschen mit mikroskopisch erkennbarem Gitternetz ausgesät. N17Rac, PAK-CRIB und RBD werden zusammen mit Ratten IgG in Mikroinjektionspuffer verdünnt und mit einer Konzentration von  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in das Zytoplasma der HUVEC injiziert. Die Kontrollzellen werden nur mit Ratten IgG (GST) in einer Konzentration von 5 mg/ml injiziert. Das mikroinjizierte Volumen beträgt ca.  $1-3 \times 10^{-15}\text{l}$  pro Zelle. Durch die Coinjektion mit Ratten IgG können die injizierten Zellen mit FITC-konjugiertem Anti-Ratten IgG im Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden. Eine weitere Hilfe stellt das Gitternetz im Deckgläschen dar, an Hand dessen Koordinaten man die Zellen besser auffinden kann. Für jedes Experiment werden ungefähr 100 Zellen injiziert.

## 5.5 Phosphorylierung der Myosinleichtketten

Um Veränderungen in der Konzentration oder im Phosphorylierungszustand von Proteinen feststellen zu können, eignet sich die Methode des Western Blots sehr gut. Die Zellen werden in sogenannten Six-Well-Platten ausgesät.

Die konfluenten Endothelzellen werden für drei Stunden mit CNF stimuliert. Danach werden sie einmal mit PBS gewaschen. Zur Lyse gibt man  $150\mu\text{l}$   $95^\circ\text{C}$  heißen Laemmli-Puffer auf die Zellen und mit Hilfe eines Schabers werden die Zellen von der Unterfläche abgekratzt. Dieses Zell-Puffergemisch wird dann für 5 Minuten bei  $95^\circ\text{C}$  in einem Rüttler gemischt.

Die Auftrennung der Proteine erfolgt über SDS-PAGE Gele in einer Gelkassette. Die Proteine werden auf Minigele aufgetragen und elektrophoretisch bei 100 V (30 Minuten), dann bei 150 V aufgetrennt.

Es wurde 30  $\mu$ l Zellprobe (entspricht  $3,0 \times 10^5$  Zelladäquate) pro Gelspur geladen. Zur Kontrolle der Proteinauftrennung wurde bei allen Gelen ein vorgefärbter Molekulargewichtsmarker (Bio Rad München) mit Proteinen von MG 47 kDa, 84 kD, 116 kDa und 208 kDa. Die Proteine werden dann auf PVCF-Membrane mit Verwendung von Mini Protean II Elektrophorese Zellen (Bis Rad) geblottet. Danach wird die Membran für eine Stunde in Blottingmilch geblockt. Dadurch wird die unspezifische Antikörperbindung vermindert. Anschließend wird die Membran für jeweils fünf Minuten drei mal mit TBST gewaschen. Jetzt wird die Membran mit dem ersten Antikörper anti-phospho-MLC-Antikörper (über Nacht, 1:500 in TBST) inkubiert. Nach abermals drei Waschsritten mit TBST je 5 Minuten, wird die Membran mit dem zweiten Antikörper (Anti-Hase-Antikörper) für eine Stunde inkubiert. Wieder folgen drei Waschsritte mit TBST. Anschließend wird die Membran für sieben Minuten in Chemolumineszenzlösung inkubiert und in einer Fotokammer auf Kodak X-OMAT Filme exponiert. Anschließend werden die sichtbaren Banden densitrometrisch ausgewertet.

## **5.6 Aufreinigung von Myosin**

Die Präparation der myosinangereicherten Fraktion wurde, wie bei Verin [120] beschrieben, durchgeführt. Zunächst werden HUVEC in Zellkulturkolben mit 100 mm Durchmesser für 10 Tage kultiviert. Die konfluenten Zellen werden dann zwei mal mit eiskaltem PBS unter Zugabe von 200 $\mu$ l Homogenisierungspuffer gewaschen. Das so gewonnene Lysat wird bei 80°C inkubiert, mit einem Schaber vom Kolbenboden abgelöst und durch mehrmaliges Suspendieren mit einer Spritze homogenisiert. Anschließend werden die Homogenate für eine Stunde bei 4°C mit einem stark mit Salzen angereicherten Puffer behandelt und dann für 30 Minuten bei 4°C und 4500g zentrifugiert. Das erhaltene Lysat wird zehn mal mit einem speziellen Asseypuffer verdünnt

und für 30 Minuten bei 4°C und 10.000 g zentrifugiert. Dieses Pellet wird in 10  $\mu$ l des salzreichen Puffers gelöst. Diese Myosinangereicherte Fraktion enthält v. a. PP1- und nahezu keine PP2- Aktivität. Um die Konzentrationen von PP1 in den einzelnen Proben zu vergleichen und sicher zu sein, daß sie gleich sind, wird ein Western Blot mit PP1 Antikörpern durchgeführt.

## 5.7 Messung der MLC-Phosphatase-Aktivität

Die MLC-Phosphatase wird in den Myosin angereicherten Fraktionen mit Hilfe des Protein Phosphatase Assay System (GIBCO) nach Anleitung der Firma ermittelt. Dieses System basiert auf der Methode von Chisholm und Cohen, 1988 [25].

Die Phosphorylase b (0,1 mM in vitro) wird durch eine Phosphorylase-Kinase (0,1 mg/ml) in Anwesenheit von  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (5 MCi/ml in Phosphorylierungspuffer, eine Stunde Inkubation bei 30°C) phosphoryliert und ist somit ein Substrat für PP1 und PP2. Diesem Zellhomogenat wird Okadaic-Säure (finale Konzentration 1 nM) hinzugefügt, um selektiv PP2 zu hemmen. Die PP1 Aktivität dieses Zellhomogenats wird quantifiziert durch die Messung der abnehmenden Radioaktivität von [ $^{32}\text{P}$ ]-Phosphorylase b. Für diesen Zweck wird die Myosin angereicherte Fraktion mit 30 ml Assaypuffer (+ 6,25 mM Caffein) verdünnt und dann mit 20 ml radioaktivem Phosphatasesubstrat vermischt. Dieses Gemisch reagiert für zehn Minuten bei 30°C, um dann mit eiskalten 20%igen TCA („Trichloroacetic acid“) gestoppt zu werden. Die Proben werden dann auf Eis für 10 Minuten inkubiert und dann bei 12.000g für 3 Minuten zentrifugiert. Die zurückbleibende Radioaktivität wird mit Hilfe des *WallackR* 1410 liquid Scintilationszählers gemessen und in einer Grafik skizziert.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Myosinphosphorylierung

Um die MLC-Phosphorylierung in HUVEC nach Stimulation mit CNF zu messen, wurden Western Blots mit spezifischen Antikörpern gegen phosphorylierte MLC durchgeführt. Die spezifischen Banden, die mit dem Anti-Phospho-Myosin-Antikörper reagieren, wurden densitometrisch analysiert.

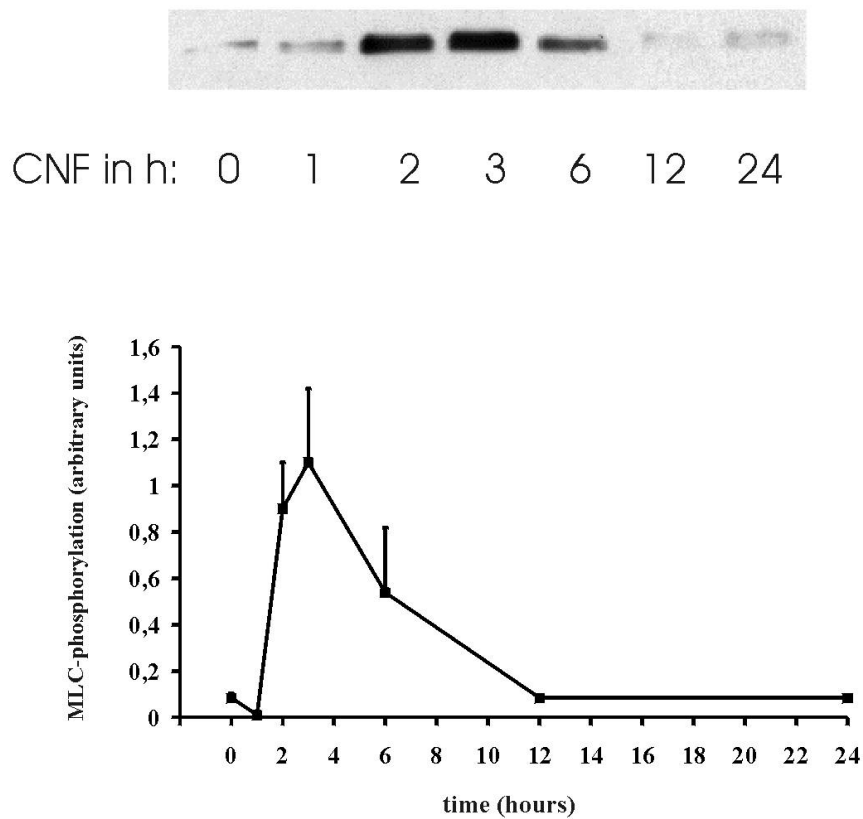


Abbildung 6: **CNF induzierte MLC-Phosphorylierung**; Western-Blot mit Anti-Phospho-Myosin-Antikörper angefärbt

Das Bild (6) zeigt, daß CNF ( $2\mu\text{g/ml}$ ) MLC-Phosphorylierung in der ersten Stunden nach Stimulation auslöst. Die MLC-Phosphorylierung erreicht nach

drei Stunden ein Maximum und fällt dann auf Grundwerte nach 6 bis 24 Stunden Exposition ab. Abbildung (6) zeigt einen repräsentativen Western-Blot.

