

Biologie

**Identifizierung der zytosolischen Kinase CSK als
Bindungspartner von VE-Cadherin:
Auswirkung dieser Assoziation auf das Zellwachstum**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Ulf Baumeister
aus Münster / Westf.

- 2004 -

Dekan:	Prof. Dr. Alexander Steinbüchel
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Dietmar Vestweber
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Walter Stöcker
Tag der mündlichen Prüfung:	21.05.2004
Tag der Promotion:	11.06.2004

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	- 1 -
2	EINLEITUNG	- 2 -
2.1	Neubildung und Erneuerung der vaskulären Strukturen	- 2 -
2.2	Die Bildung funktioneller Strukturen über Zellkontakte	- 4 -
2.2.1	Die Komponenten der Zellkontakte in Epithelien und Endothelien	- 5 -
2.2.1.1	Die „Tight Junctions“	- 6 -
2.2.1.2	Die Desmosomen und die „Complexi Adhaerentes“	- 7 -
2.2.1.3	Die „Adherence Junctions“	- 7 -
2.2.1.4	Adhäsionsproteine der Zell-Zellkontakte ohne strukturelle Zuordnung	- 8 -
2.2.2	Die Beteiligung VE-Cadherins an der Extravasation immunrelevanter Zellen	- 9 -
2.2.3	Die Beteiligung VE-Cadherins an dem Aufbau vaskulärer Strukturen	- 10 -
2.2.4	Der Aufbau des Cadherin-Catenin-Komplexes	- 11 -
2.2.5	Die Regulation des Cadherin-Catenin-Komplexes	- 13 -
2.2.5.1	Die Einflussnahme des Zytoskeletts auf die Funktion des Cadherin-Catenin-Komplexes	- 14 -
2.2.5.2	Die Regulation des Cadherin-Catenin-Komplexes über die Phosphorylierung	- 14 -
2.2.5.3	Die Beteiligung des VE-Cadherin-Catenin-Komplexes an der Signaltransduktion	- 17 -
2.2.6	Die Zielsetzung dieser Dissertation	- 20 -
3	MATERIAL UND METHODEN	- 21 -
3.1	Material	- 21 -
3.1.1	Chemikalien/Reagenzien	- 21 -
3.1.2	Verwendete Kits und spezielle Reagenzien	- 24 -
3.1.3	Verwendete Isotope	- 25 -
3.1.4	Verwendete Medien	- 25 -
3.1.5	Spezielle Geräte	- 27 -
3.1.6	Verwendete Verbrauchsmaterialien	- 28 -
3.1.7	Allgemeine Software und Internetadressen	- 29 -
3.1.8	Antikörper	- 29 -
3.1.9	Enzyme	- 30 -
3.1.10	Oligonukleotide	- 31 -
3.1.11	Vektoren	- 32 -
3.1.12	Rekombinante Plasmide	- 32 -
3.1.13	Zell-Linien	- 36 -
3.1.14	Bakterienstämme	- 36 -

3.2	Methoden	- 36 -
3.2.1	Aufzucht und Lagerung von Bakterienkulturen	- 36 -
3.2.2	Molekularbiologische Methoden	- 37 -
3.2.2.1	Isolierung von Nukleinsäuren	- 37 -
3.2.2.2	Präzipitation von Nukleinsäuren	- 37 -
3.2.2.3	Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren	- 37 -
3.2.2.4	Reinigung von Nukleinsäuren	- 38 -
3.2.2.5	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	- 38 -
3.2.2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	- 39 -
3.2.2.7	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	- 40 -
3.2.2.8	Klonierung von Nukleinsäuren in Plasmidvektoren	- 40 -
3.2.3	Transformation von Bakterien	- 43 -
3.2.3.1	Herstellung elektrokompenter Bakterien	- 43 -
3.2.3.2	Elektrotransformation von Bakterien	- 43 -
3.2.3.3	Transformation von chemisch kompetenten Bakterien	- 44 -
3.2.3.4	„PCR Colony Screen“	- 44 -
3.2.4	DNA-Sequenzierung	- 45 -
3.2.5	Zellbiologische Methoden	- 46 -
3.2.5.1	Kultivierung von Zell-Linien	- 46 -
3.2.5.2	Kryokonservierung von Zellen	- 48 -
3.2.5.3	Transfektion von eukaryotischen Zellen	- 48 -
3.2.5.4	Induktion der Expression von Myc-CSK in transfizierten CHO-Zellen	- 50 -
3.2.5.5	<i>In-vivo</i> -Phosphorylierung von endogenen Proteinen	- 51 -
3.2.5.6	Immunhistochemische Färbungen	- 51 -
3.2.5.7	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	- 52 -
3.2.5.8	Funktionelle Zellexperimente	- 53 -
3.2.6	Biochemische Methoden	- 56 -
3.2.6.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	- 56 -
3.2.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	- 56 -
3.2.6.3	Coomassiefärbung von Proteinen in SDS-Gelen	- 57 -
3.2.6.4	Detektion von Proteinen durch Autoradiographie/Fluorographie	- 58 -
3.2.6.5	„GST-Pulldown“-Experimente	- 58 -
3.2.6.6	Herstellung von Zell-Lysaten	- 61 -
3.2.6.7	Immunopräzipitation (IP)	- 63 -
3.2.6.8	Western-Blot	- 64 -
3.2.6.9	<i>In-vitro</i> -Analyse von Kinaseaktivitäten	- 66 -
3.2.6.10	„Yeast Two Hybrid Screen“	- 67 -

4	ERGEBNISSE	- 76 -
4.1	Identifikation von CSK als VE-Cadherin assoziiertes Protein mit Hilfe des “Yeast Two Hybrid”-Systems	- 76 -
4.2	Klonierung von CSK_{wt} aus bEND.3-Zellen	- 80 -
4.3	Herstellung von stabil transfizierten CHO-Zell-Linien	- 81 -
4.3.1	Herstellung von VE-Cadherin _{wt} , VE-Cadherin _{Y685F} und CSK _{wt} exprimierenden Zellen	- 81 -
4.3.2	Herstellung von Flk-1, VE-Cadherin _{wt} , VE-Cadherin _{Y685F} und CSK _{wt} exprimierenden Zellen	- 83 -
4.3.3	Immunzytochemische Analyse der CSK _{wt} -Expression	- 87 -
4.4	Charakterisierung der Assoziation zwischen VE-Cadherin und CSK	- 90 -
4.4.1	<i>In-vivo</i> - und <i>In-vitro</i> -Assoziation zwischen VE-Cadherin und CSK	- 90 -
4.4.1.1	Die spezifische <i>In-vitro</i> -Assoziation von CSK mit VE-Cadherin	- 91 -
4.4.1.2	<i>In-vivo</i> -Assoziation zwischen VE-Cadherin und CSK in heterologen Systemen	- 94 -
4.4.1.3	Die Bindung von endogenem CSK an endogenes VE-Cadherin in bEND.3	- 96 -
4.4.2	Kolokalisierung von VE-Cadherin und CSK in immunzytochemischen Analysen	- 98 -
4.5	Biologische Relevanz der VE-Cadherin-CSK-Interaktion	- 102 -
4.5.1	Einfluss von CSK auf die Phosphotyrosine von VE-Cadherin & PECAM-1	- 102 -
4.5.2	Der Einfluss von CSK auf die Zellkontaktintegrität	- 107 -
4.5.3	Der Einfluss der CSK-VE-Cadherin-Assoziation auf die Adhäsivität des Cadherins	- 108 -
4.5.4	Der Einfluss der CSK-VE-Cadherin-Assoziation auf die Proliferationsrate von CHO-Zellen	- 109 -
5	DISKUSSION	- 116 -
5.1	„C-terminal-Src-Kinase“, ein VE-Cadherin assoziiertes Protein	- 117 -
5.1.1	Die Vermittlung der CSK-Bindung an VE-Cadherin über die SH2-Domäne	- 119 -
5.2	Die indirekte Beeinflussung der Phosphotyrosine des VE-Cadherin durch CSK	- 121 -
5.3	Physiologische Relevanz der Assoziation von VE-Cadherin mit CSK	- 123 -
5.3.1	Einfluss von CSK auf die Cadherin-Adhäsivität und die Integrität der Zell-Zellkontakte	- 124 -
5.3.2	Die Regulation der Zellproliferation über die Assoziation von CSK und VE-Cadherin	- 125 -
6	LITERATURVERZEICHNIS	- 130 -
7	ANHANG	- 142 -
7.1	Abkürzungsverzeichnis	- 142 -
7.2	Lebenslauf	- 145 -
7.3	Danksagung	- 147 -

1 Zusammenfassung

Das Endothel der Blutgefäße reguliert den Stoffaustausch zwischen dem Blut und den umliegenden Geweben sowie die Auswanderung von Leukozyten aus dem Blut. Zusätzlich sind die Endothelzellen für die Bildung von Blutgefäßen verantwortlich. VE-Cadherin ist ein endothelspezifisches Adhäsionsmolekül, das für die Ausbildung und Stabilität der endothelialen Zell-Zellkontakte von zentraler Bedeutung ist.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Identifizierung von VE-Cadherin assoziierten Proteinen, deren Bindungen die Funktionen des Cadherins beeinflussen. Mit Hilfe des „yeast two hybrid“-Systems konnte erstmals die „C-terminal-Src-Kinase“ (CSK) als Interaktionspartner von VE-Cadherin identifiziert werden. CSK ist ein Inhibitor der Kinasen aus der Src-Familie und wird über seine Bindungsdomänen an die Orte der Src-Aktivitäten rekrutiert. In den nachfolgenden biochemischen und immunhistochemischen Analysen wurde diese Interaktion bestätigt. Die Bindung der beiden Proteine erfordert die Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin und erfolgt über die SH2-Bindungsdomäne von CSK. Als bindungsrelevantes Phosphotyrosin wurde das Tyrosin₆₈₅ der zytosolischen VE-Cadherin-Domäne identifiziert. In der Aminosäuresequenz beinhaltet VE-Cadherin als einziges Protein der klassischen Cadherine das CSK-SH2-Bindungsmotiv, so dass die Assoziation mit CSK offenbar ein VE-Cadherin spezifischer Mechanismus ist. Tatsächlich konnte für N-Cadherin keine Bindung an CSK nachgewiesen werden. VE-Cadherin wird nicht aktiv über die Kinase CSK phosphoryliert, stattdessen werden die Phosphotyrosine über die Bindung der SH2-Domäne vor der Dephosphorylierung geschützt. In funktionellen Zellstudien mit CHO-Zellen, die induzierbares CSK zusammen mit VE-Cadherin_{wt} oder VE-Cadherin_{Y685F} exprimierten, konnte nachgewiesen werden, dass die Assoziation zwischen VE-Cadherin und CSK die Zellproliferation signifikant reduziert, während die Adhäsivität des Cadherins und die Integrität der Zellkontakte nicht beeinflusst werden.

2 Einleitung

Nahezu alle Gewebe der Wirbeltiere benötigen zur regulären Funktion die Zufuhr von Blut. Dies wird über ein komplexes Blutgefäßsystem gewährleistet. Die größten Blutgefäße sind die Arterien und Venen, die von belastbarem Bindegewebe und mehreren Ringen glatter Muskelzellen gebildet werden. Ausgekleidet werden diese Gefäße von dem dünnen, einschichtigen Endothel, das der Basalmembran aufliegt. Mit abnehmendem Durchmesser der Gefäße werden die Gefäßwände und damit die Menge der Bindegewebs- und Muskelzellen reduziert. Die Auskleidung mit Endothelzellen bleibt aber erhalten. So werden die feinsten Verästelungen der vaskulären Strukturen, die Kapillaren und Sinusoiden, aus Endothelzellen, der darunter liegenden Basalmembran und wenigen bindegewebsartigen Zellen, den Perizyten, gebildet. Durch diese einfache Struktur der Kapillaren wird die Versorgung der Gewebe erheblich vereinfacht. Dem Endothel unterliegt als Barriere zwischen dem Blutstrom und dem umliegenden Gewebe die Kontrolle des Austausches von Substanzen und Zellen des Immunsystems. Die Stabilität und Integrität des Endothels wird über die lateralen Kontaktzonen der einzelnen Endothelzellen und den darin befindlichen Adhäsionsmolekülen gewährleistet und gesteuert.

2.1 Neubildung und Erneuerung der vaskulären Strukturen

Während der frühen embryonalen Entwicklung werden die primären Blutgefäße über den Prozess der Vaskulogenese gebildet. Die Endothelzellen entstehen aus den endothelialen Stammzellen, den so genannten Angioblasten, die in spezialisierten Blutinseln der mesodermalen Zellschicht des Blastozysten lokalisiert sind (Risau and Flamme, 1995). Die differenzierten Endothelzellen schließen sich zu einfachen Gefäßen zusammen und bilden den primären, vaskulären Plexus (Flamme et al., 1997; Risau, 1997), der an das sich entwickelnde Herz angeschlossen wird. Nach dem Einsatz des Herzschlags gewährleistet dieses System die primäre Blutzirkulation. Mit Hilfe von Signalstoffen aus dem Endothel werden in der Folge die Gefäße zunächst mit den Perizyten und anschließend mit den glatten Muskelzellen sowie den Bindegewebszellen umgeben.

Die Ausbildung des höheren, voll funktionsfähigen, vaskulären Systems und die Neubildung von Gefäßen in ausgewachsenen Geweben erfolgt über die Angiogenese. In diesem Prozess werden neue Kapillaren durch Sprossung von Endothelzellen aus bereits vorhandenen Gefäßen gebildet (Risau, 1997), so dass im Regelfall jede Zelle ca. 50-100µm von

der nächsten Kapillare entfernt ist. Während der Angiogenese entwickeln die Endothelzellen Pseudopodien, die in das umgebende Gewebe hineinreichen. Zur Überwindung der Basalmembran produzieren die Endothelzellen eine Fülle von Proteasen und Plasminogen-Aktivatoren (Rabbani, 1998). Die proliferierenden Endothelzellen bilden im Gewebe einen Kapillarspross, der vorangetrieben und im hinteren Bereich zu einer Röhre ausgehöhlt wird. Die Verlängerung der Kapillare wird bis zum Erreichen anderer Gefäße weitergeführt, so dass sich ein funktionelles Gefäßsystem etablieren kann. Ausgelöst wird dieser Prozess durch verschiedene Wachstumsfaktoren. An erster Stelle ist hier der „vaskular endothelium growth factor“ (VEGF) zu nennen, der aus den umliegenden Zellen freigesetzt wird (Terman and Dougher-Vermazen, 1996). VEGF ist spezifisch für das Endothel und zur Ausbildung der Blutgefäße erforderlich (Dvorak et al., 1999; Eriksson and Alitalo, 1999; Ferrara, 1999). Ein Auslöser der VEGF-Freisetzung sind hypoxische Signale (Dor and Keshet, 1997), die bei Unterversorgung des Gewebes mit Sauerstoff auftreten. Die Bildung von VEGF wird u.a. bei pathologischer Neubildung von Gefäßen beobachtet. Eine erhöhte Expression des Faktors konnte bei der Arteriosklerose (Dor and Keshet, 1997), bei der myocardialen Ischämie (Kuzuya et al., 1995) sowie bei der Ausbildung von Tumoren (Plate and Risau, 1995) nachgewiesen werden. Aber auch bei der Wundheilung und der Regeneration von verletzten Gefäßen wird der Wachstumsfaktor gebildet (Frank et al., 1995). VEGF wird von den Endothelzellen über Rezeptoren erkannt (Terman and Dougher-Vermazen, 1996) und induziert eine Reihe von Zellantworten. So führt die Stimulation mit VEGF zur Modulation der Zell-Zellkontakte sowie zur Expression von Proteasen. Zusätzlich steigert dieser Faktor die Zellproliferation und wirkt antiapoptotisch auf Endothelzellen (Dvorak et al., 1995; Ferrara and Davis-Smyth, 1997; Klagsbrun and D'Amore, 1996). VEGF ist ein wichtiger Bestandteil bei der Regulation der Angiogenese, allerdings sind neben diesem Wachstumsfaktor noch eine Reihe anderer Faktoren an dem Prozess beteiligt. Für den „fibroblast growth factor“ (FGF) konnte z.B. eine synergistische Wirkung zu VEGF gezeigt werden (Goto et al., 1993; Pepper et al., 1992), während der „platelet derived growth factor BB“ (PDGF-BB) die Endothel unterstützenden Perizyten anlockt (Hirschi and D'Amore, 1997) und für die weitere Gefäßentwicklung notwendig ist.

2.2 Die Bildung funktioneller Strukturen über Zellkontakte

Bei der Entwicklung komplexer Organismen ist die Abgrenzung der einzelnen Organe zur Schaffung lokaler Reaktionsräume zwingend notwendig. Die Organe setzen sich aus einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe zusammen. Die wesentlichen Gewebe von Wirbeltieren sind das Blut, die Lymphe sowie die Muskel-, Nerven-, Drüsen-, Epithel- und Bindegewebe (Alberts et al., 2004). Die Ordnung innerhalb der Gewebe wird über die Art und Weise des Zusammenhaltes der einzelnen Zellen geschaffen, die auf zwei allgemeinen Grundprinzipien beruhen: Ein Prinzip ist die Stabilisierung mit Hilfe der extrazellulären Matrix, in deren sezernierten Makromolekülen und Polymeren die Zellen eingebettet vorliegen. Ein typisches Gewebe, das überwiegend diese Art der Organisation aufweist, ist das Bindegewebe. Es besteht aus einer großen Menge an faserförmigen Polymeren und nur wenigen darin verteilten Zellen, die kaum Zell-Zellkontakte knüpfen. Die Bildung von Zell-Zellkontakten ist das zweite Stabilisierungsprinzip. Neben gut ausgebildeten Kontakten wird die Stabilität zusätzlich durch zugkräftige intrazelluläre Protein-Filamente gewährleistet, die an den Kontaktzonen verankert sind. Dieses Prinzip ist besonders in Epithelien ausgeprägt, deren extrazelluläre Matrix sich auf die Ausbildung der Basallamina beschränkt.

Sowohl die Epithelien als auch die Endothelien des Blutgefäßsystems bilden Zellschichten, die Gewebeoberflächen gegenüber Hohlräumen durch nahezu lückenlose Auskleidung abgrenzen (Alberts et al., 2004). Diese Barriere verhindert den unkontrollierten Austausch von Wasser, gelöstem Material und Zellen zwischen den Hohlräumen und den angrenzenden Geweben. Allerdings ist neben der Aufrechterhaltung der Barriere auch der selektive Austausch von Substanzen und Zellen für den Lebenserhalt von Geweben notwendig. Als Beispiel ist hier die Versorgung der Gewebe mit Nährstoffen, Sauerstoff und Zellen des Immunsystems sowie der Abtransport von Stoffwechselprodukten über das Blut zu nennen. Die Aufgabe des selektiven Transportes wird in den Epithelien und den Endothelien über zwei Wege erfüllt: Einerseits können Substanzen aktiv mit Hilfe von Vesikeln von der apikalen Seite der Zellen zu der basalen Seite transportiert werden (transzellulärer Weg) (Schnitzer, 1993). Andererseits kann der Transport zwischen den Zellen erfolgen (parazellulärer Weg) (Dejana et al., 1995), der eine komplexe Regulation der Zellkontakte erfordert. Die Struktur der Zellkontakte soll nun im Weiteren näher erläutert werden.

2.2.1 Die Komponenten der Zellkontakte in Epithelien und Endothelien

Die Bildung und Aufrechterhaltung der Zellkontakte wird durch eine Reihe von transmembranen Adhäsionsproteinen in den Kontaktzonen organisiert, die an zytosolische Struktur- und Regulatorproteine und Komponenten des Zytoskeletts gekoppelt sind (Gumbiner, 1996). Grundlegend für die Knüpfung der Kontakte ist die Assoziation der Transmembranproteine, die mit Proteinen der Nachbarzellen reißverschlussähnliche Strukturen ausbilden und darüber den Zell-Zellkontakt herstellen (Gumbiner, 2000; Shapiro et al., 1995; Takeichi, 1990). Anhand ihrer Struktur, Funktion und Lokalisierung werden die Kontakte in verschiedene Typen klassifiziert, die in drei funktionelle Klassen eingeteilt werden können (Alberts et al., 2004):

1. Die abdichtenden Verbindungen bilden die primäre Diffusionsbarriere, deren Durchlässigkeit für den Stoffaustausch reguliert werden kann. Zu dieser Art der Verbindungen gehören die „tight junctions“, die auch als „Zonula Occludens“ bezeichnet werden (Anderson and Van Itallie, 1995b; Diamond, 1977; Gumbiner, 1987; Schneeberger and Lynch, 1992; Tsukita et al., 1996).
2. Die Ankerverbindungen werden in Zell-Zellkontakten und Zell-Matrix-Kontakten geknüpft und sind an der Aufrechterhaltung der Stabilität der Zellverbände beteiligt. In den „adherence junctions“ („Zonulae Adherens“), die in Zell-Zellkontakten ausgebildet werden, und in den fokalen Adhäsionskontakten der Zell-Matrix-Kontaktzonen sind die zytosolischen Domänen der Kontaktproteine mit den Aktin-Filamenten des Zytoskeletts assoziiert (Burrige et al., 1988; Dejana, 1996; Farquhar and Palade, 1963; Geiger et al., 1985). Die Bindung der Ankerproteine an die Intermediär-Filamente liegt in den Desmosomen der Zell-Zellkontakte und den Hemidesmosomen der Zell-Matrix-Kontakte vor (Garrod, 1986).
3. Kommunizierende Verbindungen gewährleisten den lateralen Durchtritt von chemischen und elektrischen Signalen von Zelle zu Zelle und werden über die „gap junctions“ gebildet (Pitts and Finbow, 1986).

2.2.1.1 Die „Tight Junctions“

Die „tight junctions“ sind in polarisierten Epithelzellen im apikalen Bereich der Kontaktzonen lokalisiert und räumlich von den „adherence junctions“ getrennt (Abbildung 1). In Endothelien können die „tight junctions“ auch basal verschoben sein und gemischt mit den „adherence junctions“ auftreten (Anderson and Van Itallie, 1995a). Bei der Verwendung der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie in Epithelzellen des Dünndarms zeigen die „tight junctions“ ein dichtes Netzwerk verzweigter Stränge (Alberts et al., 2004). Ihre Funktion liegt im Aufbau und Erhalt der Diffusionsbarriere, indem sie die lateralen Kontaktbereiche der Endothelzellen gegenüber dem äußeren Lumen der Gefäße abdichten (Lampugnani and Dejana, 1997). Allerdings erlauben die „tight junctions“ eine selektive Permeabilität gegenüber Proteinen verschiedener Größe und Ladung (Gumbiner, 1993). In den Endothelien der Blutgefäße wird die Ausbildung der „tight junctions“ an die Notwendigkeit der Kontrolle der Permeabilität des Endothels gekoppelt. In der Blut-Hirn-Schranke und in den großen Arterien sind die „tight junctions“ gut ausgeprägt und erlauben im Gehirn eine strikte Kontrolle des Stoffaustausches zwischen Blut und Gewebe (Anderson and Van Itallie, 1995b). In den postkapillären Venolen hingegen, in denen vornehmlich die Extravasation der Leukozyten stattfindet, sind die „tight junctions“ entweder stark reduziert oder gar nicht vorhanden (Simionescu et al., 1975; Simionescu et al., 1976; Simionescu and Simionescu, 1991). Dieses ermöglicht den Immunzellen die Einwanderung ins Gewebe und erleichtert die Versorgung der Gewebe mit den lebensnotwendigen Substanzen.

Die „tight junctions“ sind aus Transmembranproteinen und einer Reihe zytosolischer Proteine zusammengesetzt. Bis jetzt wurden die Transmembranproteine Occludin, die Familie der Claudins und JAM-1, in den „tight junctions“ identifiziert (Bazzoni et al., 1999; Gumbiner, 1993; Mitic and Anderson, 1998). Während die Aufrechterhaltung der Diffusionsbarriere den Proteinen aus der Familie der Claudins zugeschrieben wird (Balda et al., 1996; Furuse et al., 1993; McCarthy et al., 1996), scheint Occludin an der Ausbildung der „tight junctions“ beteiligt zu sein (Furuse et al., 1998a; Furuse et al., 1998b). Für das Protein JAM-1 wird eine Funktion in der Regulation der Extravasation von Leukozyten aus dem Blutstrom vermutet. Intrazellulär binden die Transmembranproteine über ihre zytosolischen Domänen an die Proteine ZO-1, ZO-2, ZO-3, Cingulin und AF-6 bzw. ASIP (Ebnet et al., 2004; Tsukita et al., 2001). ZO-1 und ZO-2 können direkt mit den Aktin-Filamenten des Zytoskeletts assoziiert sein (Fanning and Anderson, 1998; Itoh et al., 1999) und stellen somit als kreuzvernetzende Proteine die Verbindung zwischen den „tight junctions“ und dem Zytoskelett her (Itoh et al., 1997).

2.2.1.2 Die Desmosomen und die „Complexi Adhaerentes“

In Epithelien stabilisieren die Desmosomen die interzelluläre Adhäsion und sorgen für eine hohe mechanische Stabilität der Zellschicht. Die Transmembranproteine Desmoglein und Desmocollin (Schwarz et al., 1990), die zu der Superfamilie der Cadherine gezählt werden, binden intrazellulär an die Proteine Desmoplakin I und II, Plakoglobin und die Proteine der Plakophilin-Familie. Diese sind wiederum mit den zugkräftigen Fasern der Keratin-Filamente verbunden (Schmidt et al., 1994).

Im Gegensatz zu den Epithelien werden im Endothel die klassischen Desmosomen nicht ausgebildet. Stattdessen werden dort ähnliche Strukturen gebildet, die als „Complexi Adhaerentes“ bezeichnet werden (Schmelz and Franke, 1993; Schmelz et al., 1994). In diesen Strukturen liegen das desmosomale Protein Desmoplakin mit dem endothelialen Transmembranprotein VE-Cadherin und den zytosolischen Proteinen Plakoglobin und Vimentin assoziiert vor (Lampugnani and Dejana, 1997; Valiron et al., 1996).

2.2.1.3 Die „Adherence Junctions“

Basal von den „tight junctions“ befinden sich die „adherence junctions“, die den so genannten Adhäsionsgürtel entlang der Zellen ausbilden (Farquhar and Palade, 1963). In den Endothelien der postkapillären Venolen sind diese „junctions“ die dominierenden Komponenten der Zell-Zellkontakte. Während der Zellproliferation sind die „adherence junctions“ die ersten geknüpften Zellkontakte und beteiligen sich an der Ausbildung der Zellpolarität. Einige der Bausteine dieser „junctions“ sind auch an wichtigen Wegen der Signalleitung beim Zellwachstum, der Zelldifferenzierung und der Proliferation beteiligt (Eastman and Grosschedl, 1999; Lampugnani et al., 2003; Novak and Dedhar, 1999; Simcha et al., 2001).

Der interzelluläre Kontakt zwischen den Zellen wird in den „adherence junctions“ über die transmembranen Adhäsionsproteine aus der Superfamilie der Cadherine vermittelt (Boller et al., 1985). In Epithelien wurde das Adhäsionsprotein E-Cadherin als Zellkontakt ausbildendes Protein identifiziert (Vestweber and Kemler, 1985), während in den Endothelzellen diese Aufgabe von VE-Cadherin übernommen wird (Dejana, 1996; Dejana et al., 1995). Intrazellulär sind die Cadherine mit den Proteinen β -Catenin, Plakoglobin (γ -Catenin) und p120^{ctn} aus der Familie der Armadillo Proteine assoziiert (Carmeliet et al., 1999; Hulsken et al., 1994; Miller and Moon, 1996; Pfeifer, 1995; Takeichi, 1990).

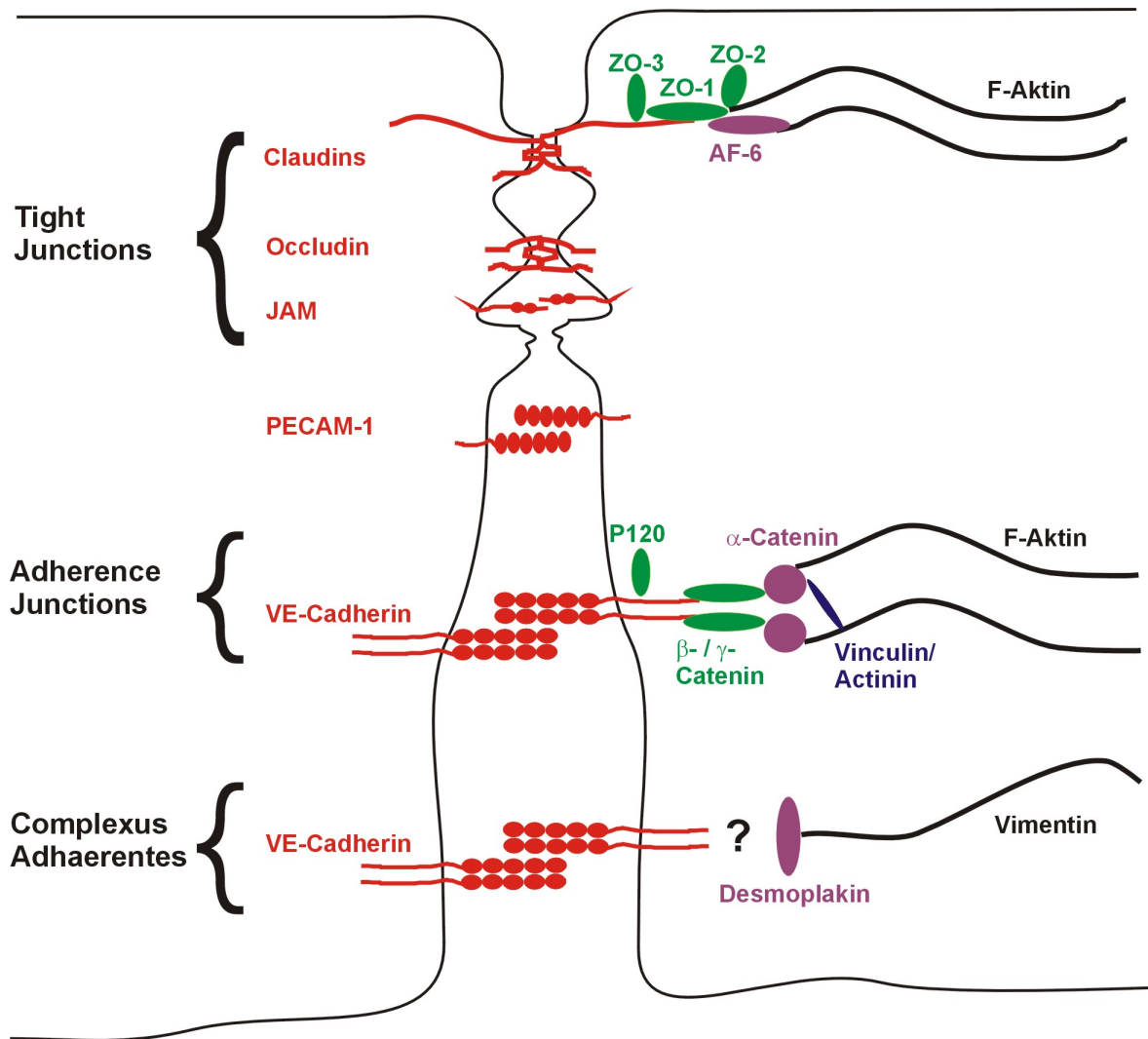


Abbildung 1: Schematische Darstellung ausgewählter Proteinkomplexe der endothelialen Zell-Zellkontakte.