Um zu untersuchen, ob CNF MLC-Phosphorylierung über Rho/Rho-Kinase-Aktivierung induziert, wurden die Zellen mit dem spezifischen Rho-Kinase-Hemmer Y-27632 (20 min., 10 $\mu$ M) oder mit dem Rho-Hemmer C3-Transferase von *Clostridium botulinum* (24h, 5 $\mu$ g/ml) vorinkubiert und dann mit CNF (3h, 2 $\mu$ g/ml) stimuliert. Die MLC-Phosphorylierung wurde dann gemessen.

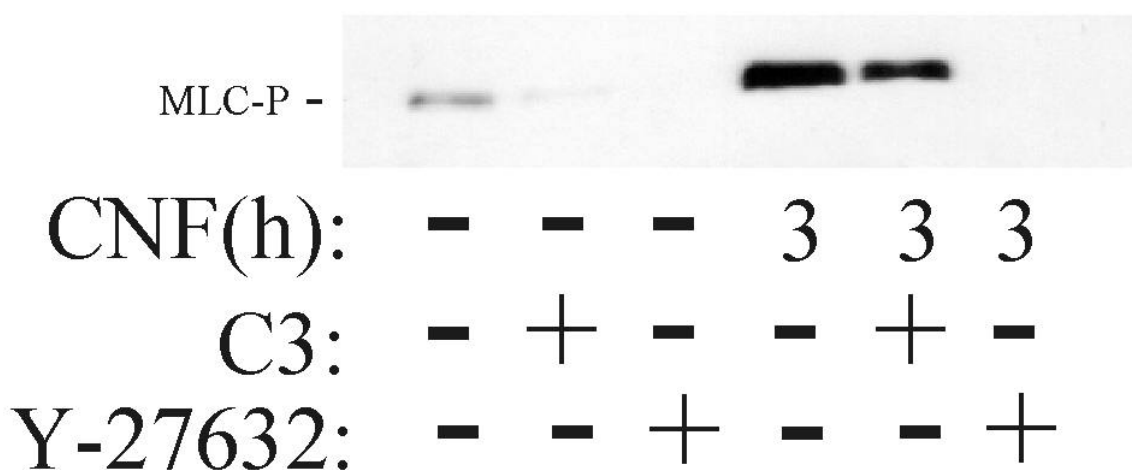


Abbildung 7: **Hemmung von CNF-stimulierten Zellen durch C3-Transferase oder Y-27632;** Färbung nach phosphorylierten MLC

Der spezifische Rho-Inhibitor C3-Transferase reduziert den CNF-Effekt. Abbildung (7) zeigt, daß CNF-induzierte MLC-Phosphorylierung durch Vorinkubation mit Y-27632 verhindert werden kann. Diese Daten zeigen, daß CNF MLC-Phosphorylierung hauptsächlich über Rho/Rho-Kinase induziert wird. Aber es ist bis jetzt noch unklar, warum MLC nach 6 Stunden trotz weiterer CNF-Anwesenheit wieder dephosphoryliert wird.

## 6.2 Aktinstreißfaserbildung

Aktivierung von Rho/Rho-Kinase führt zur Inaktivierung von MLC-Phosphatase und somit zur MLC-Phosphorylierung, Bildung von F-Aktinfaserbündel und Endothelzellkontraktion. Ob auch CNF über Rho eine Endothelzellkontraktion auslöst, war Gegenstand des nächsten Versuchs. HUVEC wurden mit CNF ( $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für verschiedene Zeitintervalle exponiert, fixiert und mit Rhodamin-Phalloidin auf F-Aktinfaser angefärbt.

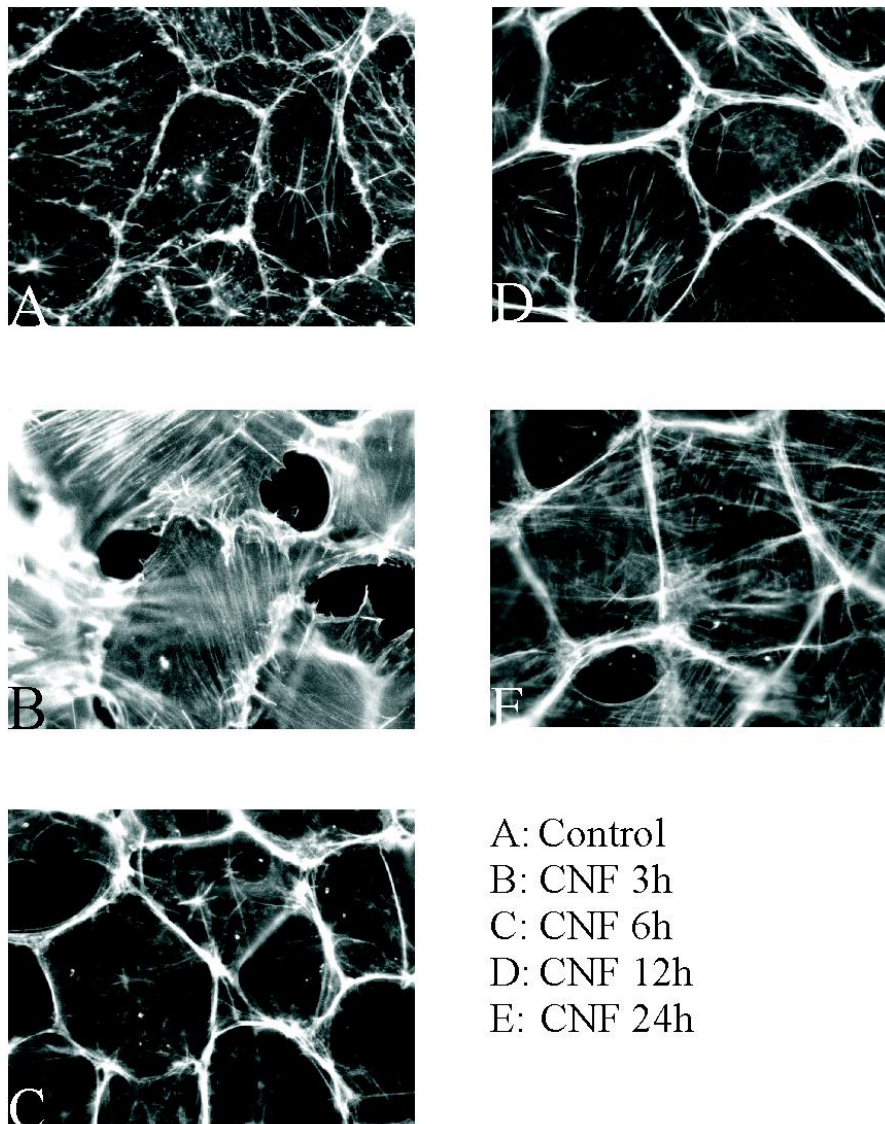


Abbildung 8: **CNF-Stimulation** Färbung mit Rhodamine-Phalloidine

Die Kontrollzellen zeigen einen peripheren Aktinring und kein intrazelluläres F-Aktin. Zellen, die für drei Stunden mit CNF inkubiert wurden, sind kontrahiert und zwischen den Zellen zeigen sich Lücken. Nach sechs Stunden CNF-Inkubation sind die Zellen ausgebreitet, zeigen aber immer noch Streßfasern und interzelluläre Lücken. Nach 12 oder 24 Stunden zeigt sich ein dichter peripherer Aktinring und keine intrazellulären Streßfasern mehr. Die Daten zeigen, daß CNF zuerst während der ersten 3 Stunden eine Kontraktion in den HUVEC induziert, der dann eine Zellausbreitung und eine Ausbildung von einem peripheren Aktinring folgt.

Um die Beteiligung von Rho und Rho-Kinase durch CNF-Stimulation zu untersuchen, wurden Endothelzellen mit der Rho-bindenden Domäne von Rho-Kinase (RBD) mikroinjiziert oder mit dem Rho-Kinase-Hemmer Y-27632 vorbehandelt. Dann wurden die Zellen für 3 Stunden mit CNF stimuliert.

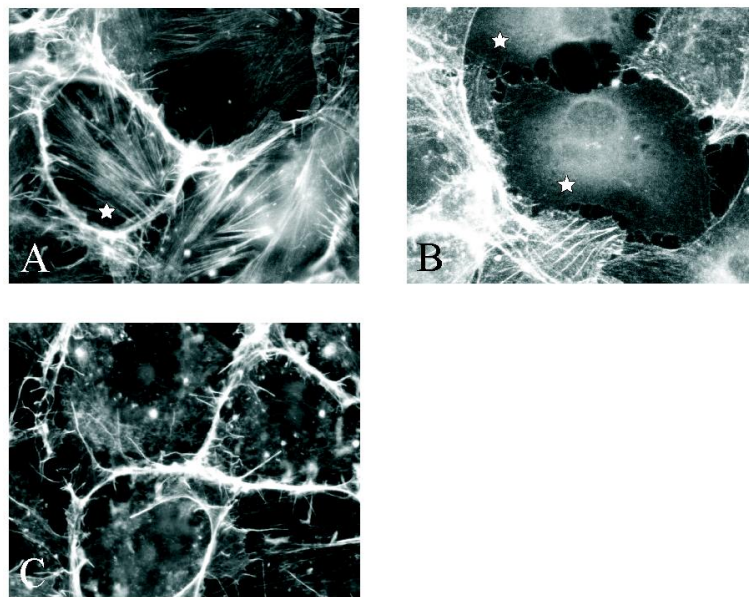


Abbildung 9: **Hemmung von CNF-stimulierten Zellen durch RBD und Rho-Kinase-Hemmer Y-27632;** A: Mikroinjektion mit GST, B: Mikroinjektion mit RBD, C: Rho-Kinase Hemmer Y-27632; Färbung mit Rhodamine Phalloidin

Auf dem Bild A und B wurden die Zellen mit Stern mikroiinjiziert. A zeigt eine Kontrolle mit GST-Mikroiinjektion. Hier zeigt sich keine Hemmung der CNF- Wirkung. Die Zelle, die mit der Rho-bindenden Domäne der Rho-Kinase mikroiinjiziert wurde (Bild B) und die Zellen, die mit dem Inhibitor Y-27632 behandelt wurden (Bild C), zeigen eine eindeutige Hemmung der CNF-induzierten Aktinstrebfaserbildung. Daraus läßt sich schließen, daß Rho und Rho-Kinase für die Wirkung von CNF in HUVEC wichtig sind.

Um die Rolle von Rac und CDC42 bei der CNF-stimulierten MLC-Phosphorylierung besser untersuchen zu können, wurde den Zellen isolierte PAK-CRIB oder N17Rac mikroiinjiziert. (PAK-CRIB bindet und inaktiviert Rac und CDC42.) Nach der Mikroiinjektion wurden die Zellen wie gewohnt mit CNF über 3 Stunden stimuliert. Die Zellen wurden dann mit anti-phospho-MLC-Antikörpern gefärbt.

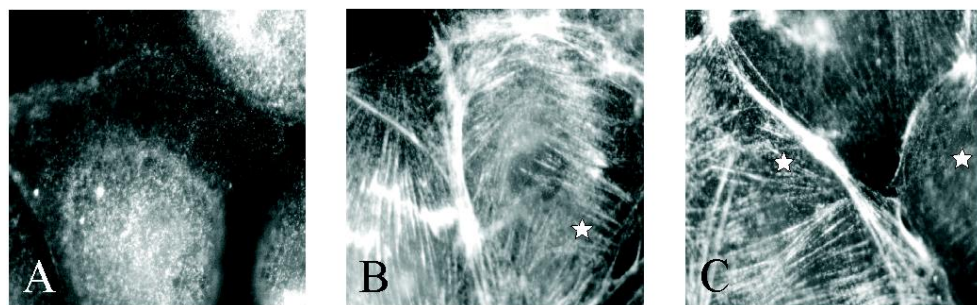


Abbildung 10: **Myosin-Umverteilung in HUVEC** A: Kontrolle, B: CNF und Mikroiinjektion mit PAK-CRIB, C: CNF und Mikroiinjektion mit N17Rac; Färbung mit anti-phospho-MLC-Antikörpern

Die Bilder zeigen CNF induzierte Häufungen von Phospho-Myosin entlang der Strebfaser sowohl in den Kontrollzellen, als auch bei den mikroiinjizierten Zellen. Dieser Effekt konnte nicht durch die Mikroiinjektion von PAK-CRIB oder N17Rac verhindert werden. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die CNF-induzierte MLC-Phosphorylierung und Kontraktion allein durch Rho und Rho-Kinase und nicht durch Rac und CDC42 kontrolliert wird.



### 6.3 Myosin-Leichtketten-Phosphatase

Wie bereits bekannt, wird MLC durch die MLC-Phosphatase dephosphoryliert. Die Endothelzellen zeigen in den ersten sechs Stunden der CNF-Stimulation eine Zunahme der MLC-Phosphorylierung und eine Zellkontraktion, dann aber einen Abfall und eine zunehmende Zellausbreitung. Dieses Phänomen könnte durch die Aktivität der MLC-Phosphatase möglicherweise erklärt werden. Um diese Behauptung zu beweisen, wurde die MLC-Phosphatase-Aktivität nach CNF-Stimulation ( $2\mu\text{g/ml}$ ) für verschiedene Zeitwerte gemessen.

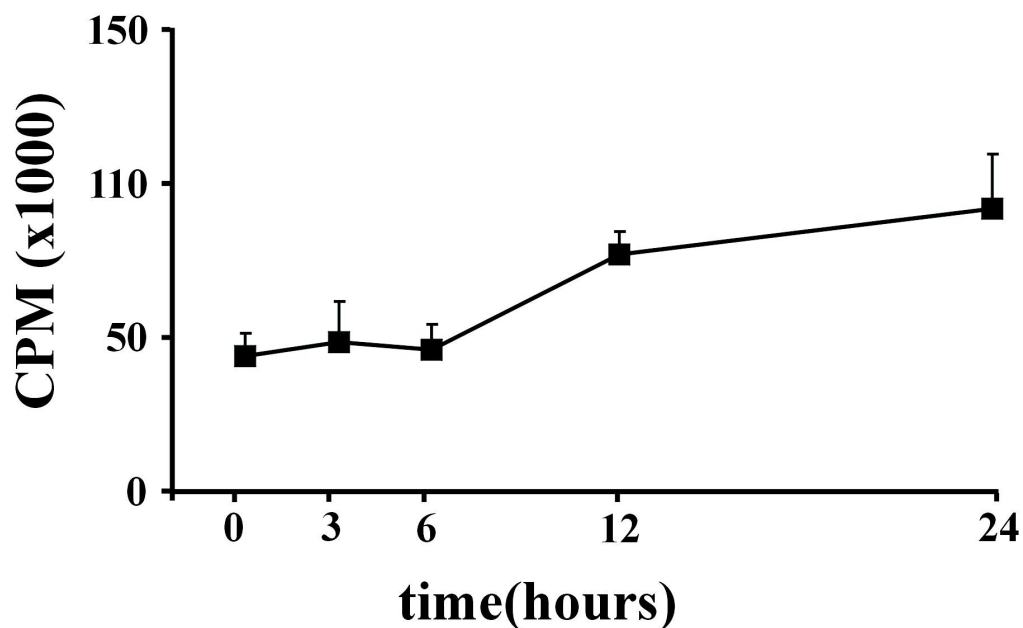


Abbildung 11: CNF-stimulierte HUVEC; MLC-Phosphatase-Aktivität, densitometrische Auswertung

Abbildung (11) zeigt die MLC-Phosphatase-Aktivität in Endothelzellen, die mit CNF stimuliert wurden. Überraschenderweise zeigt sich in den ersten sechs Stunden eine konstante Phosphataseaktivität, obwohl in diesem Zeitraum der größte Anstieg der MLC-Phosphorylierung zu verzeichnen

war. Nach 12 bis 24 Stunden allerdings verdoppelt sich fast die Phosphataseaktivität. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß die CNF-induzierte MLC-Phosphorylierung durch Rho und Rho-Kinase nicht mit einem Abfall der MLC-Phosphatase zusammenhängt. Der Abfall der MLC-Phosphorylierung und die Zellausbreitung nach 12 bis 24 Stunden könnte durch den Anstieg der MLC-Phosphatase im gleichen Zeitraum erklärt werden.

## 7 Diskussion

Viele Reaktionen in Endothelzellen laufen unter Vermittlung kleiner G-Proteine (z.B. Ras, Rab, Ran, ARF oder Rho) ab. Diese unterliegen einem intra- und extrazellulären Regulationssystem. In dieser Arbeit wurde über den Effekt von CNF („*Cytotoxic necrotizing factor*“ von *E. coli*) in HUVEC, vor allem die Rolle der GTPase Rho bei Aktinfaserbildung, MLC-Phosphorylierung und MLC-Phosphatase berichtet. Es wird gezeigt, daß Aktivierung von Rho durch CNF in HUVEC nur zu einem zeitweiligen Anstieg der MLC-Phosphorylierung und Zellkontraktion führt und diese von einer anhaltenden MLC-Dephosphorylierung und einer Zellausbreitung gefolgt wird.