β-Catenin und Plakoglobin sind im Gegensatz zu p120^{ctn} in der Lage α-Catenin zu binden, welches wiederum mit den Aktin-Filamenten des Zytoskeletts assoziiert (Daniel and Reynolds, 1995).

2.2.1.4 Adhäsionsproteine der Zell-Zellkontakte ohne strukturelle Zuordnung

Neben den definierten Komponenten der Zellkontakte sind auch einzelne transmembrane Adhäsionsproteine in den Zell-Zellkontakten lokalisiert.

Ein bislang intensiv untersuchtes Adhäsionsprotein des Endothels ist PECAM-1 („platelet endothelial cell adhesion molecule-1“), das zur Superfamilie der Immunglobuline gehört (DeLisser et al., 1994) und homophile, interzelluläre Kontakte ausbildet (Telo et al.,

1997). In subkonfluenten Endothelzellen ist PECAM-1 diffus über die Zellmembranen verstreut und wird nach der Ausbildung der Zell-Zellkontakte in diesen konzentriert (Matsumura et al., 1997). PECAM-1 scheint in Endothelien an der Signalweiterleitung während der Angiogenese, der Wundheilung und der Extravasationskontrolle von Leukozyten beteiligt zu sein (Muller et al., 1993; Newman et al., 1990; Vaporciyan et al., 1993). In seiner zytosolischen Domäne besitzt PECAM-1 zwei ITIM-Motive („immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs“) (Cambier, 1997; Vivier and Daeron, 1997), deren Tyrosine nach der Stimulation phosphoryliert werden. Auslöser dieser Phosphorylierung sind Scherkräfte des Blutstroms (Osawa et al., 1997), Aggregation des IgE-Rezeptors (Sagawa et al., 1997b) und die homophile Aggregation des PECAM-1 (Varon et al., 1998). An die aktivierten ITIM-Motive assoziieren intrazelluläre Lipid- und Protein-Tyrosin-Phosphatasen mit Hilfe der src-homologen Bindungsdomänen (SH-Domänen). Nachfolgend inhibieren die Phosphatasen die über Tyrosin-Kinasen vermittelte Signalweiterleitung durch die Dephosphorylierung ihrer Substrate. Für PECAM-1 wurde die Interaktion mit den Phosphatasen SHIP, SHP-1 und SHP-2 über die ITIM-Motive nachgewiesen (Cao et al., 1998; Hua et al., 1998; Jackson et al., 1997; Pumphrey et al., 1999; Sagawa et al., 1997a). Weitere intrazelluläre Bindungspartner von PECAM-1 sind phosphoryliertes β -Catenin (Ilan et al., 1999; Matsumura et al., 1997) und Tyrosin-Kinasen aus den Familien der Src- und CSK-Kinasen (Cao et al., 1998). Neben PECAM-1 konnten noch weitere Adhäsionsproteine, wie z.B. CD34 (Baumhueter et al., 1994), CD99 (Schenkel et al., 2002) oder VE-Cadherin-2 (Telo et al., 1998), außerhalb der „tight“ oder „adherence junctions“ in den Zell-Zellkontakten nachgewiesen werden.

2.2.2 Die Beteiligung VE-Cadherins an der Extravasation immunrelevanter Zellen

Die Regulation der Integrität des Endothels ist die Grundlage für eine Reihe biologischer Prozesse. Ein wichtiger Vorgang, an dem das Endothel direkt beteiligt ist, stellt die Auswanderung von Leukozyten des Immunsystems aus dem Blut in entzündete Gewebe bzw. in die sekundären Lymphorgane (Extravasation) dar. Die Extravasation wird über Zelladhäsionsmoleküle und Signalmoleküle der Leukozyten und der Endothelzellen (Panes and Granger, 1998; Vestweber and Blanks, 1999) vermittelt, die in koordinierter Reihenfolge gebildet und präsentiert werden. Diese geordnete Folge wird auch als Adhäsionskaskade bezeichnet (Butcher, 1991; Springer, 1995). Im letzten Schritt dieser Kaskade erfolgt die Transmigration der Leukozyten durch das Endothel ins Gewebe. Der genaue Mechanismus der Transmigration ist bisher ungeklärt. Viele Studien favorisieren den parazellulären Weg

der Leukozyten, der zwischen den einzelnen Endothelzellen verläuft (Burns et al., 1997; Johnson-Leger et al., 2000), gegenüber dem transzellulären Weg, der die Leukozyten durch die einzelne Endothelzelle leitet (Feng et al., 1998). Der parazelluläre Weg setzt die Öffnung und Schließung der Zellkontakte zwischen den Endothelzellen voraus, die die Extravasation ermöglichen. Das dominante Adhäsionsmolekül, das in den postkapillären Venolen die Zell-Zellkontakte der Endothelzellen ausbildet, ist VE-Cadherin. Bis jetzt konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die von VE-Cadherin vermittelten Kontakte die Barriere für die Leukozyten-Extravasation darstellen: Die Blockierung der *trans*-Dimerisierung von VE-Cadherin und der Ausbildung der Kontakte mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern führt zu einer erhöhten Auswanderung von neutrophilen Granulozyten in entzündete Peritonei (Gotsch et al., 1997). Während der Transmigration der Leukozyten wird VE-Cadherin kurzfristig aus den Zell-Zellkontakten entfernt. Dies konnte in HUVEC-Zellen mit Hilfe einer Echtzeitbildaufnahme von der Verteilung eines VE-Cadherin-GFP Fusionsproteins gezeigt werden (Shaw et al., 2001). Zusätzlich konnte eine erhöhte vaskuläre Permeabilität durch die Behandlung mit VE-Cadherin-Antikörpern im Herzen und in der Lunge nachgewiesen werden (Corada et al., 1999). Neben der direkten Öffnung der Zell-Zellkontakte durch die migrierenden Leukozyten kann deren Integrität auch über vasoaktive Substanzen reguliert werden. Diese Mediatoren werden von aktivierten Leukozyten zur Rekrutierung weiterer immunrelevanter Zellen sezerniert und erhöhen die Permeabilität des Endothels. Histamin und Thrombin nehmen z.B. Einfluss auf den Cadherin-Catenin-Komplex der „adherence junctions“. Während Thrombin die Dissoziation der Catenine von VE-Cadherin fördert (Rabiet et al., 1996), steigert Histamin den Phosphorylierungsgrad von VE-Cadherin und β -Catenin (Andriopoulou et al., 1999). Unter dem Einfluss von TNF- α („tumor necrosis factor- α “) und IFN- γ (Interferon- γ) erfolgt eine Umverteilung von VE-Cadherin aus den Kontakten (Wong et al., 1999).

2.2.3 Die Beteiligung VE-Cadherins an dem Aufbau vaskulärer Strukturen

Neben der Teilnahme von VE-Cadherin an der Transmigration von Leukozyten ist dieses Adhäsionsprotein an der Bildung von vaskulären Strukturen beteiligt. VE-Cadherin wird schon frühzeitig während der embryonalen Entwicklung (Tag 7,5) gebildet und liegt zu diesem Zeitpunkt in den mesodermalen Zellen des Dottersack-Mesenchyms vor. In der späteren Entwicklung ist die Expression von VE-Cadherin auf die peripheren Schichten der Blutinseln beschränkt, aus denen sich die Endothelzellen differenzieren (Breier et al., 1996). Embryonen der Maus, die für VE-Cadherin defizient sind oder ein verkürztes VE-

Cadherin exprimieren, das keine Assoziation mit den Cateninen und dem Zytoskelett eingehen kann, sind nicht überlebensfähig und sterben am Tag 9,5 der Schwangerschaft (Carmeliet et al., 1999; Gory-Faure et al., 1999). Die lockere Zusammenlagerung der Endothelzellen im vaskulären Plexus während der Vaskulogenese wird zunächst nicht beeinflusst, dafür unterbleibt die darauf folgende Umgestaltung und Reifung des Endothels aufgrund einer erhöhten Apoptoserate der Endothelzellen. Durch die Expression des verkürzten VE-Cadherins oder der vollständigen Inhibition seiner Expression wird die Signalweiterleitung über den VEGF-R2 nach dem Stimulus mit dem Wachstumsfaktor VEGF unterbunden. Diese Befunde wurden so gedeutet, dass VE-Cadherin in dem Prozess der Vaskulogenese nicht die direkte Adhäsion der Endothelzellen vermittelt sondern an dem Signalweg von VEGF beteiligt ist. Dieser gewährleistet das Überleben der Zellen und reguliert die Apoptose negativ (Carmeliet et al., 1999). Allerdings konnten Gory-Faure et al. durchaus Defekte bei der Kontaktausbildung von Endothelzellen beobachten (Gory-Faure et al., 1999). Passend dazu konnte mit Hilfe von „embryonalen Körperchen“ („embryoid bodies“, EB), die aus VE-Cadherin defizienten Stammzellen hergestellt wurden, belegt werden, dass die adhäsiven Fähigkeiten von VE-Cadherin zur Aggregation der Endothelzellen und Ausbildung von vaskulären Strukturen notwendig sind. Im Gegensatz zu EB_{Wild-Typ} bleiben die Endothelzellen in den VE-Cadherin (-/-) EBs vereinzelt und bilden keine höheren vaskulären Strukturen aus (Vittet et al., 1997). Die molekularen Prozesse, über die VE-Cadherin an diesen komplexen Vorgängen beteiligt sein könnte, sollen nun im Folgenden näher erläutert werden.

2.2.4 Der Aufbau des Cadherin-Catenin-Komplexes

Die grundlegenden Bausteine der „adherence junctions“ sind die Adhäsionsproteine aus der Superfamilie der Cadherine, zu denen VE-Cadherin gehört. Diese Superfamilie wird in sechs Klassen untergliedert, die sich in der Zusammensetzung der Proteindomänen und der genomischen Organisation unterscheiden. Neben den ursprünglich gefundenen klassischen Cadherinen (Typ I) (Tanihara et al., 1994), zu denen E-, N-, R- und P-Cadherin gezählt werden, wurden in den folgenden Jahren weitere Cadherine identifiziert. Den untypischen Cadherinen (Typ II) (Tanihara et al., 1994) wird u.a. das endotheliale VE-Cadherin zugeordnet. Das Unterscheidungsmerkmal zwischen beiden Subfamilien ist die Ausbildung der konservierten His-Ala-Val Zelladhäsions-Erkennungssequenz in der ersten Cadherin-Domäne (Tanihara et al., 1994), die nur in den klassischen Cadherinen vorliegt (Nollet et al., 2000). Während die Cadherine des Typs I untereinander eine größere Homologie in der

Proteinsequenz aufweisen (68%-78% in der ersten Cadherin-Domäne im Vergleich zu E-Cadherin), ist die Homologie der Typ II-Cadherine zu denen des Typs I geringer (43%-50% der ersten Cadherin-Domäne im Vergleich zu E-Cadherin). Im Übrigen sind die generellen Strukturen der Proteine in beiden Subfamilien ähnlich (Nollet et al., 2000), und Vertreter beider Subfamilien sind in den „adherence junctions“ verschiedener Zelltypen lokalisiert (Boller et al., 1985). In neueren Publikationen werden die Cadherine des Typs I und II auch als klassische Cadherine bezeichnet (Vestweber, 2000). Auf die anderen vier Subfamilien, in denen z.B. die desmosomalen Cadherine (Desmocolline und Desmogleine) oder die Protocadherine zusammengefasst werden, soll hier nicht weiter eingegangen werden.

Die klassischen Cadherine (Typ I und II) sind einsträngige Transmembranproteine (Typ I). Sie bestehen aus einer transmembranen, einer extrazellulären und einer intrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Domäne ist aus fünf konservierten Cadherin-Domänen zusammengesetzt, die in Abhängigkeit von Ca^{2+} -Ionen die adhäsiven Fähigkeiten der Proteine vermitteln. Die Ca^{2+} -Bindungsstellen sind jeweils in den Grenzbereichen zwischen den Cadherin-Domänen lokalisiert und gewährleisten nach der Ionenbindung eine stäbchenartige Form der Cadherine, die sie über die Oberfläche der Zellen erheben. Das Funktionsmodell der Cadherine basiert auf einer lateralen Assoziation von zwei Molekülen in der *cis*-Konformation und der Ausbildung von Cadherin-Dimeren (Yap et al., 1997). Ausgehend von diesen Dimeren interagieren die Cadherine zweier benachbarter Zellen in den „adherence junctions“ über homophile Interaktionen in *trans*-Konformation und bilden reißverschlussähnliche Strukturen. Für E-Cadherin konnte gezeigt werden, dass sowohl die Dimerisierung als auch die interzellulären Interaktionen in *trans*-Stellungen von der vorliegenden Ca^{2+} -Konzentration abhängen. Mit einer zunehmenden Kalziumkonzentration dimerisieren die Cadherine zunächst in *cis*-Konformation, gefolgt von der Ausbildung der *trans*-Bindung zu den Nachbarzellen. Diese Abhängigkeit ermöglicht die physiologische Regulation der Bindungen über den externen Kalziumgehalt (Pertz et al., 1999).

Die intrazellulären Domänen der klassischen Cadherine weisen zwei konservierte Regionen auf. C-terminal von der transmembranen Domäne befindet sich die membranproximale, konservierte Domäne (MPCD), die u.a. die Bindung an p120^{ctn} vermittelt. Im Gegensatz zu den anderen Cadherinen, wie z.B. N- oder E-Cadherin, ist diese Sequenz in VE-Cadherin weniger stark konserviert, beinhaltet aber dennoch die p120^{ctn}-Bindungsstelle (Breviario et al., 1995). Die Bindungssequenzen für β -Catenin und γ -Catenin sind innerhalb des VE-Cadherins in den letzten 83 Aminosäuren der zytosolischen Domäne lokalisiert (Nollet et al., 2000).

Für die Struktur des VE-Cadherin-Catenin-Komplexes können in einem vereinfachten Modell zwei Zustände definiert werden: In vereinzelt Zellen ist VE-Cadherin über die gesamte Zellmembran verteilt und wird mit zunehmender Konfluenz in die neu zu bildenden „adherence junctions“ rekrutiert. Solange diese noch nicht vollständig ausgereift sind, ist VE-Cadherin mit β -Catenin und p120^{ctn} assoziiert. Mit zunehmender Konfluenz und Stabilität der „junctions“ dissoziiert p120^{ctn} aus diesem Komplex, während β -Catenin durch γ -Catenin ersetzt wird (Lampugnani et al., 1997; Lampugnani et al., 1995). Entsprechend der Rekrutierung in den Komplex zu unterschiedlichen Konfluenzstadien, können p120^{ctn}, β -Catenin und γ -Catenin verschiedene Aufgaben zugeschrieben werden. p120^{ctn} kann im Gegensatz zu den Cateninen in diesem Komplex weder direkt noch indirekt mit den Aktin-Filamenten assoziieren und ist deshalb nicht an der Stärkung der Zell-Zellkontakte der ausgereiften „junctions“ beteiligt. Stattdessen ist p120^{ctn} für die Stabilisierung von VE-Cadherin an der Membran verantwortlich, in dem es die Internalisation und Degradation des Cadherins reguliert (Xiao et al., 2003). Über die Catenine wird VE-Cadherin mit dem Zytoskelett verbunden. Sowohl β -Catenin als auch γ -Catenin binden an α -Catenin, das wiederum entweder direkt oder über Vinculin oder α -Actinin mit dem F-Aktin-Zytoskelett assoziiert ist (Imamura et al., 1999; Knudsen et al., 1995; Rimm et al., 1995) und darüber die Zell-Zellkontakte verstärkt. Wird die Assoziation der Catenine zu VE-Cadherin durch die Deletion der Bindungsstellen unterbunden, ist dieses Cadherin, im Gegensatz zu E- und N-Cadherin (Hirano et al., 1992; Ozawa et al., 1989; Ozawa et al., 1990), weiterhin in der Lage, die frühen Stadien der adhäsiven Zellkontaktbildung zu vermitteln. Die Stabilität der „junctions“ und der Aufbau der Permeabilitätsbarriere des Endothels wird jedoch erheblich reduziert (Navarro et al., 1995). Demnach scheinen die Catenine keinen Einfluss auf die initiale Bildung der VE-Cadherin vermittelten Zell-Zellkontakte auszuüben, sie sind allerdings für die Stärkung der „adherence junctions“ und den Aufbau der Permeabilitätsbarriere notwendig.

2.2.5 Die Regulation des Cadherin-Catenin-Komplexes

Der Regulation der Adhäsivität von Cadherinen und der Funktion des Cadherin-Catenin-Komplexes können bislang drei Mechanismen zugrunde gelegt werden. Diese sind miteinander gekoppelt und beeinflussen sich häufig gegenseitig, so dass sie als vereinfachte Grundprinzipien angesehen werden sollten: 1. Die Zusammensetzung des Komplexes aus den einzelnen Komponenten (die bereits in Abschnitt 2.2.4 erläutert wurde); 2. Die Kopp-

lung des Komplexes an das Zytoskelett; 3. Die Regulation des Phosphorylierungsgrades der einzelnen Komplex-Komponenten.

2.2.5.1 Die Einflussnahme des Zytoskeletts auf die Funktion des Cadherin-Catenin-Komplexes

Einer der möglichen Regulationswege könnte über die Kopplung des Komplexes an das Zytoskelett erfolgen. Bislang konnten die kleinen GTPasen Rac, Rho und Cdc42 als beteiligte Proteine bei der Cadherin vermittelten Adhäsion identifiziert werden (Kaibuchi et al., 1999). Dieser Typ der GTPasen nimmt an der Organisation des Zytoskeletts teil und reguliert u.a. die Aktin-Membran-Interaktionen (Hall, 1998). Die Überexpression von konstitutiv aktiviertem Rac führt zu einer erhöhten Akkumulierung von E-Cadherin, β -Catenin und Aktin in den Zell-Zellkontakten (Braga et al., 1997; Takaishi et al., 1997). Sowohl durch Tiam-1, einem Nukleotidaustauschfaktor von Ras, der in den „adherence junctions“ von MDCK-Zellen lokalisiert ist, als auch durch konstitutiv aktiviertes Ras wird während der Zellaggregation die Adhäsivität von E-Cadherin gesteigert (Hordijk et al., 1997). Die Bindung von IQGAP1, einem Effektor von Cdc42 und Rho an den Cadherin-Catenin-Komplex, führt zur Dissoziation von α -Catenin aus den „junctions“. Nachfolgend verlieren diese die Assoziation an das Zytoskelett, so dass die Zelladhäsion geschwächt wird. Cdc42 und Rac1 verhindern wiederum die Anbindung von IQGAP1 und stabilisieren die „adherence junctions“ (Gumbiner, 2000). Allerdings konnte über die Blockierung der kleinen GTPasen Rho und Rac ein Einfluss dieser Proteine auf die Funktion der endothelialen „adherence junctions“ nicht nachgewiesen werden (Braga et al., 1999).

2.2.5.2 Die Regulation des Cadherin-Catenin-Komplexes über die Phosphorylierung

Ein allgemeines Grundprinzip bei der Regulation der Aktivität von Proteinen und Enzymen ist die Phosphorylierung von spezifischen Seitenketten der Aminosäuren Tyrosin, Serin und Threonin. Auch in der Regulation der Stabilität der Zell-Zellkontakte ist dieses Prinzip verwirklicht (Daniel and Reynolds, 1997). Die Adhäsivität von VE-Cadherin und der Zusammensetzung des Cadherin-Catenin-Komplexes korreliert mit dem Phosphorylierungsgrad der Tyrosine einzelner Komplexkomponenten, und dieser ändert sich entsprechend der biologischen Funktionen.

Während der Proliferation von Endothelzellen in Kultur nimmt die Zelldichte Einfluss auf die Tyrosin-Phosphorylierung des Komplexes. In subkonfluenten Zellen, in denen VE-

Cadherin mit p120^{cas} und β -Catenin assoziiert vorliegen, sind die einzelnen Komponenten relativ stark phosphoryliert. Je länger sich die Zellen im konfluenten Zustand befinden, in dem die „adherence junctions“ reifen und die Assoziation von VE-Cadherin zu γ -Catenin zunimmt, desto stärker wird die Tyrosin-Phosphorylierung der Komponenten reduziert (Lampugnani et al., 1997). Damit übereinstimmend konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass mit zunehmender Phosphorylierung des Komplexes die Adhäsivität der Cadherine und die Stabilität der „junctions“ in Epithelien reduziert werden, während die Permeabilität der Zellschichten ansteigt (Behrens et al., 1993; Hoschuetzky et al., 1994). Für E-Cadherin konnte ein weiterer Regulationsmechanismus der Adhäsivität auf der Basis der Tyrosin-Phosphorylierung identifiziert werden. Kürzlich wiesen Fujita et al. nach, dass die c-Cbl-zugehörige E3-Ligase Hakai mit Tyrosin phosphoryliertem E-Cadherin assoziiert und dieses über die Ubiquitinierung zur Degradation in den Proteasomen markiert (Fujita et al., 2002). Aus der Entfernung der Adhäsionsmoleküle aus den „junctions“ resultiert die Destabilisierung der Zell-Zellkontakte.

Wie auch in anderen phosphorylierungsabhängigen Systemen erfolgt die Einstellung der Tyrosin-Phosphorylierung der Cadherin-Catenin-Komplexe über ein komplexes Zusammenspiel aus Kinasen und Phosphatasen. Beide Enzymgruppen werden anhand ihrer Funktion und der Lokalisierung in zwei Unterfamilien aufgeteilt. Die zytosolischen Protein-Tyrosin-Kinasen (TK) bzw. Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) liegen frei innerhalb des Zytosols vor und werden bei Bedarf über spezielle Domänen, wie z.B. über die SH2- oder SH3-Domänen, an den Ort der Verwendung rekrutiert. Die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) und die Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatasen (RPTP) sind transmembrane Proteine, die über extrazelluläre Signalstoffe oder membrangebundene Liganden in ihrer katalytischen Aktivität modifiziert werden. RTKs katalysieren im aktivierten Zustand intrazellulär die Tyrosin-Phosphorylierung ihrer Substrate und sind aufgrund der Trennung zwischen extrazellulärer Aktivierung und intrazellulärer Reaktion häufig an Signaltransduktionswegen beteiligt. Der Mechanismus der Aktivierung verläuft über die Dimerisierung der monomeren Rezeptoren nach der Bindung ihrer Liganden mit Hilfe der extrazellulären Domänen. Innerhalb der Dimere wird die räumliche Voraussetzung der gegenseitigen Phosphorylierung an definierten Regulatorotyrosinen geschaffen. Diese Phosphorylierung führt zu der Steigerung der Kinaseaktivität und ermöglicht die Anbindung der Substrate bzw. weiterer katalytischer Proteine (Schlessinger, 1988; Weiss and Schlessinger, 1998). Auf die RPTPs konnte das Prinzip der Aktivierung über die Dimerisierung nicht übertra-

gen werden (Bixby, 2001). Stattdessen wird die enzymatische Aktivität einiger RPTPs nach der Bindung der Liganden inhibiert (Meng et al., 2000; Zeng et al., 1999).

Bislang konnten mehrere Phosphatasen identifiziert werden, die mit den Cadherin-Catenin-Komplexen assoziiert vorliegen. Die genauen regulatorischen Mechanismen, die zur Bindung der Phosphatasen und deren Aktivierung führen, sind zurzeit noch nicht bekannt. Über β -Catenin werden die zytosolischen Phosphatasen SHP-2 und die Rezeptor-Phosphatasen RPTP κ , RPTP β/ξ und LAR rekrutiert (Fuchs et al., 1996; Kypta et al., 1996; Meng et al., 2000; Ukropec et al., 2000). Für SHP-2 konnte gezeigt werden, dass diese Phosphatase nach der Stimulierung von Endothelzellen mit Thrombin aus dem Komplex dissoziiert. Dieser Effekt tritt ebenfalls zusammen mit der Phosphorylierung von β -Catenin und der Dissoziation von α -Catenin durch mechanische Scherkräfte auf, die auf das Endothel einwirken (Ukropec et al., 2000; Ukropec et al., 2002). Die Überexpression der RPTP LAR reduziert die Tumorbildung bei Mäusen und führt zu einer verminderten „epidermal growth factor“ (EGF) vermittelten Migration von Epithelzellen (Muller et al., 1999). p120^{ctn} bindet an SHP-1 und RPTP μ und wird von diesen dephosphoryliert (Zondag et al., 2000). Für die Cadherine wurden drei Bindungspartner aus der Familie der Phosphatasen identifiziert. Im Gegensatz zu E-Cadherin assoziiert N-Cadherin mit phosphorylierter PTP-1B, die sich nach der Bindung dephosphoryliert und zusammen mit β -Catenin vom Cadherin dissoziiert. Nachfolgend verliert das N-Cadherin die Bindung an das Zytoskelett und die Adhäsion der Zellen wird geschwächt (Balsamo et al., 1998). E-, N- und R-Cadherin sind Interaktionspartner der Phosphatase RPTP μ , deren Funktion in der Stabilisierung des Cadherin-Catenin-Komplexes zu bestehen scheint (Hellberg et al., 2002). Die endotheliale RPTP VE-PTP assoziiert mit VE-Cadherin (Nawroth et al., 2002) und N-Cadherin (persönliche Mitteilung von Benjamin August). In CHO-Zellen dephosphoryliert diese Phosphatase die über Flk-1 phosphorylierten Tyrosine des VE-Cadherins. Dadurch fördert sie die Integrität der Zell-Zellkontakte (Nawroth et al., 2002) und die Aggregation der Zellen (persönliche Mitteilung von Stephan Kloep). Im Gegensatz zu den anderen Phosphatasen, die über die zytosolischen Domänen mit den Cadherinen interagieren, wird die Bindung von VE-PTP an VE-Cadherin über die extrazelluläre Domäne vermittelt. Eine weitere Phosphatase, die mit dem Cadherin-Catenin-Komplex assoziiert vorliegt, ist DEP-1. Dieses Enzym ist offenbar an den Signaltransduktionswegen des VEGF-R2 beteiligt (Lampugnani et al., 2003).

Die direkte Phosphorylierung der Komponenten der Cadherin-Catenin-Komplexe kann über die zytosolischen Enzyme aus der Familie der Src-Kinasen vermittelt werden. Inner-

halb der N- und E-Cadherin-Komplexe können sowohl die Cadherine als auch die assoziierten Komponenten α -, β - und γ -Catenin und p120^{cas} über exogene, konstitutiv aktive v-Src phosphoryliert werden. Nachfolgend werden die Bindungen an das Zytoskelett und die Cadherin vermittelte Zelladhäsion verringert (Behrens et al., 1993; Hamaguchi et al., 1993; Hazan and Norton, 1998; Matsuyoshi et al., 1992; Tsukita et al., 1992; Volberg et al., 1992). In HUVEC-Zellen kann die VEGF vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin mit Hilfe von chemischen Inhibitoren der Src-Aktivität oder über die exogene Expression des Src-Inhibitors CSK reduziert werden (Lin et al., 2003). Neben den TKs sind auch RTKs an der Phosphorylierung der Cadherin-Catenin-Komplexe beteiligt. Die Aktivierung der Rezeptoren von EGF erhöht die Tyrosin-Phosphorylierung von β -Catenin. Dadurch werden dessen Affinität zu E-Cadherin und die Stabilität der Cadherin vermittelten Kontakte reduziert (Hoschuetzky et al., 1994). In Endothelzellen stimuliert VEGF-A die Phosphorylierung von VE-Cadherin, die über den VEGF-R2 vermittelt wird (Esser et al., 1998). Die Koexpression von exogenem VE-Cadherin und VEGF-R2 in CHO-Zellen erhöht den Phosphorylierungsstatus von VE-Cadherin, der wiederum Einfluss auf die Integrität der Zell-Zellkontakte nimmt (Nawroth et al., 2002). Bis heute konnte keine direkte Phosphorylierung von VE-Cadherin über den aktivierten VEGF-R2 nachgewiesen werden. In der Literatur wird statt der direkten eine indirekte Phosphorylierung von VE-Cadherin über die Rekrutierung von Src-Kinasen diskutiert (Esser et al., 1998; Lin et al., 2003).

2.2.5.3 Die Beteiligung des VE-Cadherin-Catenin-Komplexes an der Signaltransduktion

Neben der Ausbildung und Stabilisierung der Zell-Zellkontakte sind die VE-Cadherin-Catenin-Komplexe an Signaltransduktionswegen beteiligt. Bis heute wurden zwei Modelle der Signalweiterleitung etabliert. Einerseits können freie zytosolische Komponenten des Komplexes direkt mit Transkriptionsfaktoren assoziieren und die Expression definierter Proteine des Zellwachstums und der Differenzierung regulieren. Andererseits interagiert der Komplex mit aktivierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und ist an deren Signalweiterleitung beteiligt.

Ein Beispiel für das erste Modell ist die Teilnahme von β -Catenin an der Wnt-Signalweiterleitung. Im Zytosol werden die Catenine über den APC- (Adenomatous Polyposis Coli) Weg degradiert (Barth et al., 1997). Freies, zytosolisches β -Catenin ist jedoch ein Bestandteil des Wnt-Signalweges. Durch die Stimulation des Wnt-Signalweges wird β -Catenin der Degradation entzogen und stabilisiert. Nach dem Transport zum Zellkern bin-

det β -Catenin an Transkriptionsfaktoren der „high mobility group“, wie z.B. TCF/LEF-1, und reguliert darüber die Expression von Proteinen des Zellwachstums und der Differenzierung (Behrens et al., 1996; Huber et al., 1996). Der Cadherin-Catenin-Komplex inhibiert diesen Signalweg indirekt, indem die verfügbare Menge an β -Catenin durch die Bindung an die Cadherine herabgesetzt wird (Simcha et al., 2001).