CNF stimulierte Zellen zeigen eine maximale MLC-Phosphorylierung nach ca. 3 Stunden. Diese fällt dann nach 6-24 h auf ihre Grundwerte zurück. Die MLC-Phosphorylierung kann durch den spezifischen Rho-Kinase-Hemmstoff Y-27632 blockiert werden. Daraus läßt sich folgern, daß MLC nach Stimulation von HUVEC mit CNF wohl durch die Rho-Kinase phosphoryliert wird.

Neben dem Rho-Kinase-Hemmstoff Y-27632 konnte auch der spezifische Rho-Inhibitor C3-Transferase die MLC-Phosphorylierung hemmen. Allerdings zeigt sich im Western-Blot noch eine geringe Restphosphorylierung. Diese kann versuchsbedingt an einer zu niedrigen Konzentration von C3-Transferase liegen. Es konnte bereits in anderen Versuchen gezeigt werden, daß die MLC-Phosphatase in Abhängigkeit der C3-Transferase-Konzentration nach Thrombin-Stimulation in HUVEC inaktiviert wird [32]. Alternativ könnte nach einer Blockierung von Rho die Rho-Kinase über einen alternativen, dann überwiegenden Signalweg aktiviert werden [24]. Hier kann gezeigt werden, daß es nach CNF-Stimulation zu einer Aktivierung von Rho [45, 103, 75] und Rho-Kinase und damit zu einer MLC-Phosphorylierung kommt.

Ein anderes Substrat der Rho/Rho-Kinase ist die MLC-Phosphatase.

Vorarbeiten zeigen, daß die MLC-Phosphatase nach Stimulation von HUVEC mit PMT über Rho/Rho-Kinase inaktiviert wird und damit zu einer MLC-Phosphorylierung führt [33]. In dieser Arbeit kann zwar eine MLC-Phosphorylierung nach CNF-Stimulation durch Rho/Rho-Kinase gezeigt werden, allerdings kommt es während der Zeit der maximalen Phosphorylierung von MLC zu keiner Änderung der MLC-Phosphatase-Aktivität. Dies läßt vermuten, daß die MLC unabhängig von der MLC-Phosphatase phosphoryliert wird. Die MLC scheint von der MLC-Phosphatase entkoppelt zu sein. Die Rho-Kinase scheint unter diesen Umständen MLC direkt zu phosphorylieren [13]. Alternativ kann dieser Effekt dadurch erklärt werden, daß parallel zu einem Rho/Rho-Kinase-Signalweg, noch andere Signalwege aktiviert werden, die die Phosphorylierung der MLC-Phosphatase zunächst hemmen [120], oder CNF selbst die Verbindung von Rho-Kinase zur MLC-Phosphatase blockiert [3].

Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß bei der CNF-Stimulation von HUVEC nicht nur Rho, sondern auch noch die GTPasen Rac und CDC42 aktiviert werden [4]. Es ist bekannt, daß Rac unter anderem die „myotonic dystrophy kinase related kinases“ (MRCKs) aktivieren, die MLC an der Ser19-Stelle phosphoryliert [77, 24]. Die MRCKs zeigen eine hohe Homologie in ihren katalytischen Untereinheiten zu den der Rho-Kinase. CNF-induzierte MLC-Phosphorylierung könnte auch durch einen „downstream“ Effekt von Rac durch MRCKs entstanden sein. Gegen diese Möglichkeit spricht allerdings, daß Rac/CDC42 Hemmung die MLC-Phosphorylierung nicht hemmen kann [37].

Der Verlauf der MLC-Phosphorylierung ist überraschend. Nach einer maximalen Phosphorylierung nach drei Stunden, zeigt sich nach sechs Stunden eine dauerhafte Dephosphorylierung der MLC trotz bleibender CNF-Stimulation. Die dauerhafte Dephosphorylierung könnte durch die ansteigende

MLC-Phosphatase-Aktivität verursacht sein. Es ist ein überraschendes Ergebnis, daß das Rho aktivierende Toxin CNF die MLC-Phosphatase-Aktivität erhöht, da dies eigentlich durch Rho- oder Rho-Kinase- Inhibitoren geschieht und man eher eine Inhibierung der Phosphatase, wie z.B. bei dem Rho-aktivierende *Pasteurella multocida* Toxin, erwartet hätte [33]. Beispiele für ein Rho inhibierendes Toxin ist die C3-Transferase von *Clostridium botulinum* [7, 33] oder der Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632. Es bleibt zunächst unklar, warum CNF sich wie ein Rho-inhibierendes Toxin verhält.

Eine mögliche Erklärung könnten Interferenzen zwischen Rac- und CDC42-Aktivierung und der Rho vermittelten down-Regulierung der MLC-Phosphatase sein [100]. Es wurde bereits gezeigt, daß in Hela-Zellen eine Rac-Aktivierung zu einer Rho-Inhibierung führt. Ähnlich könnte hier ebenfalls ein CNF-induzierter Anstieg der MLC-Phosphatase auf eine Rho-Hemmung durch aktiviertes Rac zurückzuführen sein.

Andererseits könnte auch der Anstieg der MLC-Phosphatase-Aktivität auf einen Abfall der intrazellulären Rho-Konzentration in HUVEC nach CNF-Stimulation erklärt werden. Es könnte sein, daß die niedrige Restmenge von Rho nach CNF-Behandlung nicht ausreichend ist, um MLC-Phosphatase zu hemmen. In den hier durchgeführten Versuchen bleibt allerdings die Menge an aktiviertem Rho in CNF stimulierten HUVEC im Zeitverlauf gleich. In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß komplette Hemmung der Rho/Rho-Kinase durch C3-Transferase und dem Rho-Kinase Inhibitor Y-2763 die MLC-Phosphatase-Aktivität um das zweifache steigert [3].

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse über MLC-Phosphorylierung, MLC-Phosphatase-Aktivität und Aktinstreßfaserbildung durch Rho, Rac und CDC42 konnten in der eigenen Arbeitsgruppe mittels „pull-down“ Experimente mit der rekombinanten Rho-bindenden Domäne von Rhotekin und der Rac/CDC42-bindenden Domäne von PAK auch biochemisch

bestätigt werden [37].

Einige andere Studien an verschiedenen Zelltypen lassen vermuten, daß die MLC-Phosphorylierung über ein Zusammenspiel zwischen Rho und Rac reguliert wird. Rac, durch seine Effektor PAK („P21-activated kinases“), phosphoryliert und inaktiviert die MLC-Kinase, die mit der Rho-Kinase induzierten MLC-Phosphatase-Hemmung interagiert [101].

Neueste Erkenntnisse haben gezeigt, daß CNF-Vorbehandlung von HUVEC die Zellen vor der Thrombin- ausgelösten Endothelzellkontraktion und somit vor der Thrombin- verursachten erhöhten Endothelpermeabilität schützt [123]. In dieser Studie wurden HUVEC längere Zeit mit CNF stimuliert. Die dadurch ausgelöste angestiegene MLC-Phosphatase-Aktivität soll verantwortlich für einen blockierenden Effekt nach Thrombin-Stimulation sein. Unveröffentlichte Daten bestätigen, daß ein Anstieg der MLC-Phosphatase-Aktivität durch CNF, die Thrombin-Wirkung auf HUVEC verhindert. Die pathophysiologische Rolle der CNF-induzierten MLC-Phosphorylierung ist noch unklar.

In neuesten Untersuchungen fiel eine unterschiedlich lange Aktivierung der einzelnen GTPasen auf [30]. Rac scheint länger in Blasenkarzinomzellen 805G von Ratten aktiviert zu sein, als CDC42 und Rho. Dieses Phänomen läßt sich auf eine unterschiedlich schnelle Aufnahme der GTPasen in Proteasomen zurückführen. Es kommt zu einer CNF-induzierten Degradierung über einen Ubiquitin-Proteasomen Mechanismus. Dieser Effekt läßt sich durch den Proteasomen-Proteasen-Inhibitor Lactacystin verhindern [30, 76]. Obwohl die Degradierung von Rho oder Rac hier keine Rolle in den hier beschriebenen Versuchen spielen wird, so ist es doch denkbar, daß Rho GTPase Effektoren oder Regulatoren genauso durch Proteasome degradiert werden, wenn sie durch CNF aktiviert oder inhibiert werden. Weitere Versuche sollten sich auch auf die Degradierung von Proteinen, „down-stream“ von Rho GTPasen, konzentrieren.