Der zweite Mechanismus der Signaltransduktion verläuft über die Interaktion des Komplexes mit RTKs, die über die Bindung extrazellulärer Liganden aktiviert werden. Die wichtigsten Wachstumsfaktoren, die auf das Endothel einwirken, sind der Familie der VEGFs zuzuordnen (s. 2.1). Die Assoziation des VEGF-R2 mit dem VE-Cadherin-Komplex ist an der Inhibition der Apoptose von Endothelzellen während der Vaskulogenese bzw. der Angiogenese beteiligt. VE-Cadherin, β -Catenin und VEGF-R2 bilden zusammen mit der Phosphoinositide-3-OH-Kinase einen Komplex, der die Weiterleitung des VEGF-Signals vermittelt (Carmeliet et al., 1999). Nach der Stimulation des VEGF-R2 folgt die Aktivierung der Serin-Threonin-Kinase Akt (Protein-Kinase-B) und die erhöhte Expression des Proteins Bcl-2. Im aktivierten Zustand inhibieren Akt und Bcl-2 die Zellapoptose und fördern das Zellwachstum (Gerber et al., 1998a; Gerber et al., 1998b). Die Deletion der β -Catenin-Bindungsstelle des VE-Cadherins sowie die Unterbindung der VE-Cadherin-Expression verhindern die Aktivierung von Akt und die Bildung von Bcl-2. Dies hat zur Folge, dass die Gefäßbildung empfindlich gestört wird und Mausembryonen am Tag 9,5 nach der Befruchtung sterben (Carmeliet et al., 1999).

In den letzten Jahren wurde ein weiterer VEGF-R2 vermittelter Signalweg identifiziert, über den die Proliferationsraten von Endothelzellen reguliert werden. Zur Erneuerung des Endothels nach einer Verwundung oder während der Angiogenese unterliegen die Zellen einer erhöhten Zellteilungsrate. Diese hält bis zur vollständigen Ausbildung des Endothels in den Gefäßen an. Der über VEGF-A stimulierte VEGF-R2 aktiviert die PLC γ (Takahashi et al., 2001) und in manchen Fällen Ras (Meadows et al., 2001), die über die Kaskade der MAP-Kinase die Zellproliferation fördern. Mit zunehmender Zelldichte und der Ausbildung der Zell-Zellkontakte nimmt die Proliferationsrate der Zellen ab. An diesem negativen Regulationsprozess ist offenbar der VE-Cadherin-Komplex beteiligt (Carmeliet et al., 1999; Lampugnani et al., 2003; Rahimi and Kazlauskas, 1999; Caveda et al., 1996). In einer Studie konnte 2003 nachgewiesen werden, dass der Phosphorylierungsgrad des VEGF-R2 und dessen Aktivität nach der Bindung von VEGF in subkonfluenten Endothelzellen gegenüber dem in konfluenten Zellen wesentlich erhöht ist. Für diesen Effekt ist die Expression von VE-Cadherin notwendig, das zur Bindung an β -Catenin und zur Ausbil-

dung des Cadherin-Catenin-Komplexes fähig ist. Zusätzlich konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Kontakt-Inhibition der VEGF-A stimulierten Proliferation von Endothelium-Zellen über die Ausbildung des Cadherin-Catenin-Komplexes reguliert wird. Als Effektor der Dephosphorylierung von VEGF-R2 in konfluenten Zellen diskutieren die Autoren die Phosphatase DEP-1 (Lampugnani et al., 2003), die Konfluenz abhängig reguliert wird und in den interzellulären „junctions“ lokalisiert ist (Takahashi et al., 1999).

Neben der Inaktivierung des VEGF-R2 über den Cadherin-Catenin-Komplex wurde 2002 ein weiterer Regulationsmechanismus der Kontakt-Inhibition identifiziert, der von VE-Cadherin abhängig ist. Als Folge der Stimulation des VEGF-R2 wird das Gerüstprotein Shc phosphoryliert (Zanetti et al., 2002). Dieses vermittelt die Kopplung der Proteine Grb-Sos mit Ras, die an der Regulation der Zellproliferation beteiligt sind (Pawson and Scott, 1997; Pelicci et al., 1992). Das über aktiviertes VEGF-R2 phosphorylierte VE-Cadherin rekrutiert in konfluenten Zellen Shc in den Cadherin-Catenin-Komplex, der offenbar an dessen Dephosphorylierung beteiligt ist. Die Dephosphorylierung von Shc unterbindet dessen Assoziation mit Grb-Sos und Ras und inhibiert den nachfolgenden Signalweg der Zellproliferation (Zanetti et al., 2002).

2.2.6 Die Zielsetzung dieser Dissertation

VE-Cadherin ist an vielen Regulations- und Signalweiterleitungsprozessen im Endothel beteiligt. Diese Aufgaben umfassen die Ausbildung der endothelialen Zell-Zellkontakte über den Cadherin-Catenin-Komplex in den „adherence junctions“, die Regulation der darüber aufgebauten Permeabilitätsbarriere und die Teilnahme an der VEGF vermittelten Signaltransduktionswege während der Gefäßentwicklung. Zur Ausübung dieser Funktionen ist die Zusammensetzung des Cadherin-Catenin-Komplexes von elementarer Bedeutung. Abhängig von den Entwicklungsstadien der Endothelzellen bzw. von der zellbiologischen Funktion assoziieren verschiedene Komponenten mit dem VE-Cadherin-Catenin-Komplex. Dies geht wiederum mit einer Änderung der Tyrosin-Phosphorylierung des Komplexes einher.

Das Ziel dieser Dissertation war die Identifikation weiterer zytosolischer Interaktionspartner von VE-Cadherin, die einen funktionellen Einfluss auf den Cadherin-Catenin-Komplex ausüben. Die Suche nach VE-Cadherin assoziierten Proteinen erfolgte mit Hilfe des „yeast two hybrid“-Systems, während die weitere Charakterisierung der gefundenen Interaktionen auf biochemischen und immunhistochemischen Wegen durchgeführt wurde. Die physiologische Relevanz der Assoziation wurde im Hinblick auf den Einfluss auf die Aggregationsfähigkeit von VE-Cadherin, die Integrität der Zell-Zellkontakte sowie die Zellproliferation untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien/Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden im Reinheitsgrad p.A. bezogen.

2-Propanol (J.T. Baker, Deventer, Niederlande, #8067)

3-Aminotriazol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #A-8056)

30 % Acrylamid/Bisacrylamidlösung (Rotiphoresegel 30, Roth, Karlsruhe, #3029.1)

α -MEM (Gibco, Karlsruhe, #11900-073)

α_2 -Makroglobulin (Roche Diagnostic, Basel, Schweiz, #602442)

β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #M-6250)

L-Adenin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #A-9126)

Agarose (Biorad, München, #162-0134)

Ampicillin (Roche Diagnostic, Basel, Schweiz, #835242)

Aprotinin (Roche Diagnostic, Basel, Schweiz, #981532)

APS (Bio-Rad, München, #161-0700)

L-Arginin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #A-5131)

Bacto-Agar (Becton-Dickinson, Heidelberg, #214030)

Bacto-Pepton (Difco, Becton-Dickinson, Heidelberg, #0123-17)

Benzamidin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #B-6506)

Borsäure (Roth, Karlsruhe, #6943)

BPB (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #B-7021)

BSA (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #A-7906)

CaCl₂ (Merck, Darmstadt, #1.02382.1000)

Cell-Fix-Konzentrat (Becton-Dickinson, Heidelberg, #340181)

CHCl₃ (Roth, Karlsruhe, #6340.1)

„Complete“ protease inhibitor (Amersham Bioscience, Freiburg)

„Complete“ protease inhibitor, EDTA free (Amersham Bioscience, Freiburg)

Coomassie (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #B-0149)

Dextrose (Merck, Darmstadt, #1.08337)

Dimethylformamid (Sigma-Aldrich, #D-4254)

DMEM (Gibco, Karlsruhe, #52100-039)

DMSO (Roth, Karlsruhe, #4720.1)

dNTP Mix (Stratagene, Amsterdam, Niederlande, #200415)
DTT (Roche Diagnostic, Basel, Schweiz, #197777)
Earle's MEM (PAA, Cölbe, #E15-825)
EDTA (Roth, Karlsruhe, #8043.2)
Essigsäure (Roth, Karlsruhe, #3738.2)
Ethanol (J.T.Baker, Deventer, Niederlande, #8006)
Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Deisenhofen #E-1510)
FCS (PAN Biotec, Aidenbach, #P30-1503)
FITC-Dextran, 42kD (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #FD-40S)
Gelatine (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #G-1393)
L-Glutamin (Gibco, Karlsruhe, #25030-024)
Glutaraldehyd, 25%-Lösung (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #G5882)
Glutathion (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, # G-6013)
Glutathion-Sepharose (Pharmacia, Freiburg, #52-2303-00-01)
Glutathion-Sepharose-Beads 4B (Pharmacia, Freiburg, #17-0756-01)
Glycerol (Merck, Darmstadt, #1.04092.1000)
Glycin (J.T.Baker, Deventer, Niederlande, #4059-06)
HANKs Salts w/o NaHCO₃ (Biochrom, Berlin, #L201-01)
Harnstoff (J.T.Baker, Deventer, Niederlande, #0345)
HBSS (Biochrom, Berlin, #L.201.01)
HCl 37% (Roth, Karlsruhe, #4625.2))
HCl 1M Lösung (Bernd Kraft GmbH, Duisburg, #01041.3)
Heparin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #H-3149)
HEPES (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #H-9136)
L-Histidin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #H-8125)
IPTG (Roth, Karlsruhe, #2316)
L-Isoleucin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #I-2752)
Isopropanol (J.T.Baker, Deventer, Niederlande, #8067)
KCl (Merck, Darmstadt, #1.04936.1000)
KHCO₃ (J.T.Baker, Deventer, Niederlande, #2940-01)
L-Leucin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #H-8000)
Leupeptin (Roche Diagnostic, Basel, Schweiz, #1-017-128)
LiAc (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #L-6883)
L-Lysin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #L-5751)

M199 Medium (Gibco, Karlsruhe, #31150-022)
Magermilchpulver (Milchwerke Everswinkel)
MEM Non-Essential Amino Acid Solution (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #M-7145)
Methanol (J.T. Baker, Deventer, Niederlande, #8045)
L-Methionin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #M-9625)
MgCl₂ (J.T. Baker, Deventer, Niederlande, #0162)
MgSO₄ (Merck, Darmstadt, #5886.0500)
Na₂HPO₄ (Merck, Darmstadt, #1.06586.0500)
NaH₂PO₄ (Merck, Darmstadt, #M.06346)
NaCl (J.T. Baker, Deventer, Niederlande, #0278)
NaH₂PO₄ (Merck, Darmstadt, #1.06346.1000)
NaHCO₃ (Biochrom, Berlin, #L-1703)
NaOH (J.T. Baker, Deventer, Niederlande, #0288)
NaOH 1M Lösung (Bernd Kraft GmbH, Duisburg, #01030.3)
Na-Orthovanadat (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #S6508)
Natriumacetat (J.T. Baker, Deventer, Niederlande, #0256)
NH₄Cl (Merck, Darmstadt, #A168345)
PBS (Biochrom, Berlin, #L-182-10)
PEG (PEG 3350, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #P-3640)
Penicillin/Streptomycin (Gibco, Karlsruhe, #15140-114)
Phenol/Chloroform (Roth, Karlsruhe, #A156.2)
L-Phenylalanin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #P-2126)
PMSF (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #P-7626)
Ponceau S (Serva, Heidelberg, #33427)
Protein-A-Sepharose (Amersham Biosciences, Freiburg, #17-0780-01)
Protein-G-Sepharose (Amersham Biosciences, Freiburg, #17-0618-01)
L-Prolin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #P-0380)
rATP (Pharmacia, Freiburg, #27-2056-01)
Saccharose (Merck, Darmstadt, #7654.1000)
Salm Sperm DNA, Type III (Sigma-Aldrich, #D1626)
SDS (Calbiochem, La Jolla, CA, USA, #428023)
TEMED (Biorad, München, #1610801)
L-Threonin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #T-8625)
TRIS (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #T-1503)

Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #T-8787)
 TRIzol[®] Reagent (Gibco, Karlsruhe, #15596)
 Trypsin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #T4674)
 Trypsin/EDTA (Biochrom, Berlin, #L-2143)
 Trypsin-Inhibitor (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #T9003)
 Tryptonpepton (Becton-Dickinson, Heidelberg, #0230-15-5)
 L-Tryptophan (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #T-0254)
 Tween 20 (Merck, Darmstadt, #8.22184.0500)
 L-Tyrosin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #T-3754)
 L-Uracil (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #U-0750)
 L-Valin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #V-0500)
 VEGF (Pedro Tech Inc., USA, #450-32)
 X-Gal (Calbiochem, Bad Soden, #03-36-0001)
 Xylen Cyanol FF (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #X-4126)
 „Yeast“ Extrakt (Becton-Dickinson, Heidelberg, #212750)
 „Yeast N₂ Base“ (Difco, Becton-Dickinson, Heidelberg, #0919-15-3)

3.1.2 Verwendete Kits und spezielle Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
<i>ABI PRISM[®] BigDyeTM v1.0</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>ABI PRISM[®] BigDyeTM v2.0</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>ABI Loading Buffer</i>	Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA
<i>BCA Protein Assay Kit</i>	Pierce, Rockford, IL, USA
<i>DAKO Fluorescence Mounting Medium</i>	DAKO Corporation, Hamburg
<i>DyeExTM Spin Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>ECLTM Western blotting detection reagents</i>	Amersham Bioscience, Freiburg
<i>GenejammerTM Transfection Reagent</i>	Stratagene, La Jolla, USA
<i>GeneSwitchTM System</i>	Invitrogen, Groningen, NL
<i>High Pure Plasmid Isolation Kit</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Perfectprep[®] Gel Cleanup Kit</i>	Eppendorf, Hamburg
<i>QIAquick[®] Gel Extraction Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>QIAfilterTM Plasmid Maxi Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>Quick LigationTM Kit</i>	New England Biolabs, Beverly, USA

<i>RNAGuard</i>	Pharmacia, Biotech, Freiburg
<i>TNT[®]Quick</i>	Promega, Mannheim
<i>TOPO[™] TA Cloning[®] Kit</i>	Invitrogen, Groningen, NL
<i>TRIzol[®] Reagent</i>	Gibco BRL, Karlsruhe

3.1.3 Verwendete Isotope

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
[Methyl- ³ H]-thymidine	Amersham Biosciences, Freiburg
Redivue [™] L-[³⁵ S]-methionine	Amersham Biosciences, Freiburg
Redivue [™] [γ - ³² P]-ATP	Amersham Biosciences, Freiburg

3.1.4 Verwendete Medien

In der Zellkultur und zur Kultivierung von Bakterien wurden folgende Standardmedien verwendet:

<u>α-MEM Vollmedium:</u>	α -MEM w/o NaHCO ₃ , in H ₂ O 524mM NaHCO ₃ 10% FCS, Hitze inaktiviert: 56°C, 1h 2mM L-Glutamin 100U/ml Penicillin/Streptomycin
<u>DMEM Vollmedium:</u>	DMEM w/o NaHCO ₃ , in H ₂ O 880mM NaHCO ₃ 10% FCS, Hitze inaktiviert: 56°C, 1h 2mM L-Glutamin 100U/ml Penicillin/Streptomycin
<u>Selektionsmedium:</u>	α -MEM Vollmedium + Selektionsantibiotika (s. 3.2.5.1)
<u>PBS (Zellkultur):</u>	PBS, in H ₂ O

M199 Vollmedium: M199, in H₂O
 20% FCS, Hitze inaktiviert: 56°C, 1h
 2mM L-Glutamin
 100U/ml Penicillin/Streptomycin
 100µg/ml Heparin
 80µg/ml ECGF (Herstellung in unserem Labor)

Einfríermedium: 50% Zellkultur Vollmedium
 40% FCS
 10% DMSO

LB-Medium: 10g/l Trypton-Pepton, in H₂O
 5g/l „Yeast“-Extrakt
 10g/l NaCl

LB-Agar: LB-Medium
 15g/l Bacto-Agar

Folgende Medien wurden mehrfach in unterschiedlichen Experimenten eingesetzt. Spezielle Versuchsmedien sind jeweils in den einzelnen Versuchsbeschreibungen aufgeföhrt.

10x PBS, pH7,4: 1,37M NaCl, in H₂O
 101mM Na₂HPO₄
 17,6mM KH₂PO₄
 26,8mM KCl

10x TBE-Puffer, pH8,45: 892 mM TRIS-HCl, in H₂O
 873mM Borsäure
 20mM EDTA

10x TE-Puffer, pH8,0: 100mM TRIS-HCl, in H₂O
 10mM EDTA

10x TBS, pH7,4: 248mM TRIS-HCl, in H₂O
 1,37M NaCl
 26,8mM KCl

<u>TBST, pH7,4:</u>	24,8mM TRIS-HCl, in H ₂ O
	137mM NaCl
	2,68mM KCl
	0,1% Tween 20

3.1.5 Spezielle Geräte

Mikroskope	Hersteller
<i>Axiovert 25</i>	Zeiss, Göttingen
<i>Axiovert 200M (CLSM)</i>	Zeiss, Göttingen
<i>Axioskop 2 (Fluoreszenzmikroskop)</i>	Zeiss, Göttingen
+ Digitalkamera: <i>Model 2.1.1</i>	Diagnostic Instruments, Inc., USA
<i>Telaval 31</i>	Zeiss Göttingen
<i>TSC SP (CLSM)</i>	Leica, Mannheim
Zentrifugen	
<i>Centrifuge 5417R</i>	Eppendorf, Hamburg
<i>Megafuge 1.0</i>	Heraeus Instruments, Hanau
<i>OptimaTM TL</i>	Beckmann Coulter, München
<i>Sorval RC5C plus</i>	Sorval DuPont, Newtown, USA
<i>Varifuge 3.0R</i>	Heraeus Instruments, Hanau
Proteinbiochemie/Molekularbiologie	
<i>ABI[®] Prism 377 Sequenator</i>	Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA
<i>Gel Dryer, Model 583</i>	Bio-Rad, München
<i>Gene Pulser II & Pulse Controller II</i>	Bio-Rad, München
<i>Mini-Protean II Gelelektrophoresesystem</i>	Bio-Rad, München
<i>PCR-Cycler T-Gradient</i>	Biometra, Göttingen
<i>PCR-Cycler UNO II</i>	Biometra, Göttingen
Netzadapter: <i>Power PAC1000</i>	Bio-Rad, München
Netzadapter: <i>Phero-Stab 0652</i>	Biotec-Fischer, Reiskirchen
„Semi dry blot“-Apparatur <i>TransBlot SD</i>	Bio-Rad, München
„Wet blot“-Apparatur	Bio-Rad, München
Sonstige	
<i>Bio-Imaging-Analyzer Fujix BAS1000</i>	Fuji Photo Film CO., LTD, Japan
<i>CASYTM TT SC1</i>	Schärfe-System GmbH, Reutlingen
<i>Cell Harvester</i>	Inotech AG, Dottikon, Schweiz

<i>FACSCalibur</i>	Becton Dickinson, SanJose, USA
Entwickler <i>Curix 60</i>	Agfa, Köln
<i>Fluoromax-2</i>	Jobin-Yvon, Grasbrunn
<i>French Pressure Cell Press</i>	SLM Instruments, Rochester, USA
<i>Fuji Imaging Plate Type BASIII</i> s	Fuji Photo Film CO., LTD, Japan
Inkubator <i>BB6060</i>	Heraeus Instruments, Hanau
Inkubator <i>Modell 600</i>	Memmert, Schwabach
<i>Innova 4300</i>	Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
<i>Lambda Fluoro 320</i>	Bio-Tek Instruments, Winooski, USA
<i>LS6500 Scintillation Counter</i>	Beckmann Coulter, München
<i>Millipore Q-Plus PF</i>	Millipore, Bedford, MA, USA
<i>SpeedVac AES 1000</i>	Savant Instruments, Farmingdale, USA
<i>UV-Spektrometer Gene Quant II</i>	Pharmacia Biotech, Freiburg
<i>VIS-Spektrometer UV-1202</i>	Shimadzu, Duisburg

3.1.6 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
„Acid washed glass beads“, 425-600µm	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>Cell Lifter</i>	Corning, New York, USA
<i>Centricon YM-10</i> , MWCO 10.000	Millipore, Bedford, USA
<i>Centricon YM-30</i> , MWCO 30.000	Millipore, Bedford, USA
<i>Lab-TakTM II Chamber SlidesTM</i>	Nalge Nunc, Wiesbaden
<i>ECL Hyperfilm</i>	Amersham Biosciences, Freiburg
<i>Econo-Säulen</i>	Bio-Rad, München
Einwegpipetten 1-25 ml	Falcon, Heidelberg
Elektroporationsküvette 0,1cm	Bio-Rad, München
Elektroporationsküvette 0,2cm	Bio-Rad, München
Elektroporationsküvette 0,4cm	Bio-Rad, München
FACS-Röhrchen 0,6ml	Greiner, Solingen
„Glass fibre filter“, <i>Typ G7</i>	Inotech AG, Dottikon, Schweiz
Mikroreaktionsgefäße 0,2-2,0ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße Polystyrol 5-15ml	Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäße Polypropylen 15-50ml	Falcon, Heidelberg
<i>Slide-A-Lyzer 10K</i>	Pierce, Rockford, IL, USA

<i>Transwell</i> -Filter	Corning-Costar, Bodenheim
Universalgefäß, 30ml	Sterilin, Staffordshire, UK
0,4mm <i>Whatman</i> -Papier <i>GB002</i>	Schleicher & Schuell, Dassel
1,2mm <i>Whatman</i> -Papier <i>GB005</i>	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellulosenitrat-Membranen <i>Optitran BA-S85</i>	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturplatten 6mm, 96-, „well“, Rundboden	Greiner, Solingen
Zellkulturplatten 6mm, 96-, „well“	Falcon, Heidelberg
Zellkulturplatten 16mm, 24er-, „well“	Falcon, Heidelberg
Zellkulturplatten 35mm, 6er-, „well“	Falcon, Heidelberg
Zellkultur-Schale 90 mm	Falcon, Heidelberg
Zellkultur-Schale 150mm	Nalge Nunc, Wiesbaden

3.1.7 Allgemeine Software und Internetadressen

Neben der speziellen Software für die verwendeten Geräte wurde folgende Software und folgende Internetadressen für diese Arbeit eingesetzt:

Adobe Photoshop 5	Adope Systems Inc., San Jose, USA
DNASTAR Lasergene Software	DNASTAR Inc., Madison, WI, USA
Msoffice	Microsoft Deutschland, Unterschleissheim
SigmaPlot 2001	SPSS GmbH Software, München
www.biophys.uni-duesseldorf.de/BioNet/Pedro/research_tools.html	
www.GATC.de	GATC Biotech AG
www.invitrogen.com	Invitrogen, Groningen, NL
www.isrec.isb-sib.ch	Swiss Institute For Experimental Cancer Research
www.ncbi.nlm.nih.gov	National Center For Biotechnology Information
www.statagene.com	Stratagene Europe, Amsterdam, NL

3.1.8 Antikörper

Tabelle 1: Polyklonale primäre Antikörper

Antigen	Bezeichnung	Ursprung	Bezug/Referenz
Maus VE-Cadherin	C5	Kaninchen	unser Labor
Maus PECAM-1	M-20	Ziege	Santa Cruz Biotechnologie Inc., Santa Cruz, USA

Tabelle 2: Monoklonale primäre Antikörper

Antigen	Klon	Isotyp	Konjugat	Bezug/Referenz
Myc-tag		Maus IgG ₁		BD Bioscience, Heidelberg
β-Catenin	14	Maus IgG ₁		BD Bioscience, Heidelberg
CSK	52	Maus IgG ₁		BD Bioscience, Heidelberg
Phosphotyrosin	RC20H	rekombinant	PO	BD Bioscience, Heidelberg
Maus VEGF-R2/Flk-1	12α1	Ratte IgG _{2A}		BD Bioscience, Heidelberg
Maus VE-Cadherin	VE1.1	Ratte IgG _{2A}		unser Labor
Maus VE-Cadherin	11D4.1	Ratte IgG _{2A}		(Gotsch et al., 1997)
Maus VE-Cadherin	57.1	Ratte IgG _{2A}		unser Labor

Tabelle 3: Sekundäre Antikörper

Spezifität	Konjugat	Bezug/Referenz
Esel α Maus IgG	HRP	Jackson ImmunoResearch, Dianova, Hamburg
Esel α Ratte IgG	HRP	Jackson ImmunoResearch, Dianova, Hamburg
F(ab') ₂ Fragment Ziege α Ratte IgG	PE	Jackson ImmunoResearch, Dianova, Hamburg
F(ab') ₂ Fragment Esel α Ratte IgG	Cy2 TM	Jackson ImmunoResearch, Dianova, Hamburg
F(ab') ₂ Fragment Esel α Maus IgG	Cy3 TM	Jackson ImmunoResearch, Dianova, Hamburg
F(ab') ₂ Fragment Esel α Maus IgG	TexRed TM	Jackson ImmunoResearch, Dianova, Hamburg
Polyklonal Ziege α Maus κ-IgG	HRP	AMS Biotechnology GmbH, Wiesbaden

3.1.9 Enzyme

Restriktionsendonukleasen wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, von den Firmen Gibco BRL (Karlsruhe) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

Bezeichnung	Hersteller
<i>AMV RT Reverse Transcriptase</i>	Roche Diagnostic, Basel, Schweiz
<i>DNase I</i>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>DNA Polymerase I Large Fragment</i>	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
<i>Human c-Src Kinase (p60^{c-src})</i>	Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA
<i>Pfu-Polymerase</i>	Stratagene, Amsterdam, The Netherlands
<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>	Roche Diagnostic, Basel, Schweiz
<i>Super-Taq Polymerase</i>	HT Biotechnology LTD., Cambridge, GB
<i>T4 DNA Ligase</i>	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
<i>T4 DNA Ligase</i>	Gibco BRL, Karlsruhe
<i>T4 Polynucleotide Kinase</i>	Roche Diagnostic, Basel, Schweiz
<i>Taq-Polymerase</i>	Amersham Bioscience, Freiburg

3.1.10 Oligonukleotide

Tabelle 4: CSK (Maus)-spezifische Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
1.CSKNot1.S	GCTGATGCGGCCGCATGTCGGCTATACAGGCC
2.CSKSal1.AS	GCTGATGCTGACTCACAGGTGCAGCTCATG
3.CSKEcoR1.S	TTACCCAAGAATTCCCCT
5.CSK.S	ATGCGAGCAAGCTGAGCA
6.CSK.S	GTACATGGCCAAGGGGAG
7.CSK.AS	AATTCTTGGGTAAGGCAC
8.CSK.AS	TCCACAATCACACCCAGC
9.CSK.AS	CCTCACAGCTCACACACA
10.CSKSal1.AS	AGCTGACCAGGTGCAGCTCATGGGT
11.CSKNot1.S	GCGGCCGCCATGTCGGCTATACAGGCC
12.CSKSal1.AS	TGCTGACCAGGTGCAGCTCATGGGT
14.CSKBamHI.AS	GGTGGATCCTCACAGGTGCAGCTCATG
15.CSKR107K.S	GGCCTGTTCTCGTGAAGGAAAGCACCAACTAC
16.CSKR107K.AS	GTAGTTGGTGCTTTCCTTCACGAGGAACAGGCC
17.CSKK222R.S	GCAACAAAGTTGCAGTCAGGTGCATCAAGAATGACGC
18.CSKK222R.AS	GCGTCATTCTTGATGCACCTGACTGCAACTTTGTTGC

Tabelle 5: VE-Cadherin (Maus)-/N-Cadherin (Maus)-spezifische Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
VECP7.AS	CGCAGAGTCCATCGTCGACTCC
VECP8.AS	CTCAACGACTGGGGAGTCGACTTC
VECP9Not.S	GCTGATGCGGCCGCGGAGGCGGATCCGGAAG
VECP10Not.S	GCATGCGCGGCCGCTTAGTGCGCTGGAGATTCAC
VECP11Not1.AS	GCTGATGCGGCCGCCTAGATGATGAGTTCCTCC
VECP12EcoR1.S	CGGAATTCGGGAGGCGGATCCGGAAG
VECP13TyrMut.s	GGCCGGCAGTGTTTCACGCAGGTGCAGAAGC
VECP14TyrMut.as	GCTTCTGCACCTGCGTGAACACTGCCGGCC
Ncad1Not1.AS	GCTGATGCGGCCGCTCAGTCGTCACCACCGCC
Ncad2EcoR1.S	CGGAATTCAAACGGCGGGATAAAGAG

Tabelle 6: RT-PCR-spezifische Oligonukleotide

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz (5'-3')
oligo dT	Herstellung von cDNA aus bEnd.3-Lysaten	pd(t) ₁₂₋₁₈
HPRT.S	Kontrolle der RT-PCR	GCTGGTGAAAAGGACCTCTC
HPRT.AS		CACAGGACTAGAACACCTGC

Tabelle 7: Vektorenspezifische Oligonukleotide

Bezeichnung	verwendet im Vektor	Sequenz (5'-3')
VP16.S	pVP16	GGTACCGAGCTCAATTGCGG
VP162.S		GATGCCCTTGGAATTGACG
M13 universal		GTAAAACGACGGCCAGT
ADHTER1.AS	pBMT116	CATAAGAAATTCGCCCGG
LexA1.S		CTTCACCATTGAAGGGCTG
LexA4.S		GTCAGCGGGATGTCGATGA
T7 pro	pKE081myc-#2/pGene/V5-His / pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO/pcDNA3	TAATACGACTCACTATAGGG
BGH Rev		TAGAAGGCACAGTCGAGG
PHEO081MGC#2.AS	pKE081myc-#2	TAGTCGACGCTGGGAATTCG
1.Myc-BamH1S		GGATCCGCCATGGAGCAGAAG
pGEX3'.AS		CCGGGAGCTGCATGTGTC
pGEX5'.S	pGEX-4T-1	GGGCTGGCAAGCCACGTT

3.1.11 Vektoren

Tabelle 8: Verwendete Vektoren

Plasmid	Beschreibung	Referenz/Bezug
pcDNA3	Expressionsvektor für eukaryotische Zellen	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pKE081myc-#2	Expressionsvektor für eukaryotische Zellen mit N-terminalem Myc-tag	(Ebnet et al., 2000)
pGene/V5-His	Expressionsvektor für eukaryotische Zellen, Bestandteil des <i>GeneSwitch-Systems</i> TM	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pSwitch	Bestandteil des <i>GeneSwitch-Systems</i> TM	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO TM	Expressionsvektor für eukaryotische Zellen mit C-terminalen GFP	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pEF6/myc-His	Expressionsvektor für eukaryotische Zellen	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pGEX-4T-1	Expressionsvektor für GST Fusionsproteine	Amersham Bioscience, Freiburg
pBTM116/TPR-Met	„bait“-Vektor für „yeast two hybrid“	(Fujita et al., 2002)
pVP16	„prey“-Vektor für „yeast two hybrid“	(Hollenberg et al., 1995)

3.1.12 Rekombinante Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bezeichnungen der aus den Expressionsvektoren translatierten Proteine sind in den Überschriften in Klammern angegeben. Alle mit PCR-Technik amplifizierten cDNA-„inserts“ wurden zur Überprüfung vollständig DNA-sequenziert, während sich die Kontrollen bei Subklonierungen auf die Restriktionsschnittstellen beschränkten.

Murines VE-Cadherin in pcDNA3 (⇒ VE-Cadherin_{wt})

Die cDNA von Maus VE-Cadherin (Breier et al., 1996) wurde von Dr. Eric Borges in den Expressionsvektor pcDNA3 subkloniert.

Murines VE-Cadherin_{AS621-764} in pBTM116/TPR-Met (⇒ „bait“-VE-Cadherin)

Die Aminosäuren 621 bis 764 der zytoplasmatischen Domäne von VE-Cadherin wurden als „bait“-Protein für das „yeast two hybrid“-System in den Expressionsvektor pBTM116/TPR-Met kloniert. Die entsprechende Sequenz wurde durch die Verwendung der Primer VECP9Not.S/VECP8.AS aus der Ursprungs-cDNA VE-Cadherin in pcDNA3 (hergestellt von Dr. Eric Borges) über die PCR amplifiziert. Die Klonierung des Fragments in den Expressionsvektor erfolgte N-terminal über eine *Not1*- und C-terminal über eine „blunt end“-Schnittstelle. Dafür wurde das Plasmid zunächst *Sal1* verdaut und der Schnittstellenüberhang mit dem *DNA Polymerase I Large Fragment (Klenow)* aufgefüllt. Sowohl das VE-Cadherin-Fragment als auch der pBTM116 wurden *Not1* geschnitten. Nach der Phosphorylierung des Fragments mit Hilfe der *T4 Polynucleotide Kinase* erfolgte die Ligation.

Murines VE-Cadherin_{Y685F} in pcDNA3 (⇒ VE-Cadherin_{Y685F})

Das Konstrukt VE-Cadherin_{Y685F} in pcDNA3 wurde von Stefan Koch im Rahmen seiner Diplomarbeit unter Verwendung des *QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit* hergestellt.

Murines VE-Cadherin in pGEX-4T-1 (⇒ GST-VE-Cadherin_{wt})

Zur Herstellung von GST-VE-Cadherin Fusionsprotein wurden die Aminosäuren 621 bis 764 von VE-Cadherin in den prokaryotischen Expressionsvektor pGEX-4T-1 kloniert. Mit Hilfe der Oligonukleotide VECP12EcoR1.S/VECP8.S wurde das entsprechende VE-Cadherin-Fragment aus der Ursprungs-cDNA VE-Cadherin in pcDNA3 (Dr. Eric Borges) amplifiziert und über die *EcoR1*-/*Sal1*-Restriktionsschnittstellen in den pGEX-4T-1 Vektor kloniert.

Murines VE-Cadherin_{Y685F} in pGEX-4T-1 (⇒ GST-VE-Cadherin_{Y685F})

Die Klonierung erfolgte analog zur Herstellung des Konstrukts VE-Cadherin in pGEX-4T-1. Als Ausgangs-cDNA wurde jedoch die cDNA VE-Cadherin_{Y685F} in pcDNA3 (hergestellt von Stefan Koch) verwendet.

Murines N-Cadherin in pGEX-4T-1 (\Rightarrow GST-N-Cadherin)

Zur Herstellung von GST-N-Cadherin-Fusionsprotein wurde die zytoplasmatische Domäne des murinen N-Cadherin (Aminosäuren 747-906) aus dem Ausgangsplasmid N-Cadherin in Bluescript KSII unter Verwendung der Oligonukleotide Ncad2EcoR1.S/Ncad1Not1.AS amplifiziert. Die Klonierung in den Expressionsvektor pGEX-4T-1 erfolgte über die *EcoR1*-/*Not1*-Restriktionsschnittstellen.

Murines CSK_{AS57-204} in pKE081myc-#2 (\Rightarrow CSK_{aa57-204})

Die im „yeast two hybrid“ gefundene Sequenz der Aminosäuren 57 bis 204 von Maus-CSK wurde aus dem „prey“-Vektor pVP16 in den eukaryotischen Expressionsvektor pKE081myc-#2 (Ebnet et al., 2000) subkloniert. Das CSK-Fragment im Donorvektor und der Zielvektor wurden mit *Not1* geschnitten, die Überhänge der Schnittstellen mit *Klenow* aufgefüllt und der Expressionsvektor mit der *Shrimp Alkaline Phosphatase* dephosphoryliert. Anschließend erfolgte die „blunt“-Ligation des Fragments in den Zielvektor.

Murines CSK_{wt} in pKE081myc-#2 (\Rightarrow CSK_{wt})

Zur Klonierung des murinen CSK_{wt} wurde zunächst die „first strand“-cDNA aus bEND.3 Lysaten mit Hilfe der RT-PCR hergestellt. Aus dieser cDNA wurde CSK_{wt} mit den Oligonukleotiden 1.CSKNot1.S/2.CSKSal1.AS amplifiziert und über die *Not1*-/*Sal1*-Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor pKE081myc-#2 kloniert. Dieses Konstrukt umfasst den „open reading frame“ von murinem CSK und ist N-terminal mit einem Myc-Tag versehen.

Murines CSK_{R107K} in pKE081myc-#2 (\Rightarrow CSK_{R107k})

CSK_{R107K} in pKE081myc-#2 wurde von Henrik Vorschmitt im Rahmen eines S-Kurses mit Hilfe des *QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kits* hergestellt. Als Ausgangs-cDNA wurde das murine CSK_{wt} in pKE081myc-#2 verwendet und die Amplifizierung mit den Oligonukleotiden 15.CSKR107K.S/16.CSKR107K.AS durchgeführt.

Murines CSK_{K222R} in pKE081myc-#2 (\Rightarrow CSK_{K222R})

Dieses Konstrukt wurde von Henrik Vorschmitt analog zum CSK_{R107K} in pKE081myc-#2 hergestellt. Zur Amplifizierung wurden die Oligonukleotide 17.CSKR222K.S/-18.CSKR222K.AS verwendet.

Murines CSK_{wt} in pcDNA3.1/CT-GFP-TOPOTM (\Rightarrow GFP-CSK_{wt})

Zur Herstellung dieser cDNA wurde Myc-CSK_{wt} aus der cDNA CSK_{wt} in pKE081myc-#2 mit den Oligonukleotiden 1.Myc-BamH1.S/12.CSKSal1.AS amplifiziert und über die *Super-Taq-Polymerase* mit einem Adenin-Überhang versehen. Anschließend wurde das Fragment direkt mit dem *TOPOTM TA Cloning Kit*-Vektor pcDNA3.1/CT-GFP-TOPOTM ligiert.

Murines CSK_{wt} in pGENE/V5-His

Der eukaryotische Expressionsvektor pGENE/V5-His ist Bestandteil des *GeneSwitchTM-Systems*, das eine Mifepristone abhängige Expression des gewünschten Proteins in eukaryotischen Zellen gewährleistet. Zur Klonierung der Myc-CSK_{wt} cDNA in den Zielvektor wurde diese mit den Oligonukleotiden 1.Myc-BamH1.S/14.CSKBamH1.AS mit Hilfe der PCR aus der cDNA CSK_{wt} in pcDNA3.1/CT-GFP-TOPOTM amplifiziert und über die *BamH1*-Restriktionsschnittstelle in den Zielvektor kloniert.

Murines β -Catenin in pcDNA3 (\Rightarrow β -Catenin)

Murines β -Catenin cDNA wurde von Dr. Jürgen Behrens (MDC, Berlin) kloniert und freundlicherweise diesem Labor zur Verfügung gestellt. PD Dr. Klaus Ebnet subklonierte die cDNA in den Expressionsvektor pcDNA3.

Murines VEGF-R2 (Flk-1) in pEF6 (\Rightarrow Flk-1)

Murines Flk-1 wurde unserem Labor von Dr. Urban Deutsch (MPI, Münster) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

cDNA-Bibliothek in pVP16

Die im „yeast two hybrid“ eingesetzte cDNA-Bibliothek wurde aus 9,5-10,5 Tage alten Mausembryonen hergestellt (Hollenberg et al., 1995). Die cDNA wurde diesem Labor freundlicherweise von Dr. Jürgen Behrens (MDC, Berlin) zur Verfügung gestellt.

3.1.13 Zell-Linien

Tabelle 9: Verwendete Zell-Linien

Linie	Herkunft	Referenz/Bezug
bEnd.3	Mikrovaskuläres Gehirndothel der Maus	Dr. Werner Risau, MPI Bad Nauheim
COS-7	SV 40 transfizierte Affen-Nieren-Epithelzellen	(Gluzman, 1981)
CHO (dhfr ⁻)	Ovarzellen des chinesischen Hamsters	(Stanley et al., 1975)
HUVEC	primäre Endothelzellen aus menschlichen Nabelschnüren	unser Labor

3.1.14 Bakterienstämme

Tabelle 10: Verwendete *E.coli*-Bakterienstämme

Stamm	Genotype	Referenz
<i>XLI-blue</i>	supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lacF ⁺ , [proAB ⁺ , laqI ^q , lacZΔM15 Tn10 (Tc ^r)]	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
<i>BL21</i>	BF ⁻ , ompT, hsdS (r ⁻ _B , m _B), gal, dcm	Amersham Biosciences, Freiburg
<i>HB101</i>	leuB6, proA2, recA13, thi-1, ara-14, lacY1, galK2, xyl-5, mtl-1, rspL20, supE44, hsdS20	Amersham Biosciences, Freiburg
<i>TOP 10 OneShotTM</i>	F ⁻ , mrcA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), ϕ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, deoR, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, (Str ^R), endA1, nupG	Invitrogen, Groningen, Niederlande
<i>DH5α</i>	F ⁻ ϕ80dlacZΔM15, endA1, hsdR17 (rk ⁻ , mk ⁺), supE44, thi-I d ⁻ , gyrA96Δ(lacZYA-argF), U196	Promega, Mannheim

3.2 Methoden

3.2.1 Aufzucht und Lagerung von Bakterienkulturen

Flüssigkulturen von Bakterien wurden in LB-Medium im Schüttelinkubator bei 200rpm und 37°C hergestellt. Die Aufzucht in Petrischalen erfolgte auf LB-Agar bei 37°C. Transformierte Bakterien wurden durch Zugabe von 100µg/ml Ampicillin selektioniert. Für die langfristige Lagerung wurden die Bakterien in Flüssigkultur angezogen und bei -80°C in 25% Glycerol gelagert.

Spezielle Materialien:

Ampicillin, Stock: 100mg/ml; Glycerol; LB-Agar; LB-Medium

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Reinigung der Nukleinsäuren erfolgte je nach Verwendungszweck und gewünschter DNA-Menge mit unterschiedlichen Präparationskits. Für die Reinigung geringer DNA-Mengen, z.B. für Kontrollrestriktionen oder Sequenzierungen, wurde das *High Pure Plasmid Isolation Kit* eingesetzt, während größere DNA-Mengen mit dem *Qiafilter Plasmid Maxi Kit* gereinigt wurden. Die Durchführung erfolgte jeweils nach den Angaben der Hersteller. Zur langfristigen Lagerung wurde die DNA in TE-Puffer aufgenommen und bei – 20°C eingefroren.

Spezielle Materialien:

High Pure Plasmid Isolation Kit; *QIAfilter Plasmid Maxi Kit*; TE-Puffer

3.2.2.2 Präzipitation von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden aus Lösungen durch die Zugabe von 1/10 Volumen 3M Natriumazetat (pH 5,2) und dem 2,5fachen Volumen an Ethanol oder dem 0,8fachen Volumen Isopropanol gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 20.400 x g, 4°C, für 30min abzentrifugiert und in 70% Ethanol gewaschen. Zur Entfernung des Alkohols wurde die gefällte DNA getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

Spezielle Materialien:

3M Natriumazetat; Ethanol; 70% Ethanol in H₂O; Isopropanol; TE-Puffer

3.2.2.3 Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren

Durch molekularbiologische Methoden, wie z.B. der PCR oder dem Restriktionsverdau, entstehen Nukleinsäuren verschiedener Größen, die zur weiteren experimentellen Verwendung oder Auswertung getrennt werden müssen. Diese Trennung erfolgte mit Hilfe der Elektrophorese in Agarosegelen. Zur Visualisierung der DNA in den Agarosegelen wurde Ethidiumbromid verwendet, das in die DNA interkaliert und unter UV-Licht ($\lambda = 366\text{nm}$) detektiert werden kann. Je nach Fragmentgröße wurden Gele mit einem Agarosegehalt

zwischen 0,8 und 1,2% (w/v) verwendet. Die entsprechende Menge an Agarose wurde in TBE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst, nach kurzem Abkühlen mit 0,2µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in die Gelapparaturen gegossen. Nach dem Aushärten der Gele wurden diese mit TBE-Puffer überschichtet.

Die DNA-Proben wurden mit DNA-Probenpuffer versetzt und zusammen mit einem DNA-Standard auf die Gele aufgetragen. Die Trennung erfolgte, je nach Größe der Gele, bei 50-150V. Die getrennten Nukleinsäuren wurden mit einem Tanilluminator durch UV-Licht ($\lambda = 366\text{nm}$) detektiert und mit einer Kamera dokumentiert.

Spezielle Materialien:

Agarose; TBE-Puffer

DNA-Standards: *SMART Ladder* (Eurogentic, Heidelberg)
 1Kb DNA Ladder (Gibco, Karlsruhe)
 100 bp Ladder (Gibco, Karlsruhe)

DNA-Probenpuffer: 30% Glycerin, in H₂O
 0,25% BPB
 0,25% Xylen Cyanol FF

3.2.2.4 Reinigung von Nukleinsäuren

Bei Bedarf wurden die über die Gelelektrophorese getrennten Nukleinsäuren nach der Detektion unter dem *Tanilluminator* aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem *QIAquick[®] Gel Extraction Kit* gereinigt. Das Kit wurde ebenfalls verwendet, um DNA in verschiedene Lösungen zu überführen, ohne dass eine Gelelektrophorese vorangegangen war. Die Reinigung erfolgte nach Anweisung des Herstellers. Die DNA-Fragmente wurden in 30µl H₂O eluiert und nach Bedarf präzipitiert.

Spezielle Materialien:

QIAquick[®] Gel Extraction Kit

3.2.2.5 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Aufgrund der Absorption von UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 260\text{nm}$ durch Nukleinsäuren lässt sich deren Konzentration in Lösungen mit Hilfe von UV-Spektrometern bestimmen. Die quantitativen Analysen wurden in UV-Licht durchlässigen Quarzküvetten durchge-

führt und die gemessenen Extinktionen nach folgender Formel in die Nukleinsäurekonzentrationen umgerechnet:

$$c = OD_{260} \times F \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

mit c = Nukleinsäurekonzentration in [$\mu\text{g/ml}$], OD_{260} = Extinktion bei 260nm, F = Multiplikationsfaktor (50 für doppelsträngige DNA, 40 für RNA, 37 für einzelsträngige DNA, 20 für einzelsträngige Oligonukleotide).

Zur qualitativen Analyse, bzw. zur Detektion von Proteinkontaminationen, wurden zusätzlich die Extinktionen bei $\lambda = 280\text{nm}$ (Absorptionsmaximum von Proteinen) ermittelt. Der Quotient aus der OD_{260} und OD_{280} ist ein Maß für die Proteinverunreinigungen und weist in proteinfreien Nukleinsäurelösungen einen Wert zwischen 1,8-2,0 auf.

Neben der optischen Bestimmung wurden die Konzentrationen von Nukleinsäuren für DNA-Sequenzierungen über eine Gelelektrophorese mit Konzentrationsstandards bestimmt.

3.2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer Nukleinsäuresequenzen wurde die PCR eingesetzt. Während der PCR generiert eine Polymerase aus der Ausgangs-DNA („template“) die gewünschte Sequenz, ausgehend von spezifischen Oligonukleotiden. Deren „annealing“-Temperatur“ wurde wie folgt nach einer vereinfachten Formel berechnet:

$$T(^{\circ}\text{C}) = 4x (nG + nC) + 2x (nA + nT) - 5$$

In dieser Arbeit wurden die *Super-Taq-Polymerase* (aus *Thermus aquaticus*) für Analyse-PCRs und die *Pfu-Polymerase* (aus *Pyrococcus furiosus*) für präparative Amplifikationen verwendet. Im Gegensatz zur *Super-Taq-Polymerase* besitzt die *Pfu-Polymerase* eine geringere Fehlerquote durch eine 3'-5' Exonukleaseaktivität. Die 20 μl PCR-Ansätze setzten sich aus 50ng „template“-cDNA, den Enzympuffern nach Angaben der Hersteller, 800 μM dNTPs, den spezifischen Oligonukleotiden (1 μM), 2mM DTT und 0,01U/ μl *Super-Taq-Polymerase* oder 0,125U/ μl *Pfu-Polymerase* zusammen. Die Standardbedingungen für die PCR sind in Tabelle 11 zusammengefasst:

Tabelle 11: PCR-Standardbedingungen

	Temp. [°C]	<i>Pfu-Polymerase</i>	<i>Super-Taq-Polymerase</i>
1. Initiale Denaturierung:	94°C	3min	3min
2. Denaturierung	94°C	30s	30s
3. „Annealing“	variabel	30s	30s
4. „Elongation“	72°C	90s	2min
5. Abschluss	72°C	10min	7min
6. Lagerung	4°C	∞	∞
Zyklusanzahl der Schritte 2-4		30x	35x

Spezielle Materialien:

Desoxynucleotide Mix; DTT, Stock: 1M; *Pfu-DNA-Polymerase*; *Pfu-DNA-Polymerasepuffer*; *Super-Taq-Polymerase*; *Super-Taq-Polymerasepuffer*; Spezifische Oligonukleotide (s. Tabellen 4-7)

3.2.2.7 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR ist eine Methode zur Amplifizierung spezifischer cDNA aus der vorliegenden mRNA eines Zellsystems. Dafür wird die mRNA der Zellen mit der reversen Transkriptase in die cDNA („first strand“-cDNA) transkribiert und die gewünschte Sequenz in einer darauf folgenden PCR amplifiziert. Die Isolierung von mRNA aus bEND.3-Zellen wurde mit dem *TRIzol[®] Reagent* nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Von der erhaltenen mRNA wurden 5µg in der reversen Transkription eingesetzt. 25µl des RT-Ansatzes in DEPC-Wasser enthielten außerdem den Puffer nach Angaben des Herstellers (50mM TRIS-HCl (pH 8,5 bei 20°C), 30mM KCl, 8mM MgCl₂), 1mM DTT, 4mM dNTPs, 40µM *oligo dT*-Oligonukleotide, 20U RNase-Inhibitoren und 25U *AMV RT Reverse Transcriptase*. Die Synthese der „first strand“-cDNA wurde bei 37°C (1h) durchgeführt und durch Hitzeinaktivierung (95°C, 5min) beendet. Die anschließende Pfu-PCR (s. 3.2.2.6) wurde mit der cDNA-Menge äquivalent zu 50ng der mRNA durchgeführt.

Spezielle Materialien:

AMV RT Reverse Transcriptase; *AMV RT Reverse Transcriptase Puffer*; DEPC-H₂O; DTT, Stock: 1M; *oligo dT*-Oligonukleotide; *RNAguard*; *TRIzol[®] Reagent*

3.2.2.8 Klonierung von Nukleinsäuren in Plasmidvektoren

Die Herstellung von cDNA-Fragmenten („insert“) erfolgte entweder über die PCR-Methoden (s. 3.2.2.6, 3.2.2.7) oder durch die Restriktion bereits klonierter cDNA aus Donorplasmiden. Um die „inserts“ in ein spezielles Zielplasmid integrieren zu können, wur-

den sie zusammen mit den Plasmiden mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und miteinander ligiert. Der Restriktionsverdau mit den jeweiligen Enzymen erfolgte nach Angaben des Herstellers für 1-2h bei 37°C und wurde durch Hitzeinaktivierung (65°C, 20min) beendet. Die verdaute DNA wurde über die Gelelektrophorese (s. 3.2.2.3) getrennt und mit Hilfe von Agarosegelen gereinigt (s. 3.2.2.4).

Spezielle Materialien:

BamH1; BamH1-Puffer; EcoR1; EcoR1-Puffer; Not1; Not1-Puffer; Sal1; Sal1-Puffer

3.2.2.8.1 Klenow-Reaktion

Das *DNA Polymerase I Large Fragment (Klenow)* wurde bei Bedarf zum Auffüllen überhängender Enden der doppelsträngigen DNA nach dem Restriktionsverdau verwendet und erzeugte „blunt end“-Schnittstellen. Jeweils 1µg cDNA wurden mit *Klenow* nach Angaben des Herstellers inkubiert und anschließend gereinigt (s. 3.2.2.4).

Spezielle Materialien:

DNA Polymerase I Large Fragment (Klenow); DNA Polymerase I Large Fragment Puffer; dNTP-Mix

3.2.2.8.2 Dephosphorylierung/Kinasierung

Bei der Verwendung einer einzigen Restriktionsschnittstelle während der Klonierung religiert der Vektor zu einem hohen Prozentsatz, ohne das zugegebene cDNA-Fragment zu integrieren. Diese Religation wird durch eine Dephosphorylierung des Vektors am 5'-Ende verhindert. Falls das cDNA-„insert“ über PCR-Methoden ohne anschließende Restriktion hergestellt worden ist, muss dessen 3'-Ende zur Durchführung der Ligation phosphoryliert werden.

Die Dephosphorylierung von jeweils 1pmol der Vektoren wurde mit Hilfe der *Shrimp Alkaline Phosphatase* nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Phosphorylierung der mit PCR hergestellten DNA-Fragmente erfolgte durch Inkubation von 20pmol DNA mit der *T4 Polynucleotide Kinase*, ebenfalls nach Herstellerangaben. Beide Reaktionen wurden zur Beendigung bei 65°C, 10min Hitze inaktiviert. Die jeweilige DNA wurde der Reinigung unterzogen (s. 3.2.2.4).

Spezielle Materialien:

Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP); SAP-Puffer; *T4 Polynucleotide Kinase (PNK)*; PNK-Puffer; 5'-Adenosin-Triphosphate (rATP)

3.2.2.8.3 Klonierung von PCR-Produkten

Die mit PCR hergestellten cDNA-Fragmente wurden zunächst elektrophoretisch getrennt (s. 3.2.2.3) und gereinigt (s. 3.2.2.4). In den häufigsten Fällen wurden zur Klonierung der Fragmente die über die Oligonukleotide eingefügten Restriktionsschnittstellen verwendet (s. 3.2.2.8). Die übrigen Fragmente wurden entweder am 3'-Ende „blunt“ (nach der Phosphorylierung durch die PNK (s. 3.2.2.8.2) und Auffüllen der 5'-Überhänge des geschnittenen Vektors mit *Klenow* (s. 3.2.2.8.1)) oder direkt mit Hilfe der *TOPO-TA Cloning[®] Kit* in den Vektor kloniert.

3.2.2.8.4 Klonierung mit dem *TOPO-TA[®] Cloning Kit*

Für die Verwendung des *TOPO-TA[®] Cloning Kits* ist ein 3'-Adenin Überhang am DNA-Fragment unbedingt erforderlich. Da „proof reading“-Polymerasen, zu denen die *Pfu-Polymerase* gehört, keine 3'-Adenin Überhänge erzeugen, wurden die mit *Pfu*-PCR hergestellten Fragmente direkt im gleichen Reaktionsansatz mit 0,01U/μl *Super-Taq-Polymerase* versetzt und für 15min bei 72°C inkubiert. Im Gegensatz zu der *Pfu-Polymerase* besitzen *Taq-Polymerasen* eine Sequenz unabhängige terminale Transferaseaktivität. Die gereinigten PCR-Fragmente wurden ohne weitere Modifikationen in den pcDNA3.1/CT-GFP-TOPOTM nach Angaben des Herstellers kloniert.

Spezielle Materialien:

pcDNA3.1/CT-GFP-TOPOTM, *Super-Taq-Polymerase*

3.2.2.8.5 Ligation

Die Ligationen wurden entweder mit der *T4 DNA Ligase* oder mit dem *Quick LigationTM Kit* durchgeführt. Für die *T4 DNA Ligase* wurde die zu ligierende DNA in einem Zahlenverhältnis „insert“-DNA zu Vektor-DNA von 4:1 eingesetzt und die Ligationsansätze nach Angaben des Herstellers angesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C. Der Einsatz der DNA und die Durchführung der Ligation bei Verwendung des *Quick LigationTM Kits* entsprachen ebenfalls den Angaben des Herstellers.

Spezielle Materialien:

T4 DNA Ligase; *T4 DNA Ligase-Puffer*; *Quick Ligation™ Kit*

3.2.3 Transformation von Bakterien

3.2.3.1 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Die Bakterienstämme *DH5 α* , *XL1-blue*, *HB101* und *BL21* wurden für die Elektroporation wie folgt vorbereitet:

Die Starterkulturen der entsprechenden Stämme wurden über Nacht in 50ml Flüssigkultur angesetzt und 2l LB-Medium auf Raumtemperatur erwärmt. Jeweils 500ml LB-Medium wurden in 1l Schüttelkolben überführt und mit 5ml Starterkultur angeimpft. Bei 37°C erfolgte die Kultivierung der Bakterien, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen bei 6000 x g für 10min bei 4°C abzentrifugiert und die Pellets der 4x 500ml Flüssigkulturen vereinigt. Die weitere Aufbereitung erfolgte bei 4°C mit entsprechend vorgekühlten Materialien und Medien. Die Bakterien wurden zweimal in 50ml 1mM HEPES-NaOH (pH 7,05) und einmal in 50ml 1mM HEPES-NaOH (pH 7,05) + 10% Glycerol gewaschen. Zur späteren Verwendung wurden die Bakterien in 4ml 1mM HEPES-NaOH (pH 7,05) + 10% Glycerol aufgenommen und in 50 μ l Aliquots in einem Ethanol/Trockeneisbad schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Spezielle Materialien:

Ethanol; 1mM HEPES-NaOH, pH7,05; 1mM HEPES-NaOH, pH7,05 + 10% Glycerol; LB-Medium; Trockeneis

3.2.3.2 Elektrotransformation von Bakterien

Die Elektroporation wurde mit Hilfe des *GenePulser II* mit dem angeschlossenen *Pulse Controller II* durchgeführt und wurde vorwiegend nach der Ligation mit der *T4 DNA Ligase* eingesetzt (s. 3.2.2.8.5). Alle verwendeten Medien und Materialien wurden auf Eis vorgekühlt. 50 μ l der elektrokompenten Bakterien (s. 3.2.3.1) wurden mit 1-10 μ l der Ligrationsansätze vermischt und mit H₂O auf 100 μ l aufgefüllt. Die Transformation erfolgte in 0,1cm Elektroporationsküvetten bei 1,8kV, 25 μ F, 200 Ω oder in 0,2cm Küvetten bei 2,5kV, 25 μ F und 200 Ω . Die transformierten Bakterien wurden direkt nach der Elektroporation in 900 μ l auf 37°C vorgewärmtes LB-Medium aufgenommen und für 1h bei 37°C im Schütt-

ler inkubiert. 100µl, 250µl und 650µl der Ansätze wurden anschließend auf separaten LB-Platten mit Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Spezielle Materialien:

Ampicillin, Stock: 100mg/ml; 0,1 und 0,2cm Elektroporationsküvetten; LB-Medium; LB-Agarplatten + 100µg/ml Ampicillin

3.2.3.3 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien

Neben der Elektroporation wurde die chemische Methode zur Transformation von Bakterien eingesetzt. Die chemisch kompetenten *TOP10 OneShotTM*-Bakterien wurden mit 1-10µl Ligationsansatz vermischt und nach Angaben des Herstellers transformiert. Die chemische Transformation wurde nach dem Einsatz des *TOPO-TA[®] Cloning Kits* (s. 3.2.2.8.4) sowie des *Quick LigationTM Kits* (s. 3.2.2.8.5) verwendet.

Spezielle Materialien:

TOP10 OneShotTM

3.2.3.4 „PCR Colony Screen“

Zur Bestimmung der Bakterienklone, die das gewünschte Plasmid beinhalten, wurde der „PCR colony screen“ verwendet. Potenziell positive Bakterienklone, d.h. die Bakterienkolonien, die nach der Transformation die Antibiotikumselektion überstanden haben, wurden mit einem autoklavierten Zahnstocher aufgenommen und ein Teil auf eine neue LB-Agarplatte mit Selektion („master“-Platte) zur weiteren Kultivierung gegeben. Der restliche Teil wurde in 50µl Wasser gelöst und für 5min bei 96°C lysiert. Der Zelldebris wurde bei 20.400 x g abzentrifugiert und 5µl des Überstandes als „template“ in der *Super-Taq-PCR* (s. 3.2.2.6) eingesetzt. Zur Detektion des gewünschten Konstruktes wurden „insert“- und vektorspezifische Oligonukleotide verwendet, so dass nur die Klone mit dem enthaltenen „insert“ und der richtigen Orientierung ein positives Signal ergaben. Die cDNA der im „colony screen“ positiven Klone wurde nach Anwachsen der Bakterien auf der „master“-Platte für weitere qualitative Analysen, wie z.B. der DNA-Sequenzierung, isoliert (s. 3.2.2.1).

Spezielle Materialien:

LB-Agarplatten + 100µg/ml Ampicillin

3.2.4 DNA-Sequenzierung

Zur genauen Analyse der DNA-Sequenz der hergestellten Konstrukte wurde die DNA-Sequenzierung durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden unter der Verwendung des Software-Paketes DNASTAR (DNASTAR Inc., USA) und den Diensten des „National Center For Biotechnology Information“ (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) ausgewertet. In dieser Arbeit wurden drei Möglichkeiten zur Sequenzierung genutzt:

1. Sequenzierung mit dem ABI[®] Prism 377 Sequenator

Für die Sequenzierungsreaktion mit diesem System wurden 0,8µg cDNA zusammen mit 0,5µl spezifischem Oligonukleotid (10µM), 2µl ABI PRISM[®] BigDye[™] v1.0 ad 5µl mit H₂O angesetzt und der Sequenzierungs-PCR (s. Tabelle 12) unterzogen.

Tabelle 12: Sequenzierungs-PCR für ABI[®] Prism 377 Sequenator

	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung:	96°C	1min
2. Denaturierung	96°C	10s
3. „Annealing“	variabel	5s
4. „Extension“	60°C	4min
5. Lagerung	4°C	∞

Anzahl der Zyklen (Schritte 2-4): 25

Nach abgeschlossener Reaktion wurde der Ansatz mit 15µl Wasser aufgefüllt und die DNA in 0,5 ml Eppendorfgefäße gefällt (s. 3.2.2.2). Die präzipitierte DNA wurde in der *SpeedVac* 3min getrocknet, in 2µl ABI-Ladepuffer aufgenommen und direkt vor der Sequenzierung für 2min bei 96°C denaturiert.

Das Sequenziergel wurde aus 25ml Sequenziergellösung durch Zugabe von 175µl 10% APS und 7,5µl TEMED hergestellt und nach Polymerisation der Polyacrylamidlösung in den Sequenzierer eingespannt. Die Sequenzierung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2. Sequenzierung bei GATC

Ein Teil der Sequenzierung wurde bei der Firma GATC Biotech AG (Konstanz, www.GATC.de) durchgeführt. Die Konstrukte und spezifischen Oligonukleotide wurden in der von GATC angegebenen Konzentration zu der Firma geschickt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte sowohl über die OD₂₆₀ als auch über die analytische Gelelektrophorese (s. 3.2.2.5).