## 8 Zusammenfassung

Bakterielle Toxine aktivieren spezifische Signalwege in humanen Zellen und modulieren so deren Funktion und Morphologie. Ein besseres Verständnis der Effekte von Toxinen auf humane Zellen könnte zur Aufklärung der Pathogenese bakterieller Erkrankungen beitragen. In dieser Arbeit wurde der Effekt des Exotoxins CNF-1 aus *Escherichia coli* auf die Morphologie humaner Endothelzellen (HUVEC) und die beteiligten Signalwege untersucht. CNF-1 führt in HUVEC zeitabhängig sowohl zur Bildung von Aktinfasern als auch zur Ausbildung von „membrane ruffles“ und Filopodien. Diese Aktinstrukturen werden durch Aktivierung der GTPasen Rho, Rac und CDC42 induziert. Rho führt in Endothelzellen über Rho-Kinase zu einer Myosinleichtketten (MLC)- Phosphorylierung und dadurch zur Hemmung von MLC-Phosphatase. Stimulation der Endothelzellen mit CNF-1 führt hingegen abhängig von Rho und Rho-Kinase ohne Hemmung der MLC-Phosphataseaktivität zu einem Anstieg der MLC-Phosphorylierung und einer Zellkontraktion. Es konnte gezeigt werden, daß zwar Rac und CDC42 in den ersten Stunden durch CNF aktiviert werden, diese aber nicht für die MLC-Phosphorylierung verantwortlich sind. 24h nach CNF-Stimulation zeigt sich immer noch eine Aktivierung von RhoA, nicht aber von CDC42 und Rac. Trotzdem kommt es zu einem Anstieg der MLC-Phosphatase und dadurch zu einem Abfall der MLC-Phosphorylierung und Zellausbreitung. Diese Ergebnisse zeigen, daß CNF zu einer Entkopplung des Rho, Rho-Kinase, Myosinleichtketten-Phosphatase-Signalweges führt. Diese Entkopplung könnte eine Rolle bei der pathologischen Wirkung des Toxins spielen.



## 9 Literatur

### Literatur

- [1] Adelstein,R., Pato, M., de Sellers,J., Laneroll,P., Conti,M.: *Regulation of actin-myosin interaction by reversible phosphorylation of myosin and myosin kinase* Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol. 46 (1982), 921
- [2] Aepfelbacher,M., Essler,M., Huber,E., Sugai,M., Weber,P.C.: *Bacterial toxins block endothelial wound repair; evidence that Rho GTPases control cytoskeletal rearrangements in migrating endothelial cells* Arterioscler. Throm. Vasc. Biol. 17 (1997), 1623
- [3] Aepfelbacher,M., Essler,M.: *Disturbance of endothelial barrier function by bacterial toxins and atherogenic mediators: a role for Rho/Rho kinase* Microreview, Cellular Microbiology 3(10) (2001), 649-658
- [4] Aktories,K., Schmidt,G., Just,I.: *Rho GTPases as target of bacterial protein toxins* Biol. Chem 381 (2000), 421
- [5] Aktories,K., Mohr,C., Koch,G.: *Clostridium botulinum C3 ADP-ribosyltransferase* Curr. Top. Microbiol. Immunol. 175 (1992), 115-131
- [6] Aktories,K.: *Verstaendliche Wissenschaft: Rho-Proteine: Molekulare Schalter und Substrate bakterieller Toxine* DGPT-Forum Nr. 20 (1997), 22-28
- [7] Aktories,K., Weller,U., Chhatwat,G.S.: *Clostridium botulinum type C produces a novel ADP- ribosyltransferase distinct from botulinum C2 toxin* FEBS Lett. 212 (1987), 109-11
- [8] B. Alberts et al: *Molekularbiologie der Zelle* VCH Verlagsgesellschaft, 2. Auflage (1990), 828-829

- [9] B. Alberts et al: *Molekularbiologie der Zelle* VCH Verlagsgesellschaft, 2.Auflage (1990), 333f
- [10] B. Alberts et al: *Molekularbiologie der Zelle* VCH Verlagsgesellschaft, 2. Auflage (1990), 832
- [11] B. Alberts et al: *Molekularbiologie der Zelle* VCH Verlagsgesellschaft, 2. Auflage (1990), 834
- [12] Alexander,J.S.: *Rho, tyrosine kinase, Ca<sup>2+</sup> and junctions in endothelial hyperpermeability* Circ. Res. 87 (2000), 268
- [13] Amano,M., Ito,M., Kimura,K., Fukata,Y., Chihara,K., Nakano,T., Matsuura,Y., Kaibuchi,K.: *Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)* J. Biol. Chem., 271(34)(1996), 20246-9.
- [14] Boguski,M.S., McCormick,F.: *Proteins regulating ras and its relatives* Nature 366 (1993), 643-654
- [15] Bourne,H.R., Sanders,D.A., McCormick,F.: Nature 349 (1991), 117-127
- [16] H. Brandis et al: *Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie* GUSTAV Fischer Verlag, 7. Auflage (1990), 439- 449
- [17] H. Brandis et al: *Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie* GUSTAV Fischer Verlag, 7. Auflage (1990), Seite: 480-485
- [18] Braun,U., Habermann,B.,Just,I., Aktories,K., Vandekerckhove,J.: *Purification of the 22kDa protein substrate of botulinum ADP-ribosyltransferase C3 from the porcine brain cytosol and its characterization as a GTP- binding protein highly homologous to the rho gene product* Febs Lett. 243 (1989), 70-76

- [19] Buetow,L., Flatau,G., Chiu,K., Boquet,P., Ghosh,P.: *Structure of the Rho-activating domain of Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1* Nat. struc. biol. 8 (2001), 584-588
- [20] Burridge,K., Fath,K., Kelly,T., Nuckolls,G., Turner,C.: *Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton* Annu. Rev. Cell Biol. 4 (1988), 487-525
- [21] Caprioli,A., Falbo,V., Roda,L.G., Ruggeri,F.M., Zona,C.: *Partial purification and characterization of an Escherischia coli toxic factor that induces morphological alterations* Infect. Immun. 39 (1983), 1300-1306
- [22] Cao,L. and Wang,Y.: *Mechanism of the formation of contractile ring in dividing cultured animal cells. I. Recruitment of preexisting actin filaments into the cleavage furrow* J. Cell Biol. 110(1990), 1089-1095
- [23] Chardin,P., Boquet, P., Madaule,P., Popoff,M.R., Rubin,E.J., Gill,T.M.: *The mammalian G- protein rho C is ADP-ribosylated by Clostridium botulinum exoenzyme C3 and affects actin microfilament in Vero cells* EMBO J. 8 (1989), 1087-1092
- [24] Chen,XQ., Tan,I., Leung,T., Lim,L.:*The myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase is involved in the regulation of neurite outgrowth in PC12 cells* J. Biol. Chem. 274(28)(1999),19901-5.
- [25] Chisholm,A.K., Cohen,P.: *Identification of a third form of protein phosphatase 1 in rabbit skeletal muscle that is associated with myosin* Biochem. Biophys. Acta 968 (1988), 392
- [26] O'Connor, T.P., and Bendtley, D.: *Accumulation of actin in subsets of pioneer growth cone filopodia in response to neural and epithelial guidance cues in situ* J. Cell Biol. 123 (1993), 935-948

- [27] Contamin,S., Galmiche,A., Doye,A., Boquet,P.: *The p21 Rho-activating toxin cytotoxic necrotizing factor 1 is endocytosed by a clathrin-independent mechanism and enters the cytosol by an acidic dependent membrane translocation step* Mol. Biol. Cell 11 (2000), 1775-1787
- [28] De Rycke,J., Gonzales,E.A., Blanco,J., Oswald,E., Blanco,M., Boivin,R.: *Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of Escherichia coli* J. Clin. Microbiol. (1990)28,694-699
- [29] Diekmann,D., Brill,S., Garrett,M.D., Totty,N., Hsuan,J., Monfries,C., Hall,C., Lim,L., and Hall,A.: *Bcr encodes a GTPase activating protein for p21rac.* Nature 351 (1991), 400-402
- [30] Doye,A., Mettouchi,A., Bossis,G., Clement,R., Lemichez,E.: *CNF1 Exploits the Ubiquitin-Proteasome Machinery to Restrict Rho GTPase Activation for Bacterial Host Cell Invasion* Cell, 111(2002), 553-564
- [31] Dudet,L.I., Chailier,P., Dubreuil,J.D., Martineau-Doiz'e,B.: *Pasteurella multocida toxin stimulates mitogenesis and cytoskeleton reorganization in Swiss 3T3 fibroblasts* J. of cell. Physiol. 168 (1996), 173-182
- [32] Essler,M., Amano,M., Kruse,H.-J., Kaibuchi,K., Weber,P.C., Aepfelbacher,M.: *Thrombin inactivates myosin light chain-phosphatase via Rho and its target Rho-kinase in human endothelial cells* J. Biol. Chem. 273 (1998), 21867
- [33] Essler,M., Hermann,K., Amano,M., Kaibuchi,K., Heesemann,J., Weber,P.C., Aepfelbacher,M.: *Pasteurella multocida toxin increases endothelial permeability via Rho kinase and myosin light chain dephosphoryliation in endothelial cells* Am. J. Physiol. 272 (1997), L311
- [34] Essler,M., Retzer,M., Bauer,M., Heemskerk,J.M., Aepfelbacher,M.: *Mildly oxidized LDL induces contraction of human endothelial cells through*