3. Sequenzierung im Zentrallabor des UKM

Ein weiterer Teil der Sequenzierungen wurde im Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster (UKM) durchgeführt. Dafür wurden die Proben wie folgt aufbereitet:

Die cDNA wurde mit dem *High Pure Plasmid Isolation Kit* aus den Bakterien isoliert. 200-400ng der DNA wurden zusammen mit 1µl spezifischem Oligonukleotid (10µM), 2µl *ABI PRISM® BigDye™ v2.0* und H₂O (ad 8µl) angesetzt. Die anschließende Sequenzierungs-PCR ist in Tabelle 13 zusammengefasst:

Tabelle 13: Sequenzierungs-PCR zur UKM-Sequenzierung

	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung:	96°C	5min
2. Denaturierung	96°C	10s
3. „Annealing“/„Extension“	variabel	4min
4. Lagerung	4°C	∞

Anzahl der Zyklen (Schritte 2-3): 25

Nach der Reaktion wurden die Ansätze mit 10µl H₂O aufgefüllt, mit dem *DyeEx™ Spin Kit* nach Angaben des Herstellers gereinigt und am UKM sequenziert.

Spezielle Materialien:

ABI Loading Buffer; ABI PRISM® BigDye™ v1.0; ABI PRISM® BigDye™ v2.0; High Pure Plasmid Isolation Kit

Sequenziergellösung: 6M Harnstoff
4,5% Acrylamid/Bisacrylamidlösung
in TBE-Puffer

3.2.5 Zellbiologische Methoden

3.2.5.1 Kultivierung von Zell-Linien

Die verwendeten Zell-Linien wurden je nach Bedarf in Gewebekultur-Schalen der Hersteller Falcon und Nalge Nunc mit den Durchmessern von 6mm (96er-„well“), 16mm (24er-„well“), 35mm (6er-„well“), 90mm und 150mm bis zum Erreichen der Konfluenz in ihrem jeweiligen Kulturmedium bei definiertem CO₂-Gehalt kultiviert. Zur weiteren Behandlung wurden alle verwendeten Medien und Lösungen auf 37°C vorgewärmt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst (vgl. spezifische Bedingungen

der verschiedenen Zell-Linien) und in ihrem jeweiligen Kulturmedium in gewünschter Dichte auf neue Platten verteilt. Die Häufigkeit der Passagierungen und die jeweilige Zelldichte hingen von den jeweiligen Versuchsbedingungen und dem Zelltyp ab.

Kultivierung von CHO-Zellen – CHO-Zellen wurden in α -MEM-Vollmedium bei 10% CO₂ kultiviert. Zur Selektion transfizierter CHO-Zellen wurden dem Medium je nach Resistenz die Antibiotika G418 (800 μ g/ml), Zeocin (200 μ g/ml), Hygromycin (200 μ g/ml), Blastidicin (7 μ g/ml) oder einem Gemisch zugesetzt. Zum Ablösen von CHO-Zellen wurden diese für 1min mit Trypsin/EDTA bei RT inkubiert und die Lösung anschließend abgesaugt. Nach weiteren vier Minuten wurden die Zellen direkt von der Platte mit frischem Vollmedium abgewaschen und auf neue Platten verteilt.

Kultivierung von COS7-Zellen – COS7-Zellen wurden in DMEM-Vollmedium bei 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden analog zu den CHO-Zellen mit Trypsin/EDTA von der Platte gelöst und aufgeteilt.

Kultivierung von bEND.3-Zellen – bEnd.3 Zellen wurden in DMEM-Vollmedium bei 10% CO₂ kultiviert. Vor der Passagierung der Zellen wurden die frischen Gewebekulturschalen für 1h mit 0,2% Gelatine in PBS bei 37°C inkubiert. Vor der Verwendung wurde die Gelatine von den Schalen entfernt. Zum Ablösen der Zellen wurden diese für 5-10min mit Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, bis sich die ersten Zellen von den Schalen lösten. Zu dem Trypsin/EDTA wurden 10ml Vollmedium gegeben, mit diesem Gemisch die Zellen von der Platte gewaschen und diese für 5min bei 180 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und auf die neuen Schalen verteilt.

Kultivierung von HUVEC-Zellen – HUVEC-Zellen wurden in M199 Vollmedium bei 10% CO₂ kultiviert. Die Behandlung der Schalen und das Ablösen der Zellen erfolgten analog zu den bEND.3-Zellen.

Spezielle Materialien:

α -MEM-Vollmedium; Blastidicin; DMEM-Vollmedium; G418; Hygromycin; M199-Vollmedium; 0,05% Trypsin / 0,02% EDTA-Lösung; Zeocin

3.2.5.2 Kryokonservierung von Zellen

Die dauerhafte Lagerung von Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C . Zur Kryokonservierung wurden die Zellen von den Platten gelöst (s. 3.2.5.1), bei 180 x g und RT zentrifugiert und in Einfriermedium aufgenommen. In der Standardprozedur wurden jeweils pro Ansatz Zellen von 1/3 90mm Schalen in 1ml Einfriermedium konserviert. Die aufgenommenen Zellen wurden bei -80°C schockgefroren und nach 24-48h in den Stickstoff überführt.

Kryokonservierte Zell-Linien wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, in 10ml vorgewärmtem Zellkulturmedium (s. 3.2.5.1) aufgenommen und bei 180 x g für 5min (RT) zentrifugiert. Anschließend wurden sie in 10ml frischem, vorgewärmtem Medium in die Schalen zur Kultivierung gegeben. Einen Tag nach dem Auftauen wurde das Zellkulturmedium erneuert.

Spezielle Materialien:

Einfriermedium; Zellkulturvollmedien; 0,05% Trypsin / 0,02% EDTA

3.2.5.3 Transfektion von eukaryotischen Zellen

3.2.5.3.1 Transiente Transfektion mit dem *GeneJammerTM Transfection Reagenz*

Zur Transfektion von COS7-Zellen wurde das *GeneJammerTM Transfection Reagenz* eingesetzt. Diese Methode gewährleistete die Doppeltransfektion der Zellen mit zwei Expressionsplasmiden mit ausreichender Transfektionseffizienz. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen im Verhältnis 1 zu 7 auf neue Zellkultur-Schalen passagiert, so dass sie bei Beginn der Transfektion ca. 50-70% konfluent waren. Zur Transfektion wurden je 1ml zusatzfreies DMEM-Medium in 6ml Polystyrolröhrchen gegeben, langsam mit 24 μl des *GeneJammerTM Transfection Reagenz* versetzt und für 10min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 3 μg der jeweiligen Plasmid-DNA zugegeben und erneut für 10min bei RT inkubiert (wichtig: bei beiden Inkubationen standen die Lösungen vibrationsfrei). Währenddessen wurde das Zellkulturmedium auf den Zellen durch 3ml frisches Vollmedium (s. 3.2.5.1) ersetzt. Die 1ml umfassenden Transfektionsansätze wurden nach der Inkubation langsam auf die Zellen gegeben und diese für 4h bei 37°C , 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurden die Schalen mit 6ml Vollmedium aufgefüllt und im Brutschrank (37°C , 5% CO_2) kultiviert. Nach 36 bis 48h wurden die Zellen in den entsprechenden Experimenten eingesetzt.

Spezielle Materialien:

DMEM; DMEM-Vollmedium; *GeneJammerTM Transfection Reagenz*; 6ml Polystyrolröhrchen

3.2.5.3.2 Stabile Transfektion von CHO-Zellen

Die stabile Transfektion von CHO-Zellen erfolgte über Elektroporation. Alle Zellkulturmedien wurden vor der Verwendung auf 37°C erwärmt und die 0,4cm Elektroporationsküvetten auf Eis vorgekühlt. Für die Transfektion von CHO-Zellen wurden jeweils ca. 1×10^7 Zellen (entsprechen der Zellmenge einer 90mm Schale) zweimal mit PBS auf der Platte gewaschen und mit 1ml PBS + 5mM EDTA bis zum Ablösen inkubiert. Die Zellen wurden mit 10ml PBS von der Platte genommen, bei 180 x g für 5min sedimentiert, nochmals in 10ml PBS gewaschen und mit dem *CASYTM TT SCI* gezählt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet mit einer Zellzahl von $1,67 \times 10^7$ Zellen/ml in 600µl PBS aufgenommen und mit je 20µg cDNA der entsprechenden Konstrukte versetzt. Die Zell-/Plasmidlösung wurde in 0,4cm Elektroporationsküvetten überführt und auf Eis für 10min inkubiert.

Die Transfektion wurde mit Hilfe des *GenePulser II* bei 0,25kV, 950µF, Kapazitätseinstellung „high“, durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen in 10ml vorgewärmtem Vollmedium (s. 3.2.5.1) aufgenommen, in verschiedenen Dichten (Verdünnungen: 1/5, 1/10, 1/20) auf neue Zellkulturplatten gegeben und über Nacht bei 37°C, 10% CO₂ kultiviert. Am Tag darauf wurde das Medium gegen Vollmedium mit Selektion (Selektionsmedium) ausgetauscht. Je nach verwendetem Expressionsplasmid wurden folgende Antibiotika zur Selektion verwendet: G418 (800µg/ml), Zeocin (200µg/ml), Hygromycin 200µg/ml, Blastidicin (7µg/ml) oder bei mehrfachen Transfektionen mit den entsprechenden Gemischen. Jeden dritten bis vierten Tag wurde das Selektionsmedium gewechselt, bis die untransfizierten Zellen abstarben und sich einzelne Kolonien transifizierter Zellen bildeten. Die Kolonien wurden am 11. Tag nach der Transfektion wie folgt isoliert: Jede Kolonie wurde auf der Unterseite der Kultur-Schale markiert, das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sterile Glasröhrchen zur Abdichtung in steriles Fett getunkt und über die Kolonien gestülpt. Zum Ablösen der Zellen wurden die Röhrchen mit 100µl PBS + 5mM EDTA aufgefüllt und bei RT für 5min inkubiert. Nach Ablösen der Zellen durch leichtes Auf- und Abpipettieren wurden diese in 16mm (24er-, „well“) Zellkultur-Schalen mit 1ml Selektionsmedium übertragen und bis zur Konfluenz kultiviert. Zum Erhalt ausreichender Zellzahlen wurden die Zellen bei den nächsten Passagen zunächst auf 35mm, dann auf 90mm Zellkultur-Schalen kultiviert und die Ex-

pression der entsprechenden Proteine entweder biochemisch mit SDS-Page und Western-Blot (s. 3.2.6.8) oder mit Hilfe der Durchflusszytometrie (s. 3.2.5.7) analysiert. Positive Klone wurden kryokonserviert (s. 3.2.5.2).

Subklonierung – Um auszuschließen, dass die verwendeten Zell-Linien auf heterogenen Klongemischen basieren, wurden die positiven „Mutterklone“ subkloniert, d.h. die Zellen wurden mit einer Dichte von 0,3 Zellen pro 96er-„well“ ausplattiert. Zur Subklonierung wurden die Zellen von 35mm Zellkultur-Schalen mit Trypsin/EDTA abgelöst (s. 3.2.5.1), mit dem *CASYTM TT SCI* gezählt und auf eine Zelldichte von 3 Zellen/ml in Selektionsmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 100µl Aliquots auf 6mm (96er-„well“) Platten verteilt, jedes „well“ mit 150µl Medium aufgefüllt und bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen weiter auf 16mm (24er-„well“), 35mm (6er-„well“) und 90mm Schalen kultiviert und die Expression der Proteine entweder biochemisch oder mit Hilfe der Durchflusszytometrie (s. 3.2.5.7) analysiert. Positive Klone wurden weiter kultiviert und/oder kryokonserviert (s. 3.2.5.2).

Spezielle Materialien:

α-MEM Vollmedium; Blasticidin; *CASYTM TT SCI*; G418; Hygromycin; PBS; PBS + 5mM EDTA; 0,05% Trypsin / 0,02% EDTA-Lösung; Zeocin

3.2.5.4 Induktion der Expression von Myc-CSK in transfizierten CHO-Zellen

Zur induzierbaren Expression des Myc-CSK wurde dieses mit Hilfe des *GeneSwitchTM-Systems* von Invitrogen in CHO-Zellen transfiziert (s. 3.2.5.3.2). Dieses System basiert auf einem Hybridregulatorprotein mit einer DNA-bindenden Domäne des GAL4-Promotors (aus Hefen), einer verkürzten ligandenbindenden Domäne des menschlichen Progesteron-Rezeptors und der Aktivierungsdomäne des menschlichen NF-κB-Promotors. Durch die Anbindung an das künstliche Steroid Mifepristone funktioniert das Regulatorprotein als Liganden abhängiger Transkriptionsfaktor sowohl für die eigene Expression als auch für die des gewünschten Proteins. Zur Erzeugung Myc-CSK induzierbarer Zellen wurde der Expressionsvektor (pGene/V5-His), auf dem das Zielprotein unter der Kontrolle eines Hybridpromotors (GAL4 „upstream activation site“ + „TATA box“-Sequenz vom Adenovirus „Major Late E1b Gen“) vorliegt, zusammen mit dem Regulatorvektor pSwitch kotransfiziert. Der Vektor pSwitch kodiert für das Regulatorprotein unter der Kontrolle des Hybridpromotors GAL4 UAS/TK (Minimalpromotor der Thymidin-Kinase von *Herpes simplex*).

Die Induktion der Myc-CSK Expression in den transfizierten Zellen erfolgte durch die Zugabe von 10nM Mifepristone (in Ethanol) zu dem Kulturmedium, während zu den Zellen ohne Induktion die gleiche Menge an Ethanol zugesetzt wurde. Die Inkubation betrug 7,5 bis 20h bei 37°C und 10% CO₂.

Spezielle Materialien:

GeneSwitchTMSystem; Mifepristone in Ethanol

3.2.5.5 *In-vivo*-Phosphorylierung von endogenen Proteinen

Vanadat ist ein effizienter Inhibitor von Proteasen und verhindert die Dephosphorylierung von Proteinen. Da eukaryotische Zellen Vanadat nicht direkt aus dem Medium aufnehmen können, muss dieses vor der *in-vivo* Verwendung in Pervanadat umgesetzt werden.

Pervanadat wurde aus 10mM Orthovanadat und 10mM H₂O₂ in PBS-Puffer durch Inkubation für 30min bei RT hergestellt und in den Konzentrationen 200µM (bEND.3-Zellen) und 333µM (COS7-/CHO-Zellen) zu den Zellen gegeben. Die Dauer der Pervanadat-Behandlung betrug je nach Versuchsbedingungen zwischen 5 und 20min.

Spezielle Materialien:

20mM H₂O₂, in H₂O; 50mM Na-Orthovanadat in H₂O; 10x PBS

3.2.5.6 Immunhistochemische Färbungen

CHO-Zellen wurden auf *LabTakTMII Chamber SlidesTM* mit einer Dichte von 1,5x10⁴ Zellen/ml ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Sollten die transfizierten CHO-Zellen Myc-CSK exprimieren, wurden die Zellen vor der Fixierung für 7,5h mit Mifepristone behandelt (s. 3.2.5.4). Die *in-vivo* Phosphorylierung (s. 3.2.5.5) erfolgte für 5min bei RT. Die Zellen wurden zweimal in PBS (4°C) gewaschen und in -20°C kaltem Methanol für 5min bei -20°C fixiert. Das Methanol wurde entfernt und die Zellen erneut zweimal in PBS gewaschen. Zur Reduzierung unspezifischer Bindungen der Antikörper wurden die Ansätze mit 1% BSA in PBS für 1h auf Eis geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern (10µg/ml in 1% BSA in PBS) für 1h auf Eis und den fluorophormarkierten Sekundärantikörpern (Verdünnung in 1% BSA in PBS: 1:500 oder 1:250 für in Glycerin aufgenommene Antikörper) für mindestens 30min auf Eis. Nach jeder Antikörperinkubation erfolgten drei Waschschrte in PBS. Die gefärbten Zellen wurden mit dem *DAKO Fluorescence Mounting Medium* mit einem Deckglas versehen und bis

zum Aushärten des *Mounting*-Mediums bei 4°C gelagert. Die Analyse der Immunfluoreszenzen erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop *Axioskop2* mit angeschlossener Digitalkamera *Model 2.1.1* oder mit dem *CLSM TSC SP*.

Spezielle Materialien:

Cy2™, Cy3™ oder TexRed™ gekoppelte Sekundärantikörper; *DAKO Fluorescence Mounting Medium*; *LabTak™II Chamber Slides™*; Methanol; PBS; PBS + 1% BSA

3.2.5.7 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Expression von Oberflächenmolekülen kann mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert werden. Dafür werden diese von spezifischen Antikörpern erkannt und über fluorophorgekoppelte sekundäre Antikörper markiert. Während der Analyse werden die Größe und die Granularität der Zellen sowie die Intensität der Fluoreszenzemission ermittelt. Die FACS-Analyse gibt u.a. Aufschluss darüber, wie viele Zellen nach einer Transfektion tatsächlich das gewünschte Protein exprimieren. Durch vergleichende Analyse kann darüber hinaus die jeweilige Menge an exprimierten Proteinen abgeschätzt werden.

Für diese Art der Expressionskontrolle wurden ca. 1×10^6 Zellen/Ansatz eingesetzt. Die Zellen wurden zweimal auf den Zellkultur-Schalen mit PBS gewaschen und mit PBS + 5mM EDTA durch 5min Inkubation bei 37°C abgelöst und bei 180 x g 5min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in einer entsprechenden Menge FACS-Puffer aufgenommen und in 6mm (96er-„well“) Rundbodenplatten a' 100µl Aliquots überführt. Nach erneuter Zentrifugation bei 260 x g für 10min erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen primären Antikörpern (10mg/ml in FACS-Puffer) für 1h bei 4°C. Die PE-gekoppelten Sekundärreagenzien wurden ebenfalls 1h bei 4°C in einer Verdünnung von 1:100 in FACS-Puffer auf die Ansätze gegeben. Nach jeder Antikörperinkubation wurden die Zellen zweimal in FACS-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 100µl *Cell-Fix*-Lösung konserviert und bis zur FACS-Analyse bei 4°C in Dunkelheit gelagert. Die Analyse erfolgte in 0,6ml FACS-Röhrchen, in die die Zellsuspension überführt und mit 300µl *FACS-Flow*-Lösung aufgefüllt wurde. Die Messungen mit *FACS-Calibur* der Firma Becton-Dickinson und die Auswertung mit der Software *CellQuest* erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

Spezielle Materialien:

10x *Cell-Fix*-Konzentrat; 0,6ml FACS-Röhrchen; PBS + 5mM EDTA; 96er-„well“-Rundbodenplatten

FACS-Puffer: 1% BSA, in PBS
0,04% NaN₃

3.2.5.8 Funktionelle Zelleexperimente

3.2.5.8.1 Permeabilitätsexperimente

Für die Analyse der Durchlässigkeit von Zelleinzelschichten wurden Zellen auf wasser-durchlässigen Filtern bis zur Konfluenz kultiviert und die Diffusion eines dextranekoppelten Farbstoffes durch die Zellschicht gemessen (Breviario et al., 1995; Nawroth et al., 2002).

Die transfizierten CHO-Zellen wurden in einer Dichte von $1,5 \times 10^4$ Zellen/Filter auf $0,4 \mu\text{m}$ *Transwell*-Filter in $200 \mu\text{l}$ α -MEM Vollmedium ausgesät. Die Zählung der Zellen erfolgte nach der Ablösung mit Trypsin/EDTA (s. 3.2.5.1), mit einer Neubauer-Zählkammer oder dem *CASYTM TT SCI*. In einigen Experimenten wurde die untere Filterkammer mit $700 \mu\text{l}$ Medium gefüllt. Nach drei Tagen Kultivierung wurden die Zellen für unterschiedliche Zeitspannen (4-12h) mit Mifepristone induziert (s. 3.2.5.4). Für das Experiment wurde die untere Filterkammer mit $700 \mu\text{l}$ Vollmedium gefüllt, wenn dieser Schritt bei der Aussaat noch nicht durchgeführt worden war, und für 15min bei 37°C und 10% CO_2 äquilibriert. Anschließend erfolgte der Start der Diffusion durch den Austausch von $100 \mu\text{l}$ Medium gegen $100 \mu\text{l}$ der FITC-Dextranfarbstofflösung (Endkonzentration: 1mg/ml in Vollmedium). Nach 1h wurde die Diffusion durch Entnahme der Filter beendet und die Fluoreszenz mit dem *Lambda Fluoro 320* oder dem *Fluoromax-2* gemessen (Excitation: $\lambda = 492\text{nm}$, Emission: $\lambda = 520\text{nm}$).

Spezielle Materialien:

α MEM-Vollmedium; *CASYTM TT SCI*; *Fluoromax-2*; *Lambda Fluoro 320*; Neubauer-Zählkammer; FITC-Dextran, 42kD; $0,4 \mu\text{m}$ *Transwell*-Filter

3.2.5.8.2 Aggregationsexperimente

Für die Aggregationsexperimente wurden die eingesetzten Zellen vereinzelt und gezählt. Die Aggregation wurde anhand der Abnahme der Zellzahl durch die Bildung von Aggregaten nach einer definierten Zeitspanne auf einem Schüttler bestimmt.

Die transfizierten CHO-Zellen wurden am Tag vor dem Experiment entweder in der Weise umgesetzt, dass sie für das Experiment vereinzelt auf den Platten vorlagen, oder dass sie

zum Experiment zu ca. 75-90% konfluent waren. Die Zellen wurden zweimal in PBS und einmal in Ablösemedium auf den Zellkultur-Schalen gewaschen. Anschließend wurden sie mit 4ml Ablösemedium durch 10min Inkubation bei 37°C von der Platte gelöst und mit dem *CASYTM TT SCI* gezählt. Währenddessen wurde das Trypsin mit dem gleichen Volumen Inhibitionsmedium inaktiviert und die Zellen einmal in Aggregationsmedium gewaschen. Die Zellzahl wurde auf $1,3 \times 10^5$ Zellen/ml mit Aggregationsmedium eingestellt und jeweils 2ml der Suspension auf 60mm Platten verteilt. Pro Ansatz wurden sechs Einzelproben untersucht. Die Platten wurden vor der Verwendung mit HANKS + 1% BSA bei 37°C für 30min beschichtet. Zur Bestimmung der Zellzahl vor der Aggregation wurden zwei Ansätze mit 5% Glutaraldehyd für 30min auf Eis fixiert. Die Zellen wurden für 60min bei 100rpm und 37°C im Schüttler inkubiert und mit 5% Glutaraldehyd fixiert. Die Auszählung der gebildeten Aggregate erfolgte nach vorsichtigem Resuspendieren der Ansätze mit dem *CASYTM TT SCI*.

Die Aggregation wurde anhand der Zellzahlen vor und nach der Inkubation anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Aggregation} = (N_0 - N_t) / N_0$$

mit N_0 = Zellzahl vor der Inkubation, N_t = Zellzahl nach der Inkubation

Spezielle Materialien:

BSA; *CASYTM TT SCI*; Glutaraldehyd (25%-Lösung); HANKS

Ablösemedium:	HANKs-Medium, in H ₂ O 5mM Ca ²⁺ 5mM Mg ²⁺ 2,5mg/ml Trypsin
Aggregationsmedium:	HANKs-Medium, in H ₂ O 25mM HEPES 2mM Ca ²⁺ <i>DNase I</i> , 10µg/ml
HANKs-Medium:	HANKs-Salts, in 1l H ₂ O 350mg NaHCO ₃
Inhibitionsmedium:	DMEM 10% FCS Trypsin-Inhibitor (0,1mg/ml)

3.2.5.8.3 Proliferationsexperimente

Zur Bestimmung der Proliferationsrate von Zellen wurden diese im subkonfluenten Zustand ausgesät und die neu gebildeten Zellen mit [Methyl-³H]-Thymidin markiert.

Die transfizierten CHO-Zellen wurden in einer Dichte von $1,79 \times 10^4$ Zellen/cm² in 50µl Vollmedium ausgesät und über Nacht in 96er-, „well“-Platten kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von Mifepristone in 50µl Medium induziert (s. 3.2.5.4) und nach acht Stunden mit 0,74MBq/ml [Methyl-³H]-Thymidin in 25µl Medium markiert. Nach weiteren 20h Inkubation wurde das Medium mit dem *Cell Harvester* abgesaugt, die Zellen zehnmal gewaschen und für 10min mit 140µl Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert. Nach dem vollständigen Ablösen der Zellen durch mehrfaches Auf- und Abpipetieren wurde die genomische DNA mit dem *Cell Harvester* auf Filter übertragen. Die Filter wurden zehnmal gewaschen, getrocknet und die Radioaktivität mit dem *LS6500 Scintillation Counter* gemessen.

Einfluss von VEGF auf die Zellproliferation – Zur Untersuchung des Einflusses von VEGF auf die Proliferationsrate der mit Flk-1 transfizierten CHO-Zellen wurden die Zellen mit Medien unterschiedlichen FCS-Gehaltes (0 bis 10%) kultiviert. Vier Stunden nach der Aussaat in Vollmedium wurde dieses von den Zellen abgenommen und durch 50µl FCS reduziertes Medium ersetzt. Nach der Kultivierung über Nacht erfolgte neben der Induktion mit Mifepristone die Zugabe von 0-160 µg/ml VEGF in 50µl des jeweiligen Mediums. HUVEC-Zellen wurden in den Zelldichten $8,93 \times 10^3$ und $1,79 \times 10^4$ Zellen/cm² ausgesät und für vier Stunden in M199 Vollmedium kultiviert (die 96er-, „well“-Platten wurden vor Versuchsbeginn für 1h mit 0,2% Gelatine in PBS bei 37°C beschichtet). Anschließend wurde das Vollmedium gegen 50µl frisches Vollmedium oder 50µl M199 Medium ohne FCS und ECGS ausgetauscht und über Nacht kultiviert. Acht Stunden vor der Tritiummarkierung wurden die Zellen mit 0 und 25µg/ml VEGF in 50µl Medium stimuliert.

Einfluss von VE-Cadherin auf die Kontakt-Inhibition der Zellproliferation – Der Einfluss von VE-Cadherin auf die Kontakt-Inhibition der Zellproliferation der transfizierten CHO-Zellen wurde durch die Zugabe von funktionellen VE-Cadherin-Antikörpern in das Medium untersucht. Die Zellen wurden in den Dichten von $7,14 \times 10^4$, $1,43 \times 10^5$ und $2,86 \times 10^5$ Zellen/cm² ausgesät und während des gesamten Versuches mit je 20µg/ml der Antikörper VE1.1, VE57.1 und 11D4.1 inkubiert. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte wie bereits oben beschrieben.

Spezielle Materialien:

α MEM-Vollmedium; *Cell Harvester*; „Glass fibre filter“, *Typ G7*; [Methyl-³H]-thymidine; *LS6500 Scintillation Counter*; M199; M199-Vollmedium; 0,05% Trypsin / 0,02% EDTA-Lösung; VEGF

3.2.6 Biochemische Methoden

3.2.6.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen erfolgte mit einem UV-Spektrometer bei der Wellenlänge $\lambda = 280\text{nm}$ (Absorptionsmaximum von Proteinen) in Quarzküvetten. Der Proteingehalt errechnete sich anhand der gemessenen Extinktion nach folgender Formel:

$$c[\text{mg/ml}] = \text{OD}_{280} \times 1,4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Alternativ wurden die Proteinkonzentrationen mit Hilfe der SDS-Page (s. 3.2.6.2) mit definierten Proteinstandards oder unter Verwendung des *BCA Protein Assay Kit* (BCA-Test) nach Angaben des Herstellers bestimmt.

Spezielle Materialien:

BCA Protein Assay Kit

3.2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Trennung und Bestimmung der Molekulargewichte von Proteinen wurde die SDS-Page mit definierten Standards verwendet. Die SDS-Page wurde in Minigelapparaturen durchgeführt. Die Polymerisation des Trenngels wurde durch Zugabe von 0,01% TEMED zu der Trenngellösung gestartet und war nach 30 bis 45min bei RT abgeschlossen. Vor der Aushärtung des Gels wurde die Lösung in die Gelkammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet, das vor der Herstellung des Sammelgels abgenommen und mit H₂O entfernt wurde. Zur Polymerisation des Sammelgels wurden 0,02% TEMED der Sammelgellösung zugesetzt und die Lösung auf das Trenngel gegeben. In die Sammelgellösung wurden die Probenkämme eingesetzt. Die Aushärtung erfolgte bei RT für 30min. Die fertigen SDS-Gele wurden in die Gelapparatur eingesetzt und mit Laufpuffer überschichtet.

Die Proteinproben wurden mit 3x SDS Probenpuffer versetzt und für 5min bei 96°C denaturiert. Anschließend wurden sie zusammen mit den Proteinstandards auf die Gele beladen

und elektrophoretisch getrennt. Die Gelelektrophorese wurde bei 75 bis 90V gestartet und, sobald die Lauffront das Trenngel erreichte, bei 150 bis 175V durchgeführt.

Spezielle Materialien:

Minigelapparaturen; TEMED-Lösung

Laufpuffer:	250mM TRIS-HCl, pH6,8, in H ₂ O 1,92M Glycin 34,67mM SDS
Probenpuffer (3x):	375mM TRIS-HCl, pH6,8, in H ₂ O 30% Saccharose (w/v) 6% SDS 0,01% BPB 50mM DTT
Trenngellösung:	20 – 40% 30%-ige Acrylamid/Bisacrylamidlösung 375mM TRIS-HCl, pH8,8, in H ₂ O 0,05% APS
Sammelgellösung:	13% 30%-ige Acrylamid/Bisacrylamidlösung 375mM TRIS-HCl, pH 6,8, in H ₂ O 0,05% APS
Proteinstandards:	<i>SDS Page Standards Broad Range</i> (Bio-Rad) <i>Prestained SDS Standards High Range</i> (Bio-Rad) <i>Prestained SDS Standards Low Range</i> (Bio-Rad) <i>CFA626, [¹⁴C] Protein Molecular Weight Marker</i> (Amersham Pharmacia)

3.2.6.3 Coomassiefärbung von Proteinen in SDS-Gelen

Zur Visualisierung der Proteine innerhalb von SDS-Gelen wurde die Coomassiefärbung eingesetzt. Die Gele wurden nach der SDS-Page für 30min in der Coomassielösung und anschließend für mehrere Stunden in mehrfach gewechselter Entfärberlösung inkubiert sowie abschließend auf einem Geltrockner getrocknet.

Spezielle Materialien:

Coomassiefärbelösung: 45% Methanol, in H₂O
 10% Essigsäure
 0,25% Coomassie

Entfärbelösung: 10% Ethanol, in H₂O
 10% Essigsäure
 10% Methanol

3.2.6.4 Detektion von Proteinen durch Autoradiographie/Fluorographie

Die radioaktiv markierten Proteine wurden nach der SDS-Page in den SDS-Gelen für 30min mit 10% Essigsäure fixiert und bei ³⁵S markierten Proteinen die Sensitivität der Autoradiographie durch 30min Inkubation mit dem *Amplify*TM verstärkt (Fluorographie). Anschließend wurden die Gele auf einem Gelrockner für 2h getrocknet. Die Analyse erfolgte über die Autoradiographie/Fluorographie unter Verwendung von *ECL-Hyperfilmen* in Kombination mit einer Verstärkerfolie.

Spezielle Materialien:

*Amplify*TM *NAMP100*; *ECL-Hyperfilm*; 10% Essigsäure in H₂O

3.2.6.5 „GST-Pulldown“-Experimente

Für die *In-vitro*-Analyse von Protein-Protein-Interaktionen wurden die „GST-pulldown“-Experimente verwendet. Bei dieser Methode wurden GST-Fusionsproteine an Glutathion-Sepharose-„beads“ gekoppelt und nach Inkubation mit Lysaten die assoziierten Proteine präzipitiert und analysiert. Die potenziellen Bindungspartner wurden in dieser Arbeit in Retikulozytenlysat exprimiert und mit ³⁵S markiert.

Herstellung und Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Die Fusion des zu untersuchenden Proteins mit Teilen der Glutathion-S-Transferase (GST) war notwendig, um eine leichte Reinigung der Proteine mit Hilfe von Glutathion-Sepharose, die an den GST-Teil bindet, und um eine spätere Präzipitation aus den Lysaten gewährleisten zu können. Für die Herstellung dieser Proteine wurde der Expressionsvektor pGEX-4T-1 verwendet.

Die GST-Fusionsproteine wurden in dem Bakterienstamm *BL21* exprimiert und aus dessen Lysaten gereinigt. Der *BL21*-Stamm zeichnet sich durch eine reduzierte proteolytische Aktivität aus, die auch die Reinigung größerer Proteinmengen ermöglicht.

Eine Starterkultur der Bakterien wurde über Nacht in 50ml LB-Medium + 100µg/ml Ampicillin bei 37°C, 200rpm angezogen. 200ml Induktionsmedium wurden mit einer Starterkultur so inokuliert, dass eine OD₆₀₀ von 0,2 erreicht wurde. Die Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C, 200rpm, kultiviert (ca. 2h) und die Proteinsynthese durch Zugabe von IPTG (0,5mM Endkonzentration) gestartet. Währenddessen wurden alle verwendeten Materialien und Geräte auf 4°C vorgekühlt. Nach 2h Inkubation bei RT wurden die Bakterien für 15min bei 1300 x g und 4°C abzentrifugiert, das Zellpellet in 25ml Lysepuffer aufgenommen und mit Hilfe der *French Pressure Cell Press* lysiert. Der Zelldebris wurde bei 10.000 x g für 30min abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde durch einen 0,45µm Sterilfilter gereinigt.

Affinitäts-Chromatographie – Die Glutathion-Sepharose wurde nach Angaben des Herstellers in *Econo*-Säulen vorbereitet. Für die Reinigung von bis zu 5mg Fusionsprotein wurden 1ml gequollene Glutathion-Sepharose-, „beads“ verwendet. Die Bakterienlysate wurden auf die Säulen gegeben und zweimal mit fünf Bettvolumina PBS gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit 5ml Bettvolumina Elutionspuffer in fünf Fraktionen.

Die Fraktionen mit ausreichendem Proteingehalt (OD₆₀₀ ≥ 0,1, s. 3.2.6.1) wurden vereinigt und zweimal in 5l Dialysemedium für mindestens 2h mit Hilfe einer *Slide-A-Lyzer Dialyse-Kassette* dialysiert. Anschließend wurden die Proteine in *Centricons YM-30* nach den Angaben des Herstellers aufkonzentriert, erneut die Konzentration bestimmt, im Verhältnis 1:1 mit Glycerin versetzt und bei –20°C gelagert.

Die Qualität und Quantität der Proteine wurde mit der SDS-Page (s. 3.2.6.2) und anschließender Coomassiefärbung (s. 3.2.6.3) überprüft.

Spezielle Materialien:

Centricon YM-30; Glutathion-Sepharose; LB-Medium + 100µg/ml Ampicillin; *Slide-A-Lyzer Dialyse-Kassetten*

Dialysepuffer: 50mM HEPES, pH7,4, in H₂O

Elutionspuffer: 100mM TRIS-HCl, pH8,0, in H₂O

10mM Glutathion

10µg/ml Leupeptin

Lysepuffer: PBS
1 Tablette „complete“ protease inhibitor/25ml

Phosphorylierung der GST-Fusionsproteine mit der $p60^{c-src}$

Zur Analyse der phosphorylierungsabhängigen Protein-Interaktionen wurden die GST-Fusionsproteine mit der menschlichen c-Src Kinase $p60^{c-src}$ *in-vitro* an ihren Tyrosinresten phosphoryliert. Die $p60^{c-src}$ -Ansätze setzten sich aus 10µg Fusionsprotein (Endkonzentration: 33,3µg/ml), 0,1mM rATP und 30U/ml $p60^{c-src}$ in 300µl Kinasepuffer zusammen. Die Phosphorylierung erfolgte bei 30°C für 20min und wurde durch Zugabe von 13,3mM EDTA beendet. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung auf Eis.

Spezielle Materialien:

5'-Adenosin-Triphosphate, rATP; 0,5M EDTA; $p60^{c-src}$

Kinasepuffer: 20mM HEPES, pH7,4, in H₂O
10mM MgCl₂
2mM MnCl₂

Kopplung der GST-Fusionsproteine an Glutathion-Sepharose

Pro Ansatz wurden 50µl gequollene Glutathion-Sepharose-„beads“ dreimal in B-Puffer gewaschen und in B-Puffer aufgenommen, so dass das Endvolumen 600µl betrug. An die „beads“ wurden jeweils 10µg GST-Fusionsproteine durch Inkubation für 30min bei 4°C auf einem Überkopfschüttler gekoppelt. Anschließend erfolgten drei Waschschriffe mit B-Puffer, die Aufnahme in 600µl B-Puffer und die Lagerung auf Eis.

In-vitro-Expression von Proteinen im Retikulozytenlysat

Zur Analyse der potenziell assoziierten Proteine wurden diese im *TNT[®]Quick*-Retikulozytenlysat exprimiert und metabolisch mit L-[³⁵S]-Methionin markiert. Die cDNA der jeweiligen Konstrukte wurde vor der Expression gefällt (s. 3.2.2.2) und in RNase freien DEPC-Wasser aufgenommen. Die Ansätze setzten sich wie folgt zusammen: 1µg cDNA, 40µl *TNT[®]Quick*-Lysat, 2µl L-[³⁵S]-Methionin ad 50µl mit DEPC-Wasser. Die Expression der Proteine erfolgte während der Inkubation der Ansätze bei 30°C für 2h. Zur Kontrolle der Expression wurden jeweils 1µl der Lysate entnommen und der SDS-Page unterzogen (s. 3.2.6.2).

In-vitro-Analyse der Protein-Protein-Interaktion

Für die Anbindung der im Retikulozytenlysat exprimierten Proteine an die GST-Fusionsproteine wurden jeweils 10-15µl der Lysate zu den gekoppelten Proteinen gegeben und für 2h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze fünfmal mit B-Puffer gewaschen, der SDS-Page unterzogen (s. 3.2.6.2) und mit Hilfe der Autoradiographie (s. 3.2.6.4) analysiert. Zur Kontrolle der Kopplung der GST-Fusionsproteine an die Sepharose-“beads“ wurden 1/10 der jeweiligen SDS-Page-Proben auf separaten Gelen getrennt und mit Coomassielösung gefärbt (s. 3.2.6.3).

Spezielle Materialien:

Glutathion-Sepharose-“beads“ 4B; L-[³⁵S]-methionine; *TNT[®] Quick Coupled Transcription/Translation System*

B-Puffer: 10mM HEPES-NaOH, pH7,4, in H₂O
 100mM KCl
 1mM MgCl₂
 0,1% Triton X-100

3.2.6.6 Herstellung von Zell-Lysaten

Zur Solubilisierung von Proteinen aus Zellen wurden Zell-Lysate hergestellt. Je nach Zusammensetzung der Lysepuffer wurden unterschiedliche Proteinfractionen analysiert. Triton X-100 zerstört als anionisches Detergenz die Zellmembranen und löst sowohl die darin enthaltenen als auch die im Zytoplasma vorliegenden Proteine unter nahezu nativen Bedingungen. Größere Proteinkomplexe können mit Hilfe dieser Methode analysiert werden. An das Zytoskelett assoziierte und im Zellkern befindliche Proteine bleiben allerdings nahezu ungelöst. Auf Harnstoff basierende Lysepuffer schließen hingegen die gesamte Zelle unter denaturierenden Bedingungen auf. Größere Proteinkomplexe zerfallen, so dass diese Methode häufig zur Analyse einzelner Proteine verwendet wird. Bei Kombination der nativen und denaturierenden Lyse können sowohl Proteinkomplexe als auch die an das Zytoskelett assoziierten Proteine nachgewiesen werden.

Native Lyse von Zellen mit Triton X-100

Für die native Lyse wurden für die bEnd.3-Zell-Linie die Zellen von drei 150mm Zellkultur-Schalen (ca. 5×10^7 Zellen) pro Ansatz verwendet, während für COS7- und CHO-Zell-Linien die Zellen einer 90mm Schale (ca. 1×10^7 Zellen) ausreichten. Zur Induktion von

Myc-CSK wurden die transfizierten CHO für 16-20h mit Mifepristone induziert (s. 3.2.5.4). Die Dauer der *In-vivo*-Phosphorylierung (s. 3.2.5.5) betrug für bEND.3 14min, für COS7 20min und für CHO 15min.

Lyse auf der Schale – Alle verwendeten Medien und Geräte wurden auf 4°C vorgekühlt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS auf der Schale gewaschen und anschließend mit 1ml Triton X-100-Lysepuffer pro Schale lysiert. Zur vollständigen Lyse wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Schale genommen und für 30min bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Abtrennung der unlöslichen Proteine erfolgte bei COS7- und CHO-Lysaten durch Zentrifugation für 30min bei 20.400 x g, während bEnd.3-Lysate zusätzlich bei 50.000 x g für 1h gereinigt wurden. Von dem Überstand wurden Aliquots zur Analyse der Proteinexpression über die SDS-Page (s. 3.2.6.2) und den Western-Blot (s. 3.2.6.8) abgenommen und der Rest für die Immunopräzipitation eingesetzt.

Ernten der Zellen mit anschließender Lyse – Sollten Proteinkomplexe zu verschiedenen Konfluenzstadien der Zellen analysiert werden, wurden die Zellen vor der Lyse geerntet und in Stickstoff schockgefroren. Dazu wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in 1ml PBS + 2x Protease-Inhibitoren pro Schale mit Hilfe von Zellschabern von den Schalen genommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5min bei 180 x g pelletiert und nach Abnahme des Überstandes in flüssigem Stickstoff schockgefroren sowie bei -20°C gelagert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 1ml Triton X-100 Lysepuffer pro eingesetzter Platte und wurde, wie oben beschrieben, weitergeführt.

Denaturierende Lyse von Zellen mit Harnstoff

Zur Herstellung von Gesamt-Zell-Lysaten wurden pro Ansatz die Zellen einer 35mm Schale (ca. 3×10^6 Zellen) verwendet. Der Harnstoff/SDS-Lysepuffer wurde frisch angesetzt und auf 96°C vorgewärmt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und auf den Schalen in 150µl Lysepuffer lysiert. Die Lysate wurde bei 96°C für 5min inkubiert und anschließend über SDS-Page (s. 3.2.6.2) und Western-Blot (s. 3.2.6.8) analysiert. Falls notwendig, wurde vor der Analyse die Proteinkonzentration mit Hilfe des BCA-Tests (s. 3.2.6.1) bestimmt und die Konzentrationen der einzelnen Ansätze aneinander angeglichen.

Kombinierte nicht-denaturierende und denaturierende Lyse

Die Kombination beider Lysemethoden wurde zur Analyse der zytoskelettassoziierten Proteine verwendet. Zunächst wurden die Triton-X-100 löslichen Proteine durch eine Triton X-100-Lyse (s.o.) entfernt. Die Zentrifugation nach der Zelllyse erfolgte bei 2700 x g in

2ml Eppendorfgläser mit Rundboden. Die Triton-X-100 unlöslichen Proteine des Pellets wurden einmal in 5ml Triton X-100-Lysepuffer und einmal in 1:10 verdünntem Triton X-100 Lysepuffer gewaschen und jeweils unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Lyse der Triton-X-100 unlöslichen Proteinfraktion erfolgte in 96°C warmem Harnstoff-Lysepuffer mit Ultraschallbehandlung. Zur vollständigen Umsetzung wurden die Ansätze bei 96°C für 5min inkubiert. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des BCA-Tests (s. 3.2.6.1) bestimmt und die Konzentrationen der einzelnen Ansätze aneinander angeglichen. Anschließend erfolgte die Analyse über SDS-Page (s. 3.2.6.2) und Western-Blot (s. 3.2.6.8).

Spezielle Materialien:

PBS; *Cell Lifter*

Triton X-100-Lysepuffer:	50mM TRIS-HCl, pH 7,4, in H ₂ O 150mM NaCl 1mM CaCl ₂ 1% Triton X-100 0,04% Na-Azid
Protease-Inhibitoren:	1mM PMSF 1mM Benzamidin 10µg/ml Leupeptin 10µg/ml Aprotinin 20µM Na-Orthovanadat oder: eine Tablette „complete“ <i>protease inhibitor, EDTA free</i>
Harnstofflysepuffer:	62mM TRIS-HCl, pH6,8 in H ₂ O 8M Harnstoff
Harnstoff/SDS-Lysepuffer:	62mM TRIS-HCl, pH6,8 in H ₂ O 8M Harnstoff 2% SDS

3.2.6.7 Immunopräzipitation (IP)

Die Immunopräzipitation ist eine Methode zur spezifischen Anreicherung und Reinigung von Proteinen aus Lösungen mit Hilfe von Antikörpern. Gebildete Antikörper-

Proteinkomplexe können durch Kopplung an Sepharose-„beads“ aus den Lösungen isoliert und anschließend gewaschen werden.

Immunopräzipitationen wurden bei 4°C auf dem Überkopfschüttler durchgeführt. Zu den Triton X-100-Lysaten wurden 40-50µl gequollene Protein-A-Sepharose- oder Protein-G-Sepharose-„beads“ zusammen mit 5µg Antikörper gegeben und die Proteine über Nacht präzipitiert. Alternativ wurden in einigen Experimenten die Antikörper vor der IP an 50µl „beads“ in einem Kopplungsansatz von 600µl in Triton X-100 Lysepuffer für 1-2h bei 4°C (Überkopfschüttler) gekoppelt, abzentrifugiert und den Lysaten zugesetzt.

Nach der IP wurde die Sepharose zusammen mit den gebundenen Antikörper-Proteinkomplexen 4-5 mal in 1ml Lysepuffer gewaschen. Die präzipitierten Proteine wurden mit Hilfe der SDS-Page (s. 3.2.6.2) und des Western-Blots (s. 3.2.6.8) analysiert.

Spezielle Materialien:

Protein-A-Sepharose; Protein-G-Sepharose, spezifische Antikörper

3.2.6.8 Western-Blot

Der Western-Blot ist eine Methode zur Identifizierung der mit Hilfe der SDS-Page getrennten Proteine. Diese werden auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und von einem spezifischen Antikörper (primären Antikörper) erkannt. Mit einem sekundären Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet und mit einer enzymatischen Nachweiskomponente gekoppelt ist, kann die Proteinbande visualisiert werden.

„*Semi dry blot*“ – Für den Elektrotransfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran mit der „semi dry blot“-Apparatur wurden sowohl das SDS-Gel (s. 3.2.6.2) als auch 6 Blatt *Whatman*-Papier (0,4mm) und die Nitrozellulose mit „semi dry“-Transferpuffer äquilibriert. Das Gel wurde auf die Membran aufgelegt und von beiden Seiten mit 3 Blatt *Whatman*-Papier umgeben. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 5mA/cm² für 30min.

„*Wet blot*“ – Zur Nutzung der „wet blot“-Apparatur wurde das SDS-Gel auf die mit „wet blot“-Transferpuffer getränkte Membran gelegt und mit je einem Blatt entsprechend behandeltem *Whatman*-Papier (1,2mm) umgeben. Der Transfer erfolgte im „wet“-Transferpuffer bei einer Stromstärke von 250mA für 2h.

Nach dem Transfer wurden die Membranen zur Reduzierung von unspezifischer Antikörperanbindung 1h in BLOTTO + 0,04% NaN_3 bei RT geblockt und mit dem primären Antikörper für 1h bei RT inkubiert. Gereinigte Antikörper wurden in der Konzentration von 2-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oder nach Herstellerangaben in BLOTTO + 0,04% NaN_3 eingesetzt, Hybridomüberstände wurden im Verhältnis 1:2 mit BLOTTO verdünnt. Überschüssige primäre Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen in 50ml TBST für je 5min entfernt. Der peroxidasegekoppelte sekundäre Antikörper wurde in der Konzentration von 1 $\mu\text{g}/10\text{ml}$ in BLOTTO (ohne NaN_3) eingesetzt und für 1h bei RT auf die Membran gegeben. Nach dreimaligem Waschen in 50ml TBST für jeweils 10min wurden die Proteine mit Hilfe des *ECL*-Systems nach Herstellerangaben visualisiert.

Bei Verwendung des Phosphotyrosinantikörpers RC20H wurde die Membran anstatt mit BLOTTO mit 1% BSA in TBST für 1h bei 37°C geblockt. Der Antikörper wurde mit einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt und für 1h bei RT auf die Filter gegeben. Da der RC20H direkt an eine Peroxidase gekoppelt ist, entfiel die Inkubation mit einem sekundären Antikörper. Nach fünfmaligem Waschen in TBST für je 1min wurde die *ECL*-Reaktion nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Nitrozellulose-Membran eines Experimentes konnte für die Detektion verschiedener Proteine genutzt werden. Falls es die Molekulargewichte der Proteine und die Antikörperspezifitäten zuließen, wurde die Membran nach der ersten *ECL*-Entwicklung einmal in 50ml TBST gewaschen und erneut für 1h in BLOTTO + 0,04% Na-Azid geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem neuen primären und den sekundären Antikörpern wie oben beschrieben. War es notwendig, die Antikörper der ersten Inkubation zu entfernen, wurde die Membran in 0,2M Glycin (pH2,5) für 30min bei RT inkubiert und dreimal mit 50ml TBST gewaschen. Im Anschluss daran wurde die Membran geblockt und mit den neuen Antikörpern inkubiert. Zur Detektion der Markerproteine des *SDS Page Standard Broad range* wurden die Membranen für 30min in TBST gewaschen und für 5min mit *Ponceau S* gefärbt. Nach Entfärbung in H_2O wurden die Markerbanden abgeschnitten und getrocknet.

Spezielle Materialien:

ECLTM Hyperfilm; *ECLTM western blotting detection reagent*; 0,2 M Glycin, pH 2,5; 4% NaN_3 ; Nitrozellulose-Membran *Optitran BA-S85*; *Ponceau S*; *SDS Page Standard Broad range*; „semi dry blot“-Apparatur; TBST; TBST + 1% BSA; „wet blot“-Apparatur; 0,4mm *Whatman*-Papier GB002; 1,2mm *Whatman*-Papier GB005

BLOTTO:	TBST 4% Magermilchpulver +/- 0,04% NaN ₃
„wet“-Transferpuffer:	12,4mM TRIS-HCl, in H ₂ O 95,9mM Glycin
10x „semi dry“-Transferpuffer:	48mM TRIS-HCl, in H ₂ O 39mM Glycin 0,037% SDS

3.2.6.9 *In-vitro*-Analyse von Kinaseaktivitäten

Zur Analyse der Kinaseaktivitäten der hergestellten CSK-Mutanten (s. 3.1.12), wurden die entsprechenden cDNAs transient in COS7-Zellen transfiziert (s. 3.2.5.3.1). Nach der Triton-X-100-Lyse (s. 3.2.6.6) und Immunopräzipitation (s. 3.2.6.7) wurden die Antikörper-Proteinkomplexe zusammen mit den gekoppelten Sepharose-„beads“ für die Autophosphorylierung der Proteine mit radioaktiv markiertem ³²P-ATP eingesetzt. Nach der IP wurden die Komplexe zweimal in 1ml Triton-Lysepuffer, zweimal in 1ml TNE und einmal in 1ml Kinasepuffer gewaschen. Anschließend wurden sie in 50µl Kinasepuffer aufgenommen und mit 5,55MBq/ml [γ -³²P]ATP für 30min bei 30°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in 1ml TNE-Puffer wurden die Proteine durch SDS-Page (s. 3.2.6.2) und Autoradiographie (s. 3.2.6.4) analysiert.

Spezielle Materialien:

[γ -³²P]ATP; Triton X-100-Lysepuffer (s. 3.2.6.6)

Kinasepuffer:	50mM TRIS-HCl, pH7,5, in H ₂ O 7mM MgCl ₂ 5mM MnCl ₂ 1mM DTT
TNE-Puffer:	50mM TRIS-HCl, pH8,0, in H ₂ O 140mM NaCl 5mM EDTA

3.2.6.10 „Yeast Two Hybrid Screen“

Der „yeast two hybrid screen“ ist eine Methode zur Identifizierung von möglichen Interaktionspartnern eines Proteins aus einer Bank mit einer großen Anzahl an Proteinen. Ermöglicht wird dies durch die trennbaren, funktionell unabhängigen Domänen von eukaryotischen Transkriptionsfaktoren, die in die DNA-Bindungsdomäne und die Aktivierungsdomäne aufgeteilt werden können (Fields and Song, 1989; Schiestl and Gietz, 1989). Die nativen Transkriptionsfaktoren initiieren die Transkription der von ihnen regulierten Gene durch die RNA-Polymerase II jenseits der „upstream activation site“. Bei der rekombinanten Trennung beider Domänen kann die Transkription der jeweiligen Gene erst nach einer erneuten räumlichen Kopplung eingeleitet werden. Dieser Sachverhalt wird für den „yeast two hybrid screen“ genutzt, indem beide funktionelle Domänen mit den zu untersuchenden Proteinen kombiniert werden. Interagieren diese Proteine miteinander, werden die Domänen zusammengeführt, so dass ein Reportergen transkribiert wird und dessen Produkt analysiert werden kann. Wird eine der Domänen mit dem zu untersuchenden Protein („bait“) und die andere Domäne durch die Herstellung einer cDNA-Bank mit möglichst vielen Proteinen („prey“) kombiniert, können aus dieser Anzahl mögliche Bindungspartnern die spezifischen Partner isoliert werden.

Das in dieser Arbeit verwendete „yeast two hybrid“-System basiert auf dem *Clontech Matchmaker Two Hybrid System*-Protokoll (Clontech, Heidelberg) in Kombination mit einem modifizierten Protokoll nach Vojtek (Vojtek et al., 1993). Für den „screen“ wurde die DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors LexA an das zu untersuchende „bait“-Protein gekoppelt. Zur Herstellung dieses Fusionsproteins wurde der Expressionsvektor pBTM116 verwendet (s. 3.1.12), der neben dem „bait“-Protein auch für die TPR-Met-Kinase kodierte. Über den Einsatz dieser Kinase wurde eine effiziente *In-vivo*-Phosphorylierung der Proteintyrosinreste erreicht, die zur Erfassung von phosphorylierungsabhängigen Bindungen notwendig war. Die „prey“-Proteine wurden mit der Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors VP16 fusioniert. In dieser Arbeit wurde die so genannte „Hollenberg“-Bibliothek eingesetzt, die ca. 5×10^6 unterschiedliche cDNAs von 9,5-10,5 Tage alten Mausembryonen umfasst. Als Expressionsvektor für diese cDNA-Bank wurde der pVP16 (s. 3.1.12) verwendet (Hollenberg et al., 1995). Die beiden Konstrukte wurden in den Hefestamm *L40* transfiziert, der defizient für die Biosynthese der Aminosäuren Tryptophan, Leucin und Histidin ist.

In dem verwendeten System wurden zwei Reportergene zur Identifizierung positiver Klone verwendet: zur Selektion von positiven Klonen wurde das HIS3-Gen durch die Inkubation

der Hefen auf Medium ohne Histidin verwendet. Auf diesem Medium konnten nur die Hefen anwachsen, in denen der Transkriptionsfaktor durch eine Protein-Protein-Interaktion wieder funktionell war und sie so zur Bildung von Histidin befähigte. Zur Reduktion von positiven Klonen, deren Interaktion auf unspezifische Bindung zurückzuführen war, wurde die Histidinbiosynthese durch Zugabe von 3-Aminotriazol erschwert. Diese Substanz ist ein Inhibitor der Histidinbiosynthese und wirkt konzentrationsabhängig, so dass bei entsprechender Dosierung (s. „bait check“, 3.2.6.10.5) die Hefen nur bei starken Protein-Interaktionen anwachsen. Die anschließende Verifizierung des Ergebnisses wurde über das lacZ-Gen, das für das Enzym β -Galaktosidase kodiert, durchgeführt. Die Aktivität dieses Enzyms wurde über die Umsetzung des Substrates X-Gal und der damit eintretenden Blaufärbung der Kolonien analysiert (s. 3.2.6.10.7).

Die beiden übrigen Aminosäuren, für die *L40* defizient ist, wurden zur Selektion der mit den Plasmiden erfolgreich transfizierten Hefen verwendet. Der „bait“-Vektor ermöglichte den Hefen das Wachstum im Tryptophan-Mangelmedium über das Trp1-Gen, während der „prey“-Vektor mit Hilfe des Leu2-Gens und unter Verwendung von Leucin-Mangelmedium selektiert werden konnte.

Zur Identifizierung der möglichen Bindungspartner wurde die Plasmid-DNA aus den positiven Hefen isoliert (s. 3.2.6.10.8). Da bei der Isolierung ein Gemisch aus den Plasmiden vorlag, die für das „bait“-Protein und das „prey“-Protein kodieren, wurden diese durch die Transformation von Bakterien und anschließender Selektion für den „prey“-Vektor getrennt (s. 3.2.6.10.9). Die aus den Bakterien isolierten cDNA-Sequenzen konnten nach der Sequenzierung über den „blast search“ („National Center For Biotechnology Information“) identifiziert werden.

3.2.6.10.1 Aufzucht und Lagerung von Hefen

Der verwendete *Saccharomyces cerevisiae* Stamm *L40* (Vojtek et al., 1993) wurde auf YPD-Agarplatten ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Flüssigkulturen wurden in YPD-Medium bei 180rpm und 30°C kultiviert. Die Lagerung der Hefen erfolgte in 25% Glycerol bei -80°C.

Spezielle Materialien:

Glycerol

YPD-Medium, pH 5,8:	20g/l „Bacto-Pepton“, in H ₂ O 10g/l „Yeast“-Extrakt 2% Glucose
YPD-Agar:	YPD-Medium 20g/l „Bacto-Agar“

3.2.6.10.2 Herstellung von „Salmon-Sperm-Carrier-DNA“

Die „salmon-sperm-carrier-DNA“ wurde zur Erhöhung der Transformationseffizienz der Hefetransfektion verwendet (Schiestl and Gietz, 1989). 250mg der getrockneten „carrier“-DNA wurden in 25ml TE aufgenommen und über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Zur Zerkleinerung der DNA wurde die Lösung fünfmal auf- und abpipetiert und 5 x 5s mit Ultraschall behandelt, so dass die durchschnittliche Fragmentgröße der DNA ca. 7kb betrug. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroformextraktion durch Zugabe eines Volumens Phenol/Chloroformlösung. Der Ansatz wurde für 2min vorsichtig gemischt und bei 2500 x g für 10min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde zunächst erneut mit Phenol/Chloroform, dann mit reinem Chloroform extrahiert. Die DNA wurde in Ethanol gefällt (s. 3.2.2.2), mehrere Male in 70% Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde sie zur Hälfte des ursprünglichen Volumens in TE aufgenommen und auf die Konzentration von 10mg/ml eingestellt. Vor der Lagerung bei -20°C erfolgte die Denaturierung der DNA bei 96°C für 20min. Die Qualität wurde mit Hilfe einer Testtransformation bestimmt.

Spezielle Materialien:

Chloroform; Phenol; „Salm sperm DNA“: *Type III sodium salt von Salmon testis*; TE-Puffer

3.2.6.10.3 Transformation von Hefen

Zur Transformation wurden Hefen in Flüssigkultur angezogen. Bei untransformierten Hefen erfolgte die Anzucht in YPD-Medium, während bei transformierten Hefen das jeweilige „drop-out“-Medium (s. 3.2.6.10.4) verwendet wurde. Die verwendeten Ansätze für die Transformationen während der „small scale“-Transformation, des „bait checks“ und des „full scale screen“ sind der Tabelle 14 zu entnehmen. Die „small scale“-Transformation wurde für die erste Transformation der Hefen mit dem „bait“-Protein eingesetzt.

Die Starterkulturen wurden über Nacht bei 30°C und 180rpm angezogen. Die entsprechende Menge an Medium wurde mit der Starterkultur angeimpft, so dass die $OD_{600} = 0,3$ entsprach. Die Kultur wurde bei 30°C, 180rpm bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ kultiviert und 1000 x g für 5min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen einmal in H₂O gewaschen und in TE/LiAc aufgenommen. Zur Transformation wurden die Ansätze mit der „salmon-sperm-carrier“-DNA (s. 3.2.6.10.2) und der entsprechenden cDNA des zu transformierenden Konstruktes gemischt und mit der PEG/LiAc-Lösung versehen. Nach einer Inkubation von 30min bei 30°C und 180rpm wurde der Suspension DMSO (Endkonzentration: 10%) zugesetzt, für 15min bei 42°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach 5min Zentrifugation bei 4°C und 1000 x g wurden die pelletierten Hefen in TE aufgenommen und ausplattiert oder während des „bait check“ bzw. des „full scale screens“ in Flüssigkultur genommen.