*activation of Rho/Rho-kinase and inhibition of myosin light chain phosphatase* J. Biol. Chem. 274 (1999), 30361

- [35] Essler,M., Staddon,J., Weber,P.C., Aepfelbacher,M.: *Cyclo-AMP blocks bacterial lipopolysaccharide induced myosin light chain phosphorylation in endothelial cells through inhibition of Rho/Rho- kinase-signaling* J.Immunol 164 (2000), 6543
- [36] Essler,M., Retzer,M., Bauer,M., Zangl,K.J., Tigyi,G., Siess,W.: *Stimulation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized LDL proceeds through activation of lysophosphatic acid receptors and the Rho/Rho- kinase pathway* Ann. NY. Acad. Sci. 905 (2000), 282
- [37] Essler,M., Linder,S., Schell,B., Hfner,K., Wiedemann,A., Randhahn,K., Staddon,J., Aepfelbacher,M.: *Cytotoxic Necrotizing Factor 1 of Escherichia coli Stimulates Rho/Rho-Kinase-Dependent Myosin Light-Chain Phosphorylation without Inactivating Myosin Light-Chain Phosphatase in Endothelial Cells.* Infect. Immun. 71(2003), 5188-5193
- [38] Fabbri,A., Gauthier,M., Boquet,P.: *The 5region of cnf1 harbours a translational regulatory mechanism for CNF1 synthesis and encodes the cell-binding domain of the toxin.* Mol. Microbiol. 33 (1999),108-118S
- [39] Fabbri,A., Falzano,L., Travaglione,S., Sttringaro,A., Malori,W., Fais,S., Fioretini,C.: *Rho-activating Escherichia colicytotoxic necrotizing factor 1: macropinocytosis of apoptotic bodies in human epithelial cells.* Int. J. Med. Microbiol. 291 (2002), 551-554
- [40] Falbo,V., Pace,T., Picci,L., Pizzi,E., Caprioli,A.: *Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor 1 of Escherichia coli.* Infect. Immunol. 61 (1993), 4909-491

- [41] Falzano,L. , Rivabene,R., Santini,M.T., Fabbri,A., Fioretini,C.: *An Escherichia coli Cytotoxin increases superoxide anion generation via Rac in epithelial cells* Biochem. Biophys. Res. Comm. 283 (2001), 1026-1030
- [42] Fiorentini,C., Arancia,G., Caprioli,A., Falbo,V., Ruggeri,F., Donelli,G: *Cytoskeletal changes induced in Hep-2 cells by the cytotoxic necrotizing factor of Escherichia coli* Toxicon 26 (1988), 1047-1056
- [43] Fiorentini,C., Donelli,G., Matarrese,P., Fabbri,A., Paradisi,S., Boquet,P.: *Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1: evidence for induction of actin assembly by constitutive activation of the p21 Rho GTPase* Infect. Immun. 63 (1995), 3936-3944
- [44] Fiorentini,C., Fabbri,A., Flatau,G., Donelli,G., Matarrese,P., Lemichez,E., Falzano,L., Boquet,P.: *Escherichia coli Cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1), a toxin that activates the Rho GTPase*
- [45] Flatau,G., Lemichez,E., Gauthier,M., Chardin,P., Paris,S., Fiorentini,C.: *Toxin-induced activation of p21 Rho by glutamine deamidation* Nature 387 (1997), 729-733
- [46] Flatau,G., Landraud,L., Boquet,P., Bruzzone,M., Munro,P.: *Deamidation of RhoA glutamine 63 by Escherichia coli CNF1 toxin requires a short sequence of GTPase switch domain* Biochem. Biophys. Res. Commun. 267 (2000), 588-592
- [47] Foster,R., Hu,K.Q., Nolan K.M., Thissen,J., and Settleman,J.: *Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation* Mol. Cell. Biol. 16 (1995), 2689-2699
- [48] Frick,H., Leonhardt,H., Starck,D.: *Allgemeine Anatomie, Spezielle Anatomie* Thieme Verlag 4. überarbeitete Auflage (1992), S.48-56

- [49] Fukumoto, Y., Kaibuchi, K., Hori, Y., Fujioka, H., Araki, S., Ueda, T., Kikuchi, A., and Takai, Y.: *Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins* Oncogene 5 (1990), 1321-1328
- [50] Garcia, J.A., Verin, A.D., Schaphorst, K.L.: *Regulation of thrombin-mediated endothelial cell contraction and permeability* Semin. Thromb. Hemost. 22 (1996), 309
- [51] Garrett, M.D., Self, A.J., van Oers, C., and Hall, A.: *Identification of distinct cytoplasmic targets for ras/r-ras and rho regulatory proteins.* J. Biol. Chem. 264 (1989), 10-13
- [52] Gerhard, R., Schmidt, G., Hofmann, F., Aktories, K.: *Activation of Rho GTPases by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 increases intestinal permeability in Caco-2 cells.* Infect. Immun. 66 (1998), 5125-5131
- [53] Hall, A.: *The cellular functions of small GTP-binding proteins.* Science 249 (1990), 635-640
- [54] Hall, A.: *Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton* Annu. Rev. Cell Biol. 10 (1994), 31-54
- [55] Hanada, M., Shimoda, K., Tomita, S., Nakase, Y., Nishiyama, Y.: *Production of lesions similar to naturally occurring swine atrophic rhinitis by cell-free sonicated extract of Bordetella bronchiseptica* Jpn. J. Vet. Sci. 41 (1979), 1-8
- [56] Hill, C.S., Wynne, J., Treisman, R.: *The Rho-family GTPases RhoA, Rac1, and Cdc42HS regulate transcriptional activation by SRF* Cell 81 (1995), 1159- 1170

- [57] Hiraoka,K., Kaibuchi,K., Ando,S., Musha,T., Takaiishi,K., Mizuno,A., Menard,L., Tomhave,E., Didsbury,J., Snyderman, R., and Takai,Y.: *Both stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins, amgGDS and rhoGDI, are active on multiple small GTP-binding proteins.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 182 (1992), 921-930
- [58] Hofmann,P., Flatau,G., Selva,E., Gauthier,M., Le Negrate,G., Fioretini,C., Rossi,B., Boquet,P.: *Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 effaces microvilli and decreases transmigration of polymorphonuclear leukocytes in intestinal T84 epithelial cell monolayers.* Infect. Immun. 66 (1998), 2494-2500
- [59] Horiguchi,Y., Inoue,N., Masuda,M., Kashimoto,T., Katahira,J., Sugimoto,N., Matsuda,M.: *Bordetella bronchiseptica dermonecrotizing toxin induces reorganization of actin stress fibres through deamidation of Gln-63 of the GTP-binding protein Rho* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 11623-11626
- [60] Horiguchi,Y.: *Escherichia coli cytotoxic necrotizing factors and Bordetella dermonecrotic toxin: the dermonecrosis-inducing toxins activating Rho small GTPases* Toxicon 39 (2001), 1619-1627
- [61] Il'ina,Z.M., Zasukhin,M.I.: *Sbornik nauchnykh rabot* Sibirskii nauchno-Issledovatel'skii Veterinarnyi Institut, Omsk 25 (1975), 76-86
- [62] Just,I., Mohr,C., Schallehn,G., Menard,L., Didsbury,J.R., Vandekerckhove,J., van Damme,J., Aktories,K.: *Purification and characterization of an ADP-ribosyltransferase produced by Clostridium limosum* J. Biol. Chem. 267 (1992),10274- 10280
- [63] Just,I., Selzer,J., Jung,M.,van Damme,J.,Vandekerckhove,J., Aktories,K.: *Rho-ADP- ribosylating exoenzyme from Bacillus cereus- purification,*



*characterization and identification of the NAD-binding site* Biochemistry  
34 (1995),334-340

- [64] Just,I., Fritz,G., Aktories,K., Giry,M., Popoff,M.R., Boquet,P., Hegenbarth,S., Von Eichel-Steicher,C.: *Clostridium difficile* toxin B acts on the GTP-binding protein Rho J. Biol.Chem. 269 (1994), 10706-10712
- [65] Just,I., Selzer,J., Von Eichel-Streicher,C., Aktories,K.: *The low molecular mass GTP-binding protein Rho is affected by toxin A from Clostridium difficile* J. Clin.Invest. 95 (1995), 1026-1031
- [66] Just,I., Selzer,J., Wilm,M., Von Eichel-Streicher,C., Mann,M., Aktories,K.: *Glycosylation of Rho proteins by Clostridium difficile toxin B* Nature 375 (1995), 500-503
- [67] Just,I., Wilm,M., Selzer,J., Rex,G., Von Eichel-Streicher,C., Mann,M., Aktories,K.: *The enterotoxin from Clostridium difficile (Tox A) monoglucosylates the Rho-proteins* J. Biol. Chem. 270 (1995), 13932-13936
- [68] Khosravi-Far,R., Solski,P.A., Clark,G.J., Kinch,M.S., Der,C.J.: *Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras-transformation* Mol. Cell. Biol. 15 (1995),6443-6453
- [69] Kozma,R. Ahmed,S., Best,A., and Lim,L.: *The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts* Mol. Cell. Biol. 15 (1995), 1942-1952
- [70] Lacerda,H.M., Pillinger,G.D., Rozengurt,E.: *Cytotoxic necrotizing factor 1 from Escherichia coli and dermonecrotic toxin from Bordetella*