Tabelle 14: Eingesetzte Volumina während der Hefentransformation

	„Small Scale“	„Bait Check“	„Full Scale Screen“
1. Starterkultur-Volumen	50ml	50ml	300ml
2. Kultur-Volumen	300ml	300ml	1000ml
3. Aufnahme in H ₂ O	150ml	150ml	500ml
4. Volumen an TE/LiAc	1,5ml	1,5ml	8ml
5. Kompetente Zellsuspension	0,1ml	1,0ml	8ml
6. cDNA des Konstrukts/„carrier“-DNA	0,1µg/0,1mg	20µg/2mg	295-594µg/20mg
7. PEG/LiAc	0,6ml	6ml	60ml
8. Endvolumen TE	0,5ml	1ml	10ml

Spezielle Materialien:

DMSO; „Salmon-sperm-carrier“-DNA; TE-Puffer

PEG/LiAc: 10mM TRIS-HCl, pH8, in H₂O
 40% PEG3350
 100mM LiAc
 1mM EDTA

TE/LiAc: 10mM TRIS-HCl, pH8, in H₂O
 100mM LiAc
 1mM EDTA

3.2.6.10.4 Selektion von Hefekulturen

Nach der Transfektion wurden die Hefen in Flüssigkultur oder auf Platten über synthetische „drop-out“-Medien (SD) selektioniert, um die positiven Klone zu analysieren. Die Tabelle 16 fasst die Medien für die jeweilige Selektion zusammen:

Spezielle Materialien:

Synthetische „drop-out“-Medien: 6,7g/l „Yeast N₂ Base“ in H₂O
 10% „drop-out“ Lösung (s. Tabelle 15)
 2% Dextrose

Tabelle 15: Synthetische „Drop-Out“-Lösungen (10x)

Aminosäure (mg/l in H ₂ O)	SD-T	SD-L	SD-TL	SD-TLH	SD-THULL
Isoleucin	300	300	300	300	300
Valin	1500	1500	1500	1500	1500
Adenin	200	200	200	200	200
Arginin	200	200	200	200	200
Histidin	200	200	200	-	-
Leucin	1000	-	-	-	-
Lysin	300	300	300	300	300
Methionin	200	200	200	200	200
Phenylalanin	500	500	500	500	500
Threonin	2000	2000	2000	2000	2000
Tryptophan	-	200	-	-	-
Tyrosin	300	300	300	300	300
Uracil	200	200	200	200	-

Tabelle 16: Verwendete Selektionsmedien

	Synthetische „Drop-Out“-Medien
Selektion der pBTM116 („bait“-) transformierten Zellen	w/o Tryptophan (SD-T)
Selektion der pVP16 („prey“-) transformierten Zellen	w/o Leucin (SD-L)
Selektion der pBTM116/pVP16 transformierten Zellen	w/o Tryptophan/Leucin (SD-TL)
Selektion der pBTM116/pVP16 transformierten Zellen mit positiven Protein-Interaktionen	w/o Tryptophan/Leucin/Histidin/Uracil/Lysin (SD-THULL)

3.2.6.10.5 „Bait Check“

Der „bait check“ wurde zur Reduzierung des Hintergrundes von falsch positiven Klonen in einem „yeast two hybrid screen“ durchgeführt. Falsch positive Klone können trotz Selektion wachsen, wenn sich unspezifische Transkriptionsfaktoren an das „bait“-Protein binden und eine Transkription auslösen oder wenn die Zellen in einer zu hohen Dichte plattiert werden, so dass die Hefen von bereits abgestorbenen Zellen die entsprechenden Aminosäuren aufnehmen. Für den „bait check“ wurden „bait“-transformierte Hefen eingesetzt und analog zu dem „full scale screen“ mit der „prey“-cDNA transformiert, allerdings in einem kleineren Volumen und mit 1/10 der später eingesetzten DNA-Menge. Die Transformation wurde analog zu Abschnitt 3.2.6.10.3 durchgeführt. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurde ein Aliquot abgenommen, in den Verdünnungen von 1:100 und 1:1000 auf SD-TL ausplattiert und für fünf Tage bei 30°C inkubiert. Die restlichen Zellen wurden in 50ml TE gewaschen, bei 1000 x g für 10min zentrifugiert und in 100ml SD-TLU aufgenommen. Es folgte eine Inkubation für 16h bei 180rpm und 30°C. Anschließend wurden die Zellen zweimal in 300ml TE bei RT gewaschen und in 1ml TE aufgenommen. Zur Bestimmung der Teilungsrate während der 16h Inkubation in SD-TLU wurde erneut ein Aliquot in den Verdünnungen von 1:100 und 1:1000 in dem gleichen Volumen wie zur Bestimmung der Transformationseffizienz ausplattiert und unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Die übrigen Zellen wurden in 78µl Aliquots auf SD-THULL mit 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15 und 20mM 3-Aminotriazol (3-AT) auf 90mm Platten ausplattiert und für fünf Tage bei 30°C inkubiert. Die 3-AT-Konzentration, bei der der Hintergrund der gewachsenen Hefekolonien deutlich reduziert war, wurde für den „full scale screen“ eingesetzt.

Die Teilungsrate wurde durch die Zellzahlen der gewachsenen Kolonien vor und nach der Inkubation mit SD-TLU bestimmt. Die Transformationseffizienz wurde mit folgender Formel anhand der Anzahl der gewachsenen Kolonien ermittelt:

$$\text{Effizienz} = (\text{Kolonien} \times V_{\text{ges}}[\mu\text{l}]) / (V_{\text{plattiert}}[\mu\text{l}] \times \text{Verdünnung} \times \text{DNA}[\mu\text{g}])$$

mit V_{ges} = Volumen des Traf.-Ansatzes; $V_{\text{plattiert}}$ = ausplattiertes Volumen.

3.2.6.10.6 „Full Scale Screen“

Die eigentliche Suche nach Protein-Proteinbindungspartnern erfolgte im „full scale screen“. Technisch wurde dieser „screen“ analog zu dem „bait check“ durchgeführt, aller-

dings enthielten die Transformationsansätze die zehnfache Menge an cDNA der „prey“-Bibliothek und bestanden aus größeren Volumina (s. Tabelle 14). Die Transformationseffizienz und die Teilungsrate während der SD-TLU Inkubation wurden analog zum „bait check“ bestimmt. Anhand der Transformationseffizienz konnte abgeschätzt werden, ob alle unabhängigen Klone der cDNA-Bank durch den „screen“ statistisch erfasst wurden.

Nach erfolgter Transformation wurden die Zellen in 500ml TE bei RT gewaschen und für 16h in 1l SD-TLU bei 30°C, 180rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in 450ml TE gewaschen, in 9ml TE aufgenommen und in 40 Aliquots à 220µl auf 150mm Platten mit SD-THULL + 10mM 3-AT ausplattiert. Die Inkubation auf dem Selektionsmedium erfolgte für sieben Tage bei 30°C unter täglicher Kontrolle der gewachsenen Kolonien. Die Kolonien mit einem guten Wachstum wurden auf neue SD-THULL + 5, 7,5, 10mM 3-AT ausgestrichen und erneut drei Tage bei 30°C inkubiert. Zur Verifizierung der positiven Klone wurden die Zellen dem β-Galaktosidasetest unterzogen.

3.2.6.10.7 β-Galaktosidasetest

Der β-Galaktosidasetest nutzt das LacZ-Gen als zweites Reportergen des verwendeten „yeast two hybrid“-Systems nach Vojtek (Vojtek et al., 1993) zur Bestätigung der bisherigen Ergebnisse. Die angewachsenen Hefekolonien wurden von einer 150mm Platte auf sterile *Whatman*-Filter übertragen, indem die Filter kurzzeitig auf die Platte aufgelegt wurden. Anschließend wurden die Filter in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einer Petrischale erneut aufgetaut. Neue Filter wurden mit der Reaktionslösung aus 100ml Z-Puffer, 270µl β-Mercaptoethanol und 1,67ml X-Gal-Lösung getränkt. Auf diese wurden die aufgetauten Filter mit den Hefekolonien aufgelegt und bei RT für 2h unter ständiger Kontrolle der Blaufärbung der Hefekolonien inkubiert.

Spezielle Materialien:

β-Mercaptoethanol; *Whatman*-Filter

X-Gal-Lösung: 20mg/ml X-Gal
 in Dimethylformamid

Z-Puffer, pH7: 113mM Na₂HPO₄, in H₂O
 39,9mM NaH₂PO₄
 10,0mM KCl
 998µM MgSO₄

3.2.6.10.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen

Die positiven Hefe-Klone wurden in 6ml Selektionsmedium bis zur Sättigung (nach ca. 30h) bei 30°C und 180rpm kultiviert und die Kultur bei 1000 x g für 5min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200µl Selektionsmedium aufgenommen und mit 200µl Hefelysepuffer versetzt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Zusatz von 400µl Phenol/Chloroform/Isopropanol (25:24:1), 0,3g „acid washed glass beads“ und kräftigem Schütteln für 2min. Anschließend wurden die Ansätze für 15min bei 10.000 x g und RT zentrifugiert und die Plasmid-DNA mit Ethanol aus der wässrigen Phase gefällt (s. 3.2.2.4). Nach dem Trocknen bei RT wurde die DNA in 20µl H₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Spezielle Materialien:

Chloroform; Isopropanol; Phenol; „Acid washed glass beads“, 425-600µM

Hefelysepuffer: 10mM TRIS-HCl, pH8, in H₂O
 2% Triton X-100
 1% SDS
 100mM NaCl
 1mM EDTA

3.2.6.10.9 Selektion des „Prey“-Plasmids über *E. coli HB101*

In der isolierten Plasmid-DNA der Hefen lag ein Gemisch der transfizierten Plasmide vor, die für das „bait“-Protein und das „prey“-Protein kodieren. Zur Isolierung der „prey“-Plasmide wurde der *E. coli*-Stamm *HB101* mit 2µl des DNA-Gemisches transformiert (s. 3.2.3.2) und mit Hilfe des Leucin-„drop-out“-Selektionsmediums für den „prey“-Vektor auf Agarplatten selektiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA aus den Bakterien isoliert (s. 3.2.2.1) und das enthaltene „insert“ sequenziert (s. 3.2.4).

Spezielle Materialien:

M9 -L Medium: 1x M9 Salze
 1x SD-L-Lösung (s. Tabelle 15)
 2mM MgSO₄
 4% Dextrose
 0,1mM CaCl₂
 1mM Thiamin-HCl
 40mg/l Prolin
 50µg/ml Ampicillin

M9-Salze (5x): 64g/l NaHPO₄
 15g/l KH₂PO₄
 2,5g/l NaCl
 5g/l NH₄Cl

4 Ergebnisse

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand in der Identifikation von VE-Cadherin assoziierten Proteinen, die einen regulativen Einfluss auf dessen Funktionen aufweisen. Die Arbeit begann mit der Durchführung von „yeast two hybrid screens“, die zu der Identifikation einer zytosolischen Kinase als möglichen Interaktionspartner von VE-Cadherin führten. Die Interaktion der beiden Proteine wurde biochemisch mit Hilfe von *In-vitro*-Interaktionsexperimenten und Koimmunopräzipitationen aus bEND.3-, transfizierten COS7- und CHO-Zell-Lysaten charakterisiert. Die Untersuchung der Fragestellung, in welchem Umfang die Kinase an der Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin beteiligt ist, erfolgte mit Hilfe verschiedener Kinase-Mutanten. Immunzytochemische Färbungen visualisierten die Kolo-kalisierung der beiden Proteine in den Zellen. Mit Hilfe von Permeabilitätsexperimenten wurde der Einfluss der Assoziation auf die Stabilität der Zell-Zellkontakte untersucht, während die Bildung von Zell-Zellkontakten über Aggregationsexperimente analysiert wurde. Die Bedeutung der Bindung auf die Proliferationsfähigkeit von Zellen konnte mit Hilfe von Proliferationsexperimenten untersucht werden.

4.1 Identifikation von CSK als VE-Cadherin assoziiertes Protein mit Hilfe des „Yeast Two Hybrid“-Systems

Zur Identifizierung intrazellulär assoziierter Proteine von VE-Cadherin wurde das „yeast two hybrid“-System verwendet. Als „bait“-Protein wurde die C-terminal um zwanzig Aminosäuren verkürzte zytosolische Domäne (Aminosäuren 621-764) von murinem VE-Cadherin eingesetzt. Die vollständige zytosolische Domäne konnte wegen der Erzeugung eines starken Hintergrundes von falsch positiven Klonen in diesem System nicht genutzt werden (persönliche Mitteilung von Dr. Klaus Ebnert). Das eingesetzte „two hybrid“-System basiert auf der LexA DNA-Bindungsdomäne innerhalb des „bait“-Fusionsproteins und ermöglicht eine *In-vivo*-Dimerisierung der „bait“-Proteine (Vojtek et al., 1993). Der Expressionsvektor pBTM116/TPR-Met kodiert zusätzlich für die TPR-Met Kinase, die ein weiterer Bestandteil des exprimierten Fusionsproteins und N-terminal vor dem zu untersuchenden „bait“-Protein lokalisiert ist. Durch die intrinsische Kinase können die „bait“-Proteine effizient an den Tyrosinresten phosphoryliert werden. Darüber ist auch die Identifikation von phosphorylierungsabhängigen Interaktionspartnern möglich.

Mit dem murinen VE-Cadherin als „bait“-Protein wurde die „prey“-cDNA-Bibliothek von 9,5 bis 10,5 Tage alten Mausembryonen mit ca. 5×10^6 unabhängigen Klonen untersucht. Die Bibliothek befand sich in dem „prey“-Expressionsvektor pVP16 (Hollenberg et al., 1995). Sowohl das „bait“-Plasmid als auch die „prey“-Plasmide wurden in den *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm *L40*, der defizient für die Histidinbiosynthese ist, kotransfiziert. In den Hefezellen, in denen das „bait“-Protein mit einem „prey“-Protein interagiert, wurden zwei Reportergene aktiviert, deren Produkte analysiert werden konnten. Einerseits ermöglichte die Expression des HIS3-Gens den ursprünglich Histidin defizienten Hefen das Wachstum auf Histidin-Mangelmedium, andererseits konnte die Expression des LacZ-Gens über den β -Galaktosidasetest durch Blaufärbung der Hefekolonien angezeigt werden.

„Bait check“ – Der „bait check“ wurde vor dem „full scale screen“ zur Überprüfung der Transformationseffizienz und zur Reduzierung des Hintergrundes durch die Titration mit dem Histidin-Biosynthese-Inhibitor 3-Aminotriazol durchgeführt. Die „bait“-transformierten Hefen wurden in einem kleineren Ansatzvolumen und mit 1/10 bzw. 1/20 der im „full scale screen“ eingesetzten „prey“-cDNA-Bibliothek transformiert und auf SD-THULL Platten (Aminosäure-Mangelmedium) mit den 3-Aminotriazol-Konzentrationen von 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 15 und 20mM ausplattiert. Die Transformationseffizienz wurde durch die Anzahl der angewachsenen Klone nach der Selektion auf die transformierten „bait“- und „prey“-Expressionsvektoren über SD-TL Platten ermittelt.

Mit einem Wert von $2,36 \times 10^4$ Klone/ μ g eingesetzter DNA war die Effizienz ausreichend, um während des späteren „full scale screen“ statistisch alle unabhängigen Klone der cDNA Bank zu erfassen. Die 3-AT-Titration der Hefen zeigte, dass durch die Zugabe von 2mM und 10mM 3-AT der Hintergrund von falsch positiv anwachsenden Hefen deutlich reduziert werden konnte.

„Full scale screen“ – In den drei durchgeführten „full scale screens“ wurden die mit dem „bait“-Plasmid transfizierten Hefen mit 295 μ g und 595 μ g der „prey“-cDNA Bibliothek transfiziert und zunächst über Nacht zur Erhöhung der Selektionsresistenz in SD-TLU Flüssigmedium inkubiert. Während dieser Inkubation konnten sich die Klone vermehren, so dass ein mehrfaches Auftreten bestimmter Klone nach der Selektion nicht unbedingt auf unabhängige Transformationsereignisse zurückzuführen war. Die Teilungsrate wurde durch das Ausplattieren von entsprechenden Aliquots vor und nach der Inkubation auf SD-TL Platten durch die Zählung der angewachsenen Kolonien bestimmt. Neben der Teilungs-

rate wurden ebenfalls die Transformationseffizienz und die statisch ermittelte Zahl an unabhängigen Transformationen ermittelt. Die nach der Selektion auf SD-THULL + 2mM oder 10mM 3-AT angewachsenen Kolonien wurden zur weiteren Selektion auf SD-THULL Platten mit 2,5, 5, 7,5 und 10mM 3-AT ausgestrichen und dem β -Galaktosidasetest unterzogen. Aus den Kolonien, die sowohl auf hohen 3-AT Konzentrationen anwuchsen, als auch im β -Gal-Test positiv waren, wurde die Plasmid-DNA isoliert. Nach der Transformation von *E. coli HB101* mit der cDNA und der Isolierung der „prey“-Vektoren aus den Bakterien wurde die cDNA der potenziellen Bindungspartner von VE-Cadherin sequenziert. Die eingesetzte „prey“-cDNA-Menge für die Hefetransformation und die zur ersten Selektion verwendete 3-AT-Konzentrationen sind neben den Ergebnissen der Selektion bzw. der β -Gal-Tests in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Zusammenfassung der durchgeführten „Full Scale Screens“

	„Screen“ 1	„Screen“ 2	„Screen“ 3
„prey“-cDNA	295 μ g	594 μ g	594 μ g
3-AT-Konzentration während der Selektion	10mM	2mM	2mM
Transf. effizienz [Kol/ μ g DNA]	1,39 x 10 ⁴	1,28 x 10 ⁴	7,94 x 10 ⁴
Statistische Anzahl transformierter Hefen	4,10 x 10 ⁶	7,57 x 10 ⁶	4,73 x 10 ⁷
Teilungsrate während SD-TLU-Inkubation	1-2	1-2	1
Anzahl positiver Klone auf SD-THULL	3	48	24
Anzahl positiver Klone auf 2 bis 10mM 3-AT	3	28	21
Anzahl positiver Klone im β -Gal-Test	3	48	24
Anzahl sequenzierter Klone	3	29	21

Nach den Sequenzierungen wurden die 53 erhaltenen Sequenzen aller durchgeführten „screens“ mit Hilfe der Software *SeqMan* (DNASTAR Lasergene Software) zunächst von den Sequenzen des Expressionsvektors bereinigt und auf eine Übereinstimmung überprüft. Anschließend erfolgte die Identifizierung der Sequenzen über den „blast search“ des „National Center For Biotechnology Information“. Die Tabelle 18 fasst die identifizierten Proteine und deren Homologie auf DNA-Ebene zu den analysierten Sequenzen zusammen.

Tabelle 18: Potenzielle „Prey“-Proteine für VE-Cadherin

Anzahl der Klone	Protein/Spezies	NCBI-Accession-Nr.	Homologie Seq./NCBI
10	Snrp70/Maus	NM_009224.1	300/303 (99%)
6	S-adenosylhomocysteine Hydrolase (Ancy)/Maus	NM_016661.1	548/554 (98%)
3	Paired Box Gene 3 (Pax3)/Maus	NM_008781.1	370/371 (99%)
2	Midkine (Mdk)/Maus	NM_010784.1	292/297 (98%)
2	PAC Clone pDJ593b2/Mensch	AC006599.2	458/131 (95%)
1	„C-terminal-Src-Kinase“ (CSK)/Maus	NM_00783.1	437/443 (98%)
1	α -Enolase/Maus	X52379.1	377/388 (97%)
1	Fibrillin2 (Fbn2)/Maus	NM_010181.1	329/340 (96%)
1	β -1,4-Galaktosyltransferase/Maus	D37791.1	435/440 (98%)
1	Heat-shock Protein (Hsp84)/Maus	M36829.1	464/471 (98%)
1	Hypothetisches Protein FLJ20015/Mensch	XM_00620.2	275/323 (85%)
1	Hypothetisches Protein FLJ10350/Mensch	XM_01968.1	119/138 (86%)
1	Mfat1/Maus	AJ250768.1	228/231 (98%)
1	Pcna1/Maus	NM_011045.1	111/114 (97%)
1	Protein Phosphatase 5 (PP5)/Maus	AF018262.1	482/487 (98%)

Für die übrigen zwanzig überprüften Sequenzen ergab der „blast search“ entweder nur Übereinstimmungen von nicht relevanten, sehr kurzen Sequenzabschnitten, oder die Sequenzen stimmten mit den komplementären cDNA-Strängen der identifizierten Proteine überein. In beiden Fällen wurden diese nicht in Tabelle 18 aufgeführt.

Da die Suche nach VE-Cadherin assoziierten Proteinen unter der Vorgabe einer regulatorischen Funktion dieser Interaktion durchgeführt wurde, waren von den identifizierten Proteinen zwei von besonderem Interesse: die Protein-Phosphatase 5 (PP5) und die „C-terminal-Src-Kinase“ (CSK). Beide Proteine können in ihrer Funktion als Tyrosin-Kinase bzw. Serin-/Threonin-Phosphatase Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad von VE-Cadherin nehmen. Zu näheren, theoretischen Untersuchungen dieser Proteine wurden die gefundenen Sequenzen mit Hilfe des „Swiss Institute For Experimental Cancer Research“ einem „profil scan“ (www.isrec.isb-sib.ch) unterzogen, der die strukturellen Besonderheiten und Domänen analysierte.

Die gefundene cDNA-Sequenz von PP5 umfasst den kodierenden Bereich der Aminosäuren (AS) 11-171 des Proteins, die eine TPR-Met bindende Domäne (AS 28-129) beinhalten. In Anbetracht der im „two hybrid screen“ zur *In-vivo*-Phosphorylierung verwendeten

TPR-Met Kinase ist diese Sequenz jedoch als Artefakt des eingesetzten Systems und nicht als spezifischer Bindungspartner von VE-Cadherin anzusehen.

Die analysierte Sequenz der „C-terminal Src Kinase“ hingegen umfasst den kodierenden Bereich der Aminosäuren 57 bis 204, die neben den wenigen Aminosäuren der SH3-Bindungsdomäne (AS 57-70) und der katalytischen Domäne (AS 195 bis 204) die vollständige SH2-Bindungsdomäne (AS 82-171) enthalten. Diese SH2-Bindungsdomäne bindet, abhängig von der Phosphorylierung des Tyrosins, an definierte Aminosäuresequenzen (Songyang et al., 1994). Die Bindung von CSK an VE-Cadherin wurde der zentrale Bestandteil der weiteren Arbeit.

4.2 Klonierung von CSK_{wt} aus bEND.3-Zellen

Zur eingehenden Untersuchung der CSK-VE-Cadherin-Assoziation war es notwendig, das vollständige und funktionsfähige CSK herzustellen. Die Klonierung von CSK_{wt} erfolgte mit Hilfe der RT-PCR aus der murinen Endotheliom-Zell-Linie bEND.3. Zunächst wurde unter der Verwendung von Oligo dT-Oligonukleotiden eine cDNA-Bibliothek hergestellt, aus der mit CSK-spezifischen Oligonukleotiden die kodierende Sequenz von CSK mit Hilfe der Pfu-PCR amplifiziert wurde. Die vollständige, veröffentlichte cDNA von CSK (NCBI-Accession-Nummer: NM_007783) umfasst 2292 Nukleotide mit einem „open reading frame“ (ORF) zwischen den Positionen 249-1601. Die cDNA des ORFs (Positionen 249-1601) wurde in den eukaryotischen Expressionsvektor pKE081myc-#2 kloniert.

Die mit Hilfe der DNA-Sequenzierung überprüfte Aminosäuresequenz stimmt vollständig mit der bei NCBI veröffentlichten CSK-Sequenz überein (Abbildung 2

) und kodiert für murines CSK mit 450 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 50,8 kD. Das von dem Expressionsvektor pKE081myc-#2 exprimierte Protein (im Weiteren bezeichnet als CSK_{wt}) beinhaltet zusätzlich einen Myc-Tag von 10 Aminosäuren und weitere 9 Aminosäuren im Übergang, so dass dieses Protein die Größe von 52kD aufweist. Der „profil scan“ bestätigte die Strukturierung von CSK in drei funktionelle Domänen (Nada et al., 1991): 1. die SH3-Bindungsdomäne (AS 9-70), 2. die SH2-Bindungsdomäne (AS 82-171), 3. die katalytische Domäne (AS 195-449).

Der Vergleich zwischen dem humanen und dem murinen CSK zeigt für diese Kinase eine hoch konservierte Aminosäuresequenz zwischen den beiden Spezies. In dem 450 Aminosäuren umfassenden Protein weichen vier Aminosäuren an den Positionen 123, 159, 429 und 432 voneinander ab. Dieses entspricht einer Sequenzhomologie von 99,1%.

```

1. MSAIQAAWPSGTECIAKYNFHGTAEQDLFFCKGDVLTIVAVTKDPNWKAKNKVGVREGIIPANYVQKREGVKAGTKLSLMPWFHGKITRE 90
2. MSAIQAAWPSGTECIAKYNFHGTAEQDLFFCKGDVLTIVAVTKDPNWKAKNKVGVREGIIPANYVQKREGVKAGTKLSLMPWFHGKITRE
3. MSAIQAAWPSGTECIAKYNFHGTAEQDLFFCKGDVLTIVAVTKDPNWKAKNKVGVREGIIPANYVQKREGVKAGTKLSLMPWFHGKITRE

1. QAERLLYPPETGLFLVRESTNYPGDYTLCVSCDGGKVEHYRIMYHASKLSIDEVYFENLMQLVEHYTSDADGLCTRLIKPKVMEGTVAAG 180
2. QAERLLYPPETGLFLVRESTNYPGDYTLCVSCEGKVEHYRIMYHASKLSIDEVYFENLMQLVEHYTTDADGLCTRLIKPKVMEGTVAAG
3. QAERLLYPPETGLFLVRESTNYPGDYTLCVSCEGKVEHYRIMYHASKLSIDEVYFENLMQLVEHYTTDADGLCTRLIKPKVMEGTVAAG

1. DEFYRSGWALNMKELKLLQTIGKGEFGDVMLGDYRGNKVAVKCIKNDATAQAFLAEASVMTQLRHSNLVQLLGVIVVEEKGGLYIVTEYMA 270
2. DEFYRSGWALNMKELKLLQTIGKGEFGDVMLGDYRGNKVAVKCIKNDATAQAFLAEASVMTQLRHSNLVQLLGVIVVEEKGGLYIVTEYMA
3. DEFYRSGWALNMKELKLLQTIGKGEFGDVMLGDYRGNKVAVKCIKNDATAQAFLAEASVMTQLRHSNLVQLLGVIVVEEKGGLYIVTEYMA

1. KGSLVDYLRSRGRSVLGGDCLLKFSLDVCEAMEYLEGNNFVHRDLAARNVLVSEDNVAKVSDFGLTKEASSTQDTGKLPVKWTAPEALRE 360
2. KGSLVDYLRSRGRSVLGGDCLLKFSLDVCEAMEYLEGNNFVHRDLAARNVLVSEDNVAKVSDFGLTKEASSTQDTGKLPVKWTAPEALRE
3. KGSLVDYLRSRGRSVLGGDCLLKFSLDVCEAMEYLEGNNFVHRDLAARNVLVSEDNVAKVSDFGLTKEASSTQDTGKLPVKWTAPEALRE

1. KKFSTKSDVWSFGILLWEIYSFGRVPYPRIPLKDVVPRVEKGYKMDAPDGCPPAVYEVMKNCWHLDAAMRSFLQLREQLEHIKTHELHL 450
2. KKFSTKSDVWSFGILLWEIYSFGRVPYPRIPLKDVVPRVEKGYKMDAPDGCPPAVYEVMKNCWHLDAATRPFLQLREQLEHIKTHELHL
3. KKFSTKSDVWSFGILLWEIYSFGRVPYPRIPLKDVVPRVEKGYKMDAPDGCPPAVYEVMKNCWHLDAATRPFLQLREQLEHIKTHELHL

```

Abbildung 2: Sequenzvergleich von CSK. 1. *Humanes CSK (NCBI-Acc.: NM_004383)*, 2. *Murines CSK (NCBI-Acc.: NM_007783)*, 3. *DNA-sequenziertes CSK aus bEND.3-Lysaten*. Die vier voneinander abweichenden Aminosäuren zwischen humanem und murinem CSK sind rot dargestellt.

4.3 Herstellung von stabil transfizierten CHO-Zell-Linien

Für die Durchführung der biochemischen und funktionellen Analysen wurden stabil transfizierte CHO-Zell-Linien (dhfr⁻) hergestellt, die konstitutiv entweder VE-Cadherin_{wt} oder VE-Cadherin_{Y685F} (vgl. 4.4) zusammen mit induzierbarem CSK_{wt} exprimierten. Zur endogenen, spezifischen Phosphorylierung von VE-Cadherin wurde jeweils ein Klon der erhaltenen Zellen zusätzlich mit Flk-1 transfiziert.

4.3.1 Herstellung von VE-Cadherin_{wt}, VE-Cadherin_{Y685F} und CSK_{wt} exprimierenden Zellen

Zur Expression von CSK_{wt} wurde das *GeneSwitchTM System* (Invitrogen) verwendet, das die Induktion der Expression mit Hilfe des synthetischen Steroids Mifepristone gewährleistet. Nach der Bindung von Mifepristone an ein zusätzlich transfiziertes Regulatorprotein (vgl. 3.2.5.4) wird dieses als künstlicher Transkriptionsfaktor aktiv, so dass CSK_{wt} Mifepristone abhängig exprimiert wird. Als Ausgangs-Zell-Linie für die Herstellung der VE-Cadherin_{wt}/CSK_{wt} exprimierenden Zellen wurde eine bereits stabil mit VE-Cadherin_{wt}

transfizierte Zell-Linie (Gotsch et al., 1997) verwendet und mit dem induzierbaren CSK_{wt} transfiziert. Zur Herstellung der VE-Cadherin_{Y685F}/ CSK_{wt} exprimierenden Zellen wurden CHO-Zellen mit VE-Cadherin_{Y685F} und induzierbaren CSK_{wt} kotransfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen mit Hilfe von Selektionsantibiotika selektiert (G418 für VE-Cadherin-Konstrukte, Zeocin für CSK_{wt} in pGene/V5-His und Hygromycin für pSwitch) und die Zellklone vereinzelt kultiviert. Die Herstellung von VE-Cadherin_{wt} und CSK_{wt} exprimierenden Zellen ergab mehr als dreißig unabhängige Klone, von denen zwei Klone im Weiteren zur Subklonierung verwendet wurden. Nach der doppelten Transfektion der CHO-Zellen mit VE-Cadherin_{Y685F} und CSK_{wt} konnten nur sechs unabhängige Klone isoliert werden, von denen ebenfalls zwei Klone subkloniert wurden. Die Expression der VE-Cadherin-Konstrukte in den erhaltenen Klonen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert, während die Expression von CSK_{wt} anhand von Gesamt-Zell-Lysaten (Harnstoff-SDS-Lyse) nach der Induktion mit Mifepristone für 15h im Western-Blot kontrolliert wurde. Zur Herstellung der Harnstoff-SDS-Lysate wurden ca. $3,3 \times 10^6$ Zellen (Zellzahl einer konfluenten 30mm-Schale) eingesetzt. Die Immunoblots zeigen die mit Hilfe des α Myc-Antikörpers analysierte Proteinmenge des exprimierten CSK_{wt}, dessen spezifische Bande bei 52kD detektiert wird.