- bronchiseptica* induce p21(rho)- dependent tyrosin phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin in Swiss 3T3 cells J. Biol. Chem. 272 (1997), 9587-9596
- [71] Lamaze,C., Chuang,T.H., Terlecky,L.J., Bokoch,G.M., Schmid,S.L.: *Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac* Nature 382 (1996), 177-179
- [72] Lax,A.J., Chanter,N., Pullinger,G., Higgens,T., Staddon,J.M., Rozengurt,E.: *Sequence analysis of the potent mitogenic toxin of Pasteurella multocida* FEBS lett. 227 (1990), 59-64
- [73] Lemichez,E., Flatau,G., Bruzzone,M., Boquet,P., Gauthier,M.: *Molecular localization of the Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor CNF1 cell-binding and catalytic domains* Mol. Microbiol. 24 (1997), 1061-1070
- [74] Leonhardt,H.:*Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen* Thieme Verlag, 8. Auflage (1990), S. 220
- [75] Lerm,M., Selzer,J., Hoffmeyer,A., Rapp,U.R., Aktories,K., Schmidt,G.: *Deamidation of Cdc42 and Rac by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1: Activation of c-jun N-terminal kinase in HeLa cells* Infec. Immun. 67 (1999), 496
- [76] Lerm,M., Pop,M., Fritz,G., Aktories,K., Schmidt,G.: *Proteasomal Degradation of CNF1-Activated Rac* Infection and Immunity (2002),4053-4058
- [77] Leung,T., Chen,X.Q., Tan,I., Manser,E., Lim,L.: *Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42- binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal organization* Mol. Cell. Biol. 18 (1997), 130

- [78] Löffler,G., Petrides,P.E.: *Biochemie und Pathbiochemie* Springer- Verlag, 5. Auflage (1997), 194-198 und 1102
- [79] Masuda,M., Betancourt,L., Matsuzawa,T., Kashimoto,T., Shimonishi,Y., Horiguchi,Y.: *Activation of Rho through a cross-link with polyamines catalyzed by Bordetella dermonecrotizing toxin* EMBO J. 19(2000), 521-530
- [80] Mizuno,T., Kaibuchi,K., Yamamoto,T., Kawamura,M., Sakoda,T., Fujioka,H., Matsura,Y. and Takai,Y.: *A stimulatory GDP/GTP exchange protein for smg p21 is active on the post-translationally processed form of c-Ki-ras p21 and rhoA p21* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 6442-6446
- [81] Moorman,J.P., Bobak,D.A., Hahn,C.S.: *Inactivation of the small GTP binding protein Rho induces multinucleate cell formation and apoptosis in murine T lymphoma EL4* J. Immunol. 156 (1996),4146-4153
- [82] Moore,K.A., Huang,S., Kong,Y.P., Sunday,M.E., Ingber,D.E.: *Control of embryonic lung branching morphogenesis by Rho activator, Cytotoxic necrotizing factor 1* J. Surg. Res. 104 (2002), 95-100
- [83] Moy,A.B., Shasby,S., Scott,B.D., Shasby,D.M.: *The effect of Histamine and cyclic Adenosine Monophosphate on Myosin Light Chain Phosphorylation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells* J. Cli. Invest. 92 (1993), 1198-1206
- [84] Nobes,C.D., and Hall,A : *Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia* Cell 81 (1995),53-62

- [85] Nobes,C.D., Hawkins,P., Stephens,L., and Hall,A.: *Activation of the small GTP-binding proteins rho and rac by growth factor receptors* J. Cell. Sci. 108 (1995), 225-233
- [86] M. Oethinger (Hrsg.): *Mikrobiologie und Immunologie* GUSTAV Fischer Verlag, 9. überarbeitete Auflage (1997)
- [87] Olson,M.F., Ashworth,A. and Hall,A.: *An essential role for Rho, rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1* Science 269 (1995), 1270- 1272
- [88] Oswald,E., Sugai,M., Labigne,A., Wu,H.C., Fiorentini,C., Boquet,P., O'Brian,A.D.: *Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by virulent Escherichia coli modifies the small GTP-binding proteins Rho involved in assembly of actin stress fibres* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994), 3814- 3818
- [89] Ottlinger,M.E., Lin,S.: *Clostridium difficile toxin B induces reorganization of actin, vinculin, and talin in cultures cells* Exp. Cell. Res. 174 (1988), 215-229
- [90] Peterson,S.K.: *The complete nucleotide sequence of the Pasteurella multocida toxin gene and evidence for a transcriptional repressor* Mol. Mikrobiol. 4 (1990), 821-830
- [91] Pryer,N.K., Wuestehube,L.J., and Schenkman,R.: *Vesicle- mediated protein sorting* Annu. Rev. Biochem. 61 (1992),471-516
- [92] Pschyrembel: *Klinisches Wörterbuch* deGruyter Verlag, 257.Auflage (1994)

- [93] Ridley,A.J., Paterson,H.F., Johnson,C.L., Diekmann,D., and Hall,A.: *The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling.* Cell 70 (1992), 401-410
- [94] E.T. Rietschel und H. Brade: *Bacterial Endotoxins* SCIENTIFIC AMERICAN, August 1992, Seite: 27-33
- [95] Roop,R.M., Veit,H.P., Sinsky,R.J., Veit,S.P., Hewlett,EL., Kornegay,E.T.: *Virulence factors of Bordetella bronchiseptica associated with the production of infectiuos atrophic rhinitis and pneumonia in experimentally infected neonatel swine* Infect. Immun. 55 (1987), 217-222
- [96] Ross,R., Glomset,J.A.: *The pathogenesis of artherosclerosis* N. Engl. J. Med. 295 (1976), 369 und 420
- [97] Rozengurt,E., Higgens,T., Chanter., Lax,A.J., Staddon,J.M.: *Pasteurella multocida toxin: Potent mitogen for cultured fibroblasts* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 123-127
- [98] Rutter,J.M., Mackenzie,A.: Vet. Record 114, 89-90
- [99] Ryan,J.L., D.,Ph., D.,M.: *Bites: P. Multocida, DF-2, S. Moniliformis, and S. Minor* J. infections acquired from animals 256, 1499-1502
- [100] Sander,E.E., ten Klooster,J.P., van Delft,S., can der Kammen,R.A., and Collard,J.G.: *Rac downregulates Rho activity: retroprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior* J. Cell. Biol. 147 (1999),1009
- [101] Sanders,LC., Matsumura,F., Bokoch,GM., and de Lanerolle,P.: *Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase* Science 283(1999),2083-2085

- [102] Schmalzing,G., Richter,H.P., Hansen,A.,Schwarz,W.,Just,I., Aktories,K.: *Involvement of the GTP-binding protein Rho in constitutive endocytosis in Xenopus laevis oocytes* J. Cell. Biol. 130 (1995), 1319-1332
- [103] Schmidt,G., Sehr,P., Wilm,M., Selzer,J., Mann,M., Aktories,K.: *Gln63 of Rho is deamidated by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor-1* Nature 387 (1997), 725-728
- [104] Schmidt,G., Selzer,J., Lerm,M., Aktories,K.: *The Rho-deamidating cytotoxic necrotizing factor 1 from Escherichia coli possesses transglutaminase activity* J. Biol. Chem. 273 (1998), 13669-13674
- [105] Schmidt,G., Goehring,U.-M., Schirmer,J., Lerm,M., Aktories,K.: *Identification of the C- terminal part of Borectella necrotic toxin as a transglutaminase for Rho GTPases* J. Biol. Chem. 274 (1999), 31875-31881
- [106] Sekine,A., Fujiwara,M., Narumiya,S.: *Asparagine residue in the Rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase* J. Biol. Chem. 264 (1989), 8602-8605
- [107] Shannon,M.D., Borgman,C.A., Cobb,B.S., Vines,R.R., Reynolds,A.B., and Parsons,J.T.: *The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus.* Nature 365 (1993), 661-663
- [108] Shasby,D.M., Shasby,S., Sullivan,J., Peach,M.: *Role of endothelial cell cytoskeleton in control of endothelial permeability* Circ. Res. 51 (1982), 657-661
- [109] Shasby,D.M., Shasby,S.: *Effects of calcium on transendothelial albumin transfer and electrical resistance* J. Appl. Physiol. 60 (1986), 71-79

- [110] Shinjo,K., Koland,J.G., Hart,M.J., Narasimhan,V., Johnson,D., Evan,T. and Cerione,R.A.: *Molecular cloning of the gene for the human placental GTP-binding protein Gp(G25K): identification of this GTP-binding-protein as the human homolog of the yeast cell-division-cycle protein CDC42*. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 9853-9857
- [111] Siess,W., Zangl,K.J., Essler,M., Bauer,M., Brandl,R., Corrinth,C., et al.: *Lysophosphatic acid mediates the rapid activation of platlets and endothelial cells by mildly-oxidized LDL and accumulates in human atherosclerotic lesions* Pro. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999), 6931
- [112] Silveira,D., Edington,N., Smith,I.M.: *Ultrastructural changes in the nasal turbinate bones of pigs in early infection with Bordetella bronchiseptica* Res. Vet. Sci. 33 (1982), 37-42
- [113] Small,J.V.: *Organisation of actin in the leading edge of cultured cells: influence of osmium tetroxide and dehydration on the ultrastructure of actin meshworks* J. Cell Biol. 91 (1981), 695-705
- [114] Small,J.V.: *Getting the actin filaments straight: nucleation release or treadmilling* Trends Cell Biol. 5 (1995), 52-55
- [115] Staddon,J.M., Bouzyk,M.M., Rozengurt,E.: *A novel approach to detect Toxin-catalyced ADP- ribosylation in intact cells: Its use to study the action of Pasteurella multocida Toxin* The Journal of Cell Biology 115 (1991),949-958
- [116] Sugai,M., Enomoto,T., Hashimoto,K., Matsumoto,K., Matsuo,Y., Ohgai,H., Hong,Y.-M., Inoue,S., Yoshikawa,K. Suginaka,H.: *A novel epidermal cell differentiation inhibitor (EDIN): Purification and characterization from Staphylococcus aureus* Biochem. Biophys. Res. Commun. 173 (1990), 92-98

- [117] Switzer,W.P., Farrington,D.O. : *Diseases of swine* 4th edn (Dunne,H.W. and Leman, A.D. eds) pp. 687-711 (1975), Iowa State University Press, Ames.
- [118] Thomas,W., Pullinger,G., Lax,A., Rozengurt,E.: *Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor and Pasteurella multocida toxin induce focal adhesion kinase Autophosphorylation and Src association* Inf. and Immun. 69 (2001), 5931-5935
- [119] Thomas,W., Ascott,Z., Harmey,D., Slice,L., Rozengurt,E.: *Cytotoxic necrotizing factor of Escherichia coli induces RhoA-dependent expression of the cyclooxygenase-2 gene* Inf. and Immun. 69 (2001), 6839- 6845
- [120] Verin,A.D., Patterson,C.E., Day,M.A., Garcia,J.G.: *Regulation of endothelial cell gap formation and barrier function by myosin-associated phosphatase activities* Am. J. Physiol. 269 (1995), L99
- [121] Vincent,S., Jeanteur,P., and Fort,P.: *Growth-regulated expression of rhoG, a new member of the ras homolog gene family.* Mol. Cell. Biol. 12 (1992),3138-3148
- [122] D.Voet, J.G.Voet: *Biochemie* VCH Verlagsgesellschaft, 1992, Seite: 1174f
- [123] Vouret-Craviari,V., Grall,D., Flatau,G., Bouquet,P. and van Obberghen-Schilling,E.: *Effects of CNF1 and lethal toxin on actin cytoskeleton and VE-cadherin localization in human endothelial cell monolayers* Infect. Immun. 67(1999), 3002-8
- [124] Walker,K.E., Weiss,A.A.: *Characterization of the dermonecrotic toxin in members of the genus Bordetella* Infec. Immun. 62 (1994), 3817-3828
- [125] Ward,P.N., Higgins,T.E., Murphy,A.C., Mullan,P.B., Rozengurt,E., Lax,A.J.: *Mutation of a putative ADP-ribosylation motif in the*



*Pasteurella multocida* toxin does not affect mitogenic activity FEBS letters  
342 (1994), 81-84

[126] Wei,Y., Zhang,Y., Derewenda,U., Liu,X., Minor,W., Nakamoto,R.,  
Somlyo,A.V., Somlyo,A.P., Derewenda,Z.S.: Nature Struct. Biol. 4  
(1997), 699-703

[127] Wittinghofer,A., Nassar,N.: Trends Biochem. Sci. 21 (1996), 488-490

[128] Wysolmerski,R., Lagunoff,D.: *The effect of ethchlorvynol on cultured  
endothelial cells- a model for the study of the mechanism of increased  
vascular permeability* Am. J. Pathol. 119 (1985), 505-512

## 10 Abbildungsverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis

1	<b>Die Cholera- und Pertussistoxinwirkung auf die Adenylatcyclase</b>	
	R: Rezeptor; AC: Adenylatcyclase; s: stimulierend; i: inhibierend; $G_{\alpha}$ , $G_{\beta\gamma}$ : G-Proteine (Untereinheit $\alpha, \beta\gamma$ ); GTP: Guanosintri-phosphat; GDP + $P_i$ : Guanosindiphosphat und anorganisches Phosphat; ATP: Adenosintri-phosphat; cAMP: 3',5'-cyclo-Adenosinmonophosphat . . . . .	10
2	<b>PMT Signalweg; Übersichtsskizze</b>	
	MLC-P: Phosphorylierte Myosin-Leichtkette . . . . .	16
3	<b>Regulation von Rho über GDS, GDI und GAP</b>	
	GDS: „Guanine nucleotide Dissociation Stimulators“; GDI: „Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors“; GAP: „GTPase-Activating Proteins“ . . . . .	23
4	<b>Regulationskaskade von CDC42, Rac und Rho . . . . .</b>	25
5	<b>Modifikation und Hemmung von Rho durch C3- Transferase und Toxin A,B (<i>Clostridium Difficile</i>) . . . . .</b>	28
6	<b>CNF induzierte MLC-Phosphorylierung; Western-Blot mit Anti-Phospho-Myosin-Antikörper angefärbt . . . . .</b>	44
7	<b>Hemmung von CNF-stimulierten Zellen durch C3- Transferase oder Y-27632; Färbung nach phosphorylierten MLC . . . . .</b>	45
8	<b>CNF-Stimulation Färbung mit Rhodamine-Phalloidine . . . . .</b>	46
9	<b>Hemmung von CNF-stimulierten Zellen durch RBD und Rho-Kinase-Hemmer Y-27632; A: Mikroinjektion mit GST, B: Mikroinjektion mit RBD, C: Rho-Kinase Hemmer Y- 27632; Färbung mit Rhodamine Phalloidin . . . . .</b>	47

10	<b>Myosin-Umverteilung in HUVEC</b> A: Kontrolle, B: CNF und Mikroinjektion mit PAK-CRIB, C: CNF und Mikroinjektion mit N17Rac; Färbung mit anti-phospho-MLC-Antikörpern . . . . .	48
11	<b>CNF-stimulierte HUVEC;</b> MLC-Phosphatase-Aktivität, densitometrische Auswertung . . . . .	49
12	<b>CNF-1 Signalwege</b> . . . . .	55

## 11 Lebenslauf

<b>Name:</b>	Randhahn
<b>Vorname:</b>	Katharina Elisabeth
<b>Geboren:</b>	01.01.1976
<b>Staatsangehörigkeit:</b>	deutsch
<b>Ausbildung:</b>	
1982-1986:	Grundschule an der Haldenbergerstrasse, München
1986-1995:	Louise-Schroeder-Gymnasium, München
1995-2002:	Studium der Humanmedizin, Ludwigs-Maximilians-Universität, München
1997:	Physikum
1998:	1.Staatsexamen
2001:	2.Staatsexamen
2002:	3.Staatsexamen
<b>Doktorarbeit:</b>	
seit 1997:	Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislauferkrankungen der LMU, München
<b>Ärztin im Praktikum:</b>	
08/2002-01/2004:	Innere Medizin, Onkologie und Hämatologie, Schwabinger Krankenhaus, München
<b>Assistenzärztin:</b>	
Seit 02/2004:	Innere Medizin, Kardiologie und Pulmologie, Schwabinger Krankenhaus, München

## **Danksagung**

Ich danke Prof. Dr. med. P.C. Weber für die Überlassung dieser Promotionsarbeit.

Dr. med. Markus Essler und Prof. Dr. med. Martin Äpfelbacher für fachliche Betreuung.

PD Dr. Stefan Linder, Barbara Bölig, Carola Laudano, Dr. Markus Bauer und Dr. Georg Ostermann für technische Unterstützung.

Meiner Familie und meinen Freunden für Unterstützung, Geduld und Vertrauen.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Katharina Randhahn, geb. 01.01.1976, daß ich diese Promotionsarbeit allein und ohne fremde Hilfe geschrieben habe.

München, den 24.09.2004

Katharina Randhahn