Aufgrund der großen Anzahl der erhaltenen Klone sind in Abbildung 3 die Analysen der Klone dargestellt, die zu einem späteren Zeitpunkt subkloniert wurden. Die FACS-Analysen der VE-Cadherin_{wt} und CSK_{wt} transfizierten Klone (Abbildung 3A) belegen, dass beide Klone VE-Cadherin exprimieren. Die Expression dieses Proteins erfolgt in den einzelnen Zellen jedes Klons in annähernd gleicher Stärke. Allerdings unterscheidet sich die Signalstärke der FACS-Analyse zwischen beiden Klonen. Das Signal für VE-Cadherin ist in dem Klon 20 um den Faktor 10 gegenüber dem in Klon 29 erhöht. Da die direkte Übertragung dieses Faktors auf den Proteingehalt ohne vorangegangene Kalibrierung nicht möglich ist, bleibt festzuhalten, dass die VE-Cadherin-Expression des Klons 29 gegenüber der Expression in Klon 20 reduziert ist. Die homogene Expression von VE-Cadherin des Klons 3 der VE-Cadherin_{Y865F} und CSK_{wt} transfizierten Zellen (Abbildung 3B) entspricht derjenigen des Klons 20 der VE-Cadherin_{wt} transfizierten Zellen. Im Gegensatz dazu besteht der Klon 2 aus einer Mischkultur. Ein geringer Teil der Zellen exprimiert das transfizierte Konstrukt, während der Großteil der Zellen entweder wenig oder kein VE-Cadherin_{Y685F} exprimiert.

Die in beiden durchgeführten Transfektionsansätzen hergestellten Klone weisen nach 15h Induktion unterschiedliche Mengen an exprimiertem CSK_{wt} auf. Die CSK-Expression des Klons 20 der VE-Cadherin_{wt} transfizierten Zellen ist vergleichbar mit derjenigen des Klons 3, der mit VE-Cadherin_{Y685F} transfiziert wurde. Die Klone 2 und 29 weisen ebenfalls untereinander vergleichbare Mengen an CSK_{wt} auf, allerdings ist in diesen Klonen die Expression in Bezug auf die Klone 3 und 20 reduziert.

Subklonierung – Für den Erhalt von Zell-Linien, die auf einen einzigen Klon zurückgeführt werden können, wurden jeweils zwei der isolierten Klone pro durchgeführter Transfektion subkloniert. Für die VE-Cadherin_{wt}/CSK_{wt} exprimierenden Zellen wurden die Klone 20 und 29 und für die VE-Cadherin_{Y685F}/CSK_{wt} exprimierenden Zellen die Klone 2 und 3 verwendet. Die Klone wurden so ausgewählt, dass jeweils ein stärkerer und ein schwächerer Produzent von CSK_{wt} berücksichtigt wurden. Die Expression von VE-Cadherin wurde wiederum mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Die Kontrolle der Expression des induzierbaren CSK_{wt} erfolgte nach einer Kinetik der Mifepristone-Induktion im Western-Blot.

Anhand der FACS-Analysen kann in allen Subklonen auf eine nahezu homogene Expression der VE-Cadherin-Konstrukte geschlossen werden (Abbildung 4). Die gebildete Proteinmenge der einzelnen Klone ist nahezu identisch. Mit zunehmender Dauer der Mifepristone-Induktion nimmt in allen vier dargestellten Zell-Linien die Intensität der spezifischen CSK_{wt}-Proteinbande (52kD) zu, wobei der stärkste Anstieg der gebildeten Proteinmenge in der Zeitspanne zwischen 0 und 10h stattfindet. In dem Zeitraum zwischen 10 und 15h nimmt die detektierte CSK-Menge nur noch gering zu. Analog zu den CSK-Expressionen der „Mutterklone“ (vgl. Abbildung 3) ist die exprimierte Menge an CSK in den Subklonen 20,9 und 3,30 gegenüber derjenigen in den Klonen 2,24 und 29,5 erhöht.

4.3.2 Herstellung von Flk-1, VE-Cadherin_{wt}, VE-Cadherin_{Y685F} und CSK_{wt} exprimierenden Zellen

Zur Herstellung Flk-1 (VEGF-R2) exprimierender Zellen wurden Klon 20,9 der VE-Cadherin_{wt}/CSK_{wt} und Klon 3,30 der VE-Cadherin_{Y685F}/CSK_{wt} transfizierten Zellen mit Flk-1 (VEGF-R2 in pEF6) stabil transfiziert. Nach der Selektion mit Blasticidin wurden die isolierten Klone in der Durchflusszytometrie und im Western-Blot analysiert (vgl. 4.3.1). Zur Überprüfung des möglichen Einflusses der CSK_{wt}-Induktion auf die Expressionen von VE-Cadherin sowie Flk-1, wurden sowohl induzierte als auch nicht induzierte

Zellen zur FACS-Analyse eingesetzt. Die Expression von CSK_{wt} erfolgte wiederum im Western-Blot nach 15h Induktion mit Mifepristone. Die Expression von Flk-1 ist in allen untersuchten Klonen sowohl in Bezug auf die exprimierte Menge als auch auf die Homogenität der Expression in den einzelnen Zellen nahezu identisch (Abbildung 5). In Klon 20,9F12 der VE-Cadherin_{wt}- und Klon 3,30F23 der VE-Cadherin_{Y685F} transfizierten Zellen ist die VE-Cadherin-Expression gegenüber den anderen Klonen etwas reduziert. Die Klone 209F15, 209F19, 3,30F19 und 3,30F22 weisen nahezu identische Expressionsmengen dieses Proteins auf.

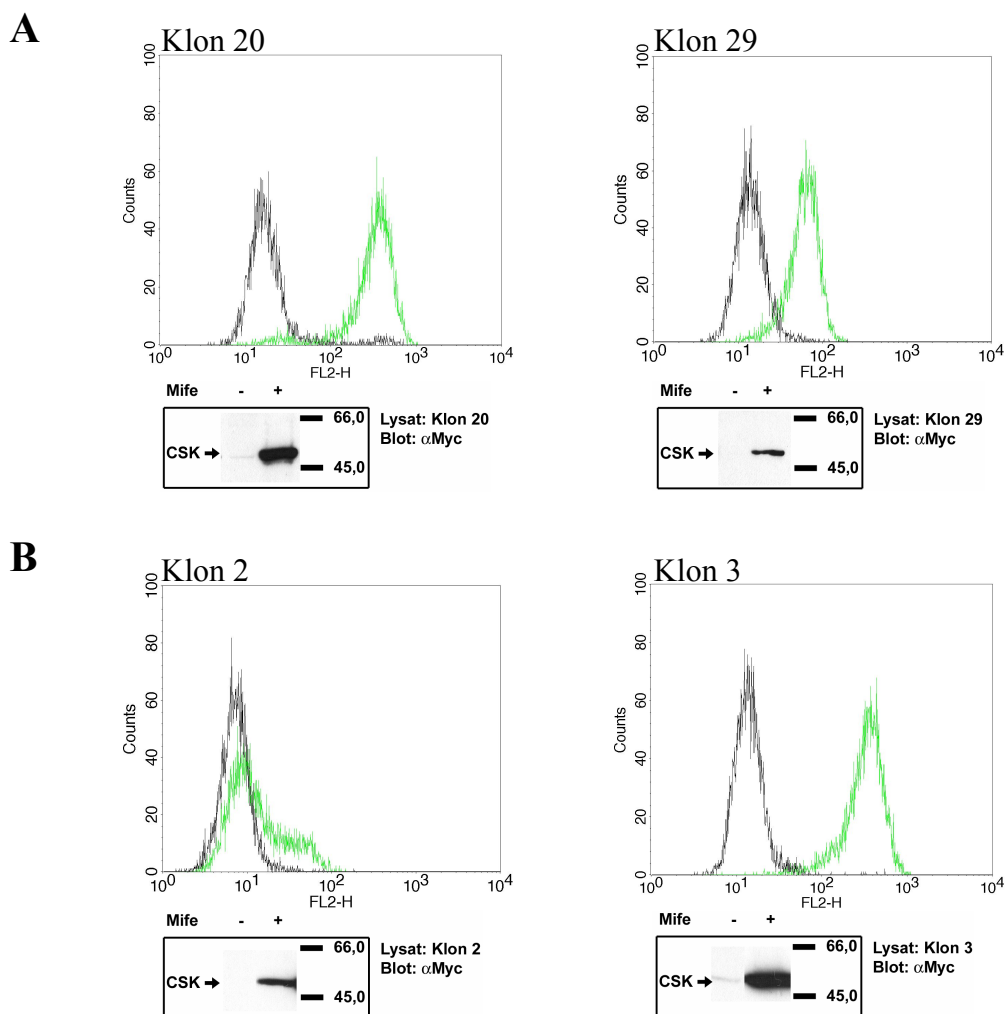


Abbildung 3: Charakterisierung der stabil transfizierten CHO-Mutterklone. Die Expression von VE-Cadherin_{wt} bzw. VE-Cadherin_{Y685F} in den transfizierten CHO-Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie überprüft. Schwarz: Isotyp-Kontrolle, Grün: VE-Cadherin. Die CSK_{wt}-Expression wurde über Western-Blots aus Harnstoff-SDS-Lysaten nach 15h Induktion mit Mifepristone analysiert. **A:** VE-Cadherin_{wt}/CSK_{wt} transfizierte Klone. **B:** VE-Cadherin_{Y685F}/CSK_{wt} transfizierte Klone.

Eine erhöhte Reduktion der Expressionsmengen an Flk-1 und VE-Cadherin ist nach der Induktion von CSK in keinem der analysierten Klone zu detektieren. Analog zu der Flk-1-Expression ist die exprimierte Menge an CSK nach der Induktion mit Mifepristone in den untersuchten Klone nahezu identisch. Allerdings ist zu beachten, dass während der Analyse des Klons 209F12 der α Myc-Antikörper und nicht der α CSK-Antikörper verwendet wurde und diese daher nur bedingt mit den Analysen der anderen Klone vergleichbar ist.

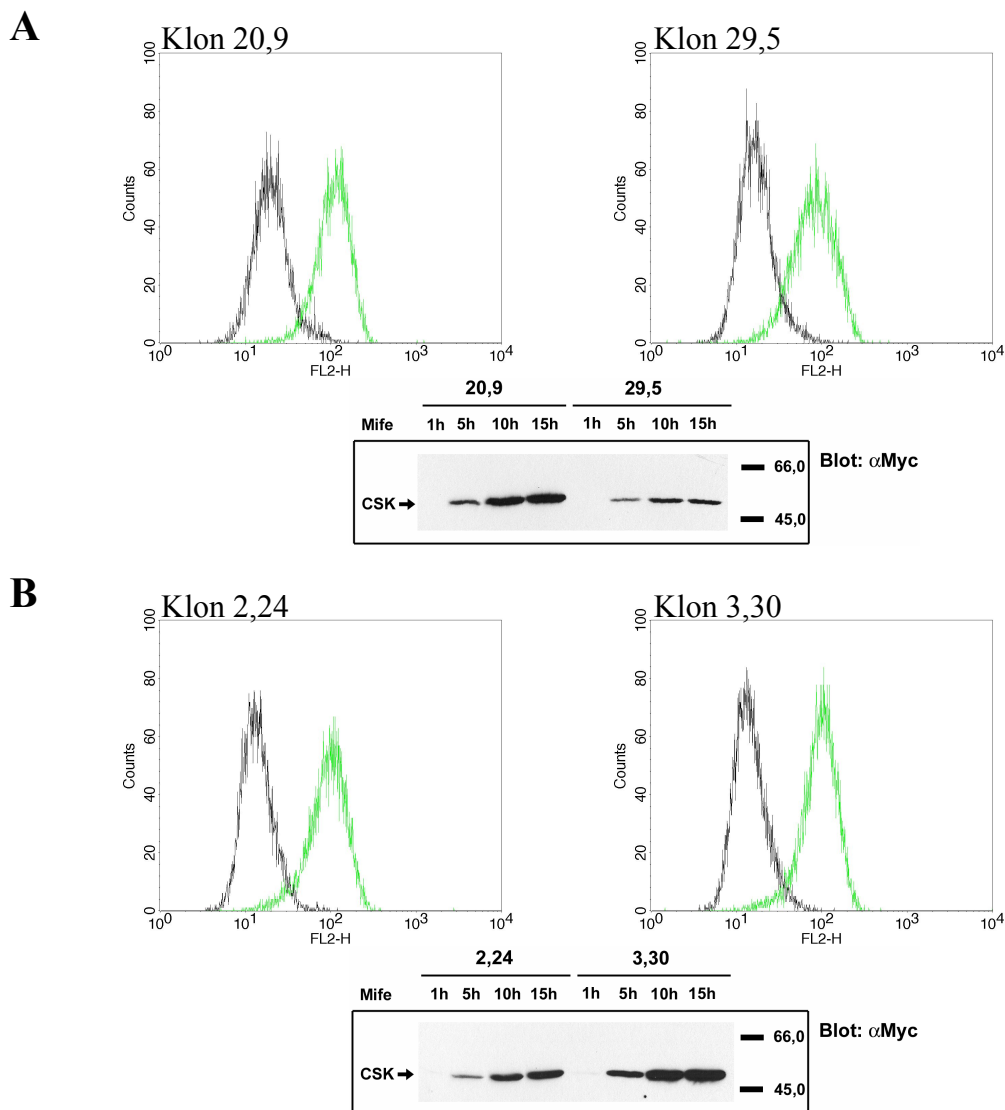
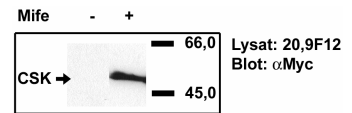
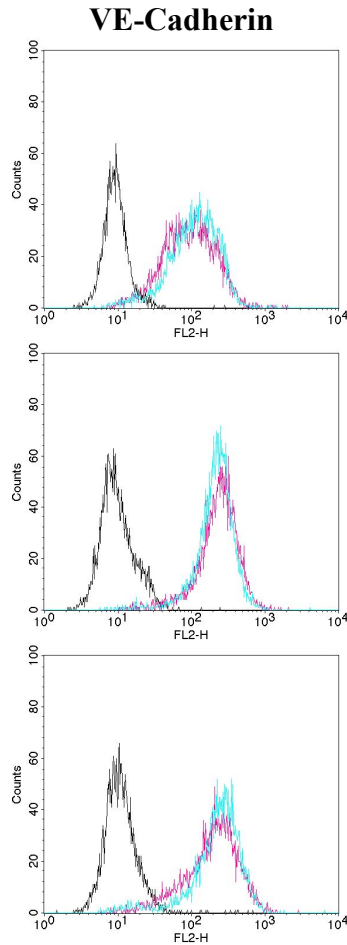
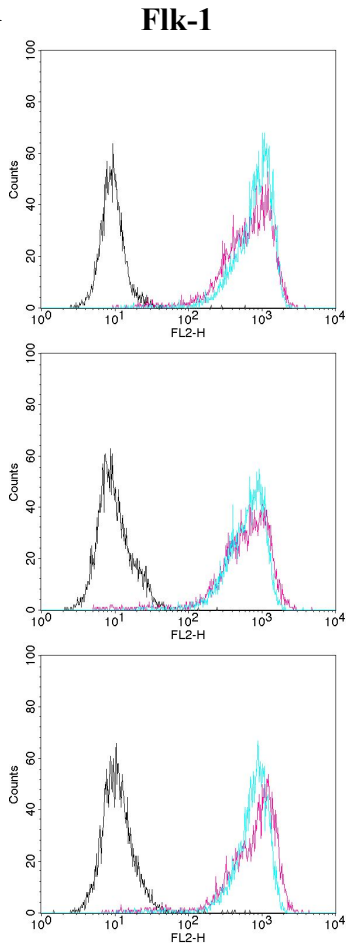
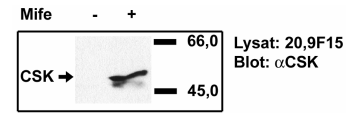


Abbildung 4: Charakterisierung der stabil transfizierten CHO-Subklone. Die Expressionen von $VE-Cadherin_{wt}$ bzw. $VE-Cadherin_{Y685F}$ in den transfizierten CHO-Zellen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie überprüft. Schwarz: Isotyp-Kontrolle, Grün: $VE-Cadherin$. Die CSK_{wt} -Expression wurde über Western-Blots aus Harnstoff-SDS-Lysaten über eine Kinetik der Mifepristone-Induktion analysiert. **A:** Analysen der $VE-Cadherin_{wt}/CSK_{wt}$ transfizierten Klone. **B:** Analysen der $VE-Cadherin_{Y685F}/CSK_{wt}$ transfizierten Klone.

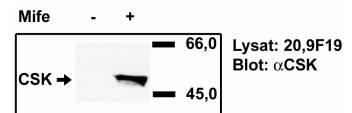
A



Klon 20,9F12

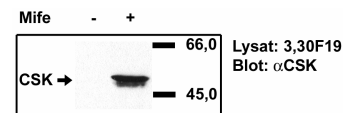
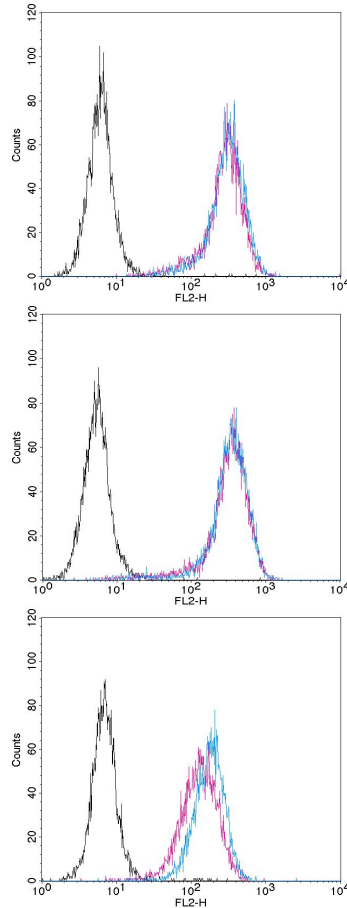
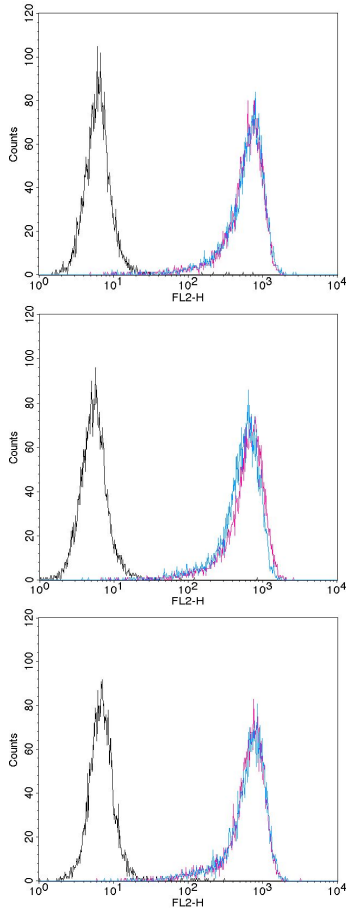


Klon 20,9F15

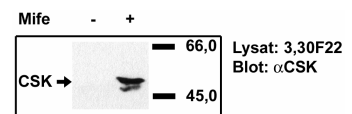


Klon 20,9F19

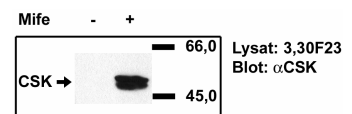
B



Klon 3,30F19



Klon 3,30F22



Klon 3,30F23

Abbildung 5: Charakterisierung der stabil mit Flk-1/VE-Cadherin_{wt/Y685F}/CSK_{wt} transfizierten Klone. Die Expressionen von VE-Cadherin_{wt} bzw. VE-Cadherin_{Y685F} und Flk-1 in den transfizierten CHO-Zellen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie überprüft. Schwarz: Isotyp-Kontrolle, Blau: VE-Cadherin bzw. Flk-1 ohne Induktion, Rot: VE-Cadherin bzw. Flk-1 nach 15h Induktion. Die CSK_{wt}-Expression wurde über Western-Blots aus Harnstoff-SDS-Lysaten nach 16h Induktion mit Mifepristone analysiert. **A:** Analysen der VE-Cadherin_{wt}/CSK_{wt} transfizierten Klone. **B:** Analysen der VE-Cadherin_{Y685F}/CSK_{wt} transfizierten Klone.

4.3.3 Immunzytochemische Analyse der CSK_{wt}-Expression

Über die Kontrolle der CSK_{wt}-Expression mit Hilfe des Western-Blots kann keine Aussage über die Homogenität der Expression in den einzelnen Zellen getroffen werden. Im Western-Blot wird die durchschnittlich exprimierte Proteinnmenge aller lysierten Zellen analysiert. Deshalb wurden zur weiteren Überprüfung der CSK_{wt}-Expression immunzytochemische Färbungen des Proteins durchgeführt. Die konfluenten Zellen wurden nach der 28-stündigen CSK_{wt}-Induktion einiger Ansätze mit Methanol fixiert (28h entsprechen dem Induktionszeitraum während der Proliferationsexperimente, s. 4.5.4) und CSK_{wt} über den Myc-Tag detektiert. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes.

Insgesamt weisen die untersuchten Klone mehr oder weniger stark ausgeprägte Heterogenitäten der CSK-Expression in den einzelnen Zellen auf (Abbildungen 6 und 7). In den Klonen 20,9 und 29,5 der VE-Cadherin_{wt} transfizierten Zellen (Abbildung 6A) ist die exprimierte CSK-Menge nach der Induktion in allen Zellen angestiegen. Klon 20,9 weist zusätzlich einige Zellen auf, die CSK überdurchschnittlich stark exprimieren. Die Heterogenität in der CSK-Expression ist in den VE-Cadherin_{Y685F} transfizierten Zellen gegenüber den VE-Cadherin_{wt} exprimierenden Zellen stärker ausgeprägt (Abbildung 6B). Einige Zellen des Klons 2,24 exprimieren sehr wenig oder kein CSK, während andere eine große Menge des Proteins beinhalten. Im Vergleich zu diesem Klon ist die exprimierte Menge an CSK in Klon 3,30 insgesamt erhöht, wobei nahezu alle Zellen CSK exprimieren und eine größere Anzahl der Zellen eine stark ausgeprägte Expression aufweisen. Der Unterschied in der Heterogenität der CSK-Expression ist ebenfalls in den zusätzlich mit Flk-1 transfizierten Zellen zu detektieren (Abbildung 7). Die mit VE-Cadherin_{wt} transfizierten Zellen scheinen insgesamt eine homogenere Expression von CSK in den einzelnen Zellen aufzuweisen als die VE-Cadherin_{Y685F} transfizierten Zellen. Weitere durchgeführte Subklonierungen der Zellen konnten die Homogenitäten der CSK-Expressionen nicht erhöhen (nicht gezeigte Daten).

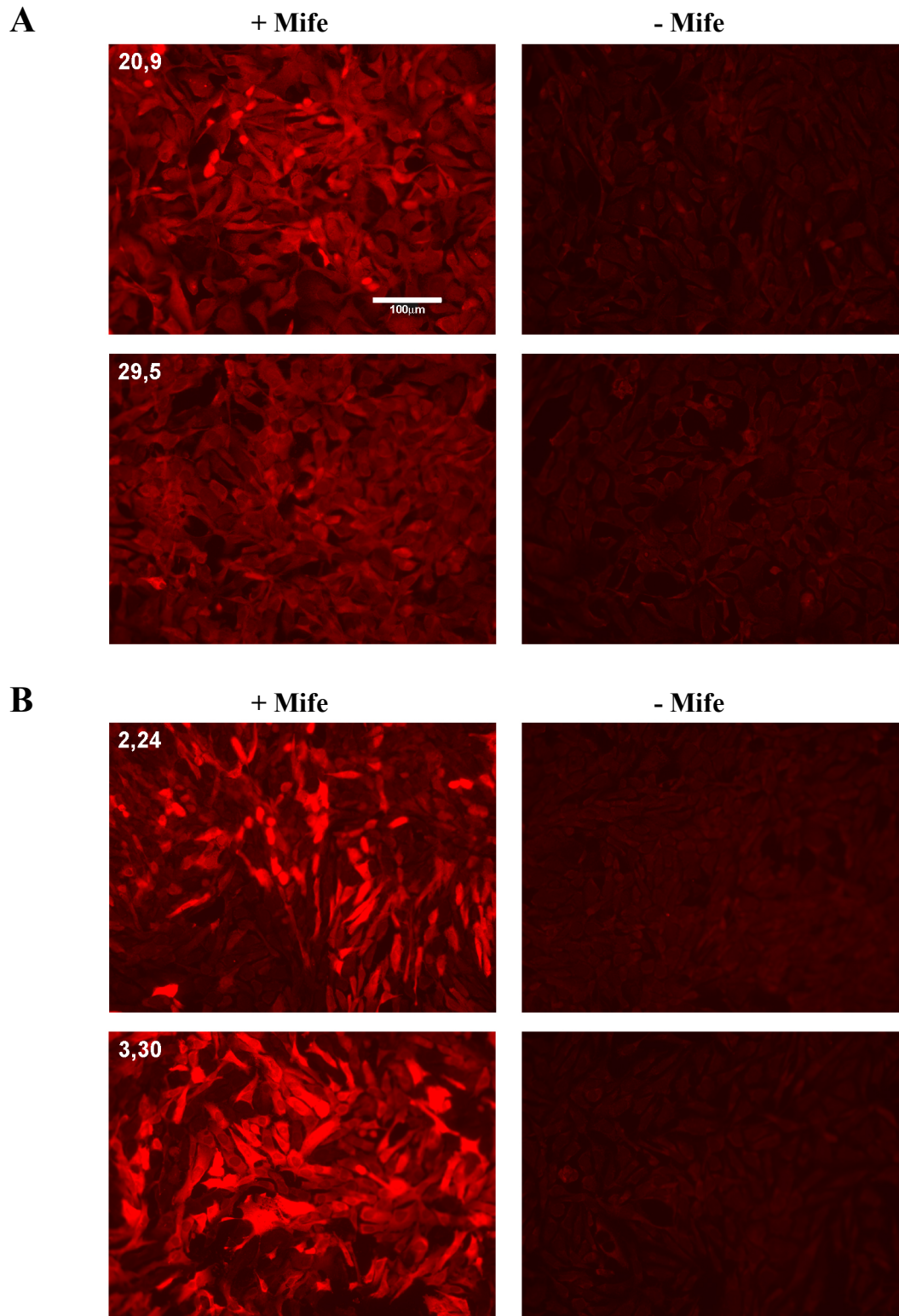


Abbildung 6: Immunfluoreszenzen von CSK_{wt} in stabil transfizierten CHO-Zellen. Zur Kontrolle der CSK-Expression wurden die konfluenten CHO-Zellen für 28h +/- mit Mifepristone induziert, MeOH fixiert und CSK_{wt} über den Myc-Tag markiert. **A:** Mit VE-Cadherin_{wt} und induzierbaren CSK_{wt} transfizierte Zellen (Subklone 20,9 und 29,5). **B:** Mit VE-Cadherin_{Y685F} und induzierbarem CSK_{wt} transfizierte Zellen (Subklone 2,24 und 3,30).

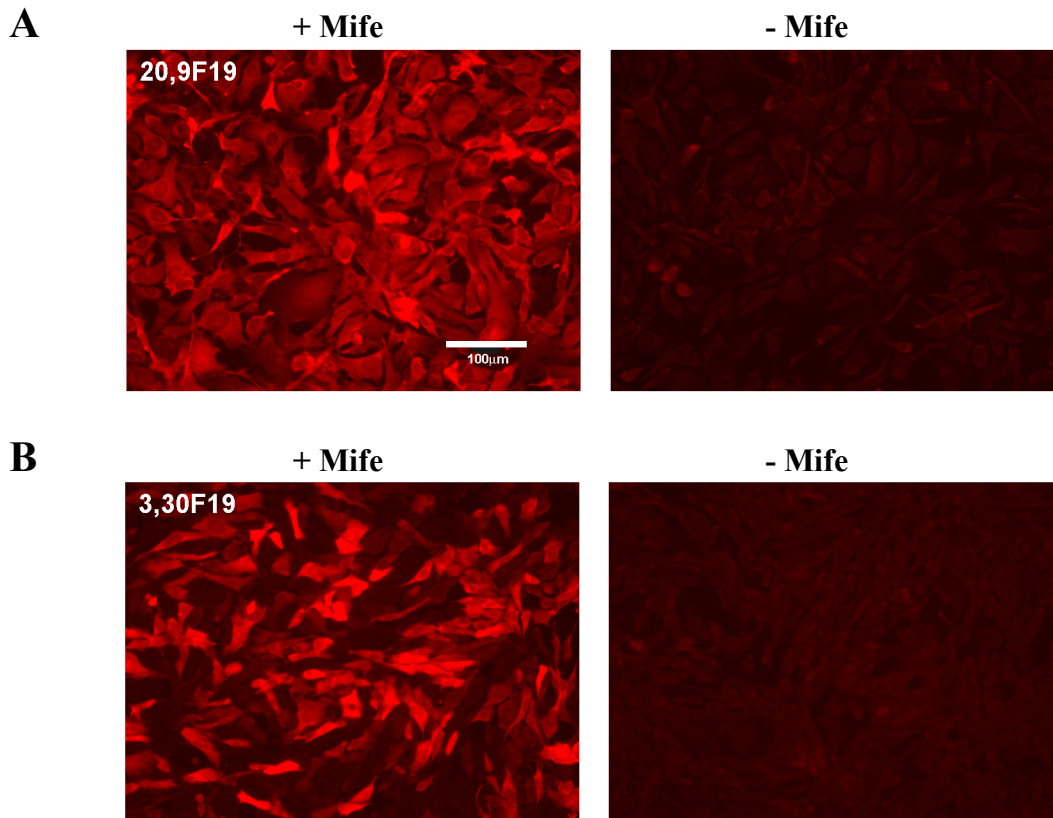


Abbildung 7: Immunfluoreszenzen von CSK_{wt} in stabil transfizierten CHO-Zellen. Zur Kontrolle der CSK-Expression wurden die konfluenten CHO-Zellen für 28h +/- mit Mifepristone induziert, MeOH fixiert und CSK_{wt} mit über den Myc-Tag markiert. **A:** Mit Flk-1, VE-Cadherin_{wt} und induzierbaren CSK_{wt} transfizierte Zellen (Subklon 20,9F19). **B:** Mit Flk-1, VE-Cadherin_{Y685F} und induzierbaren CSK_{wt} transfizierte Zellen (Subklon 3,30F19).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit Hilfe der stabilen Transfektion CHO-Zell-Linien hergestellt wurden, die induzierbares CSK_{wt} zusammen mit VE-Cadherin_{wt} oder VE-Cadherin_{Y685F} sowie Flk-1 exprimieren. In den erhaltenen Subklonen sind die Expressionsmengen der VE-Cadherin-Konstrukte und von Flk-1 nahezu identisch, während sich die Proteinnengen an CSK_{wt} zwischen den Klonen unterscheiden. Im Vergleich zu den VE-Cadherin_{wt} exprimierenden Zellen weisen die VE-Cadherin_{Y685F} transfizierten Zellen eine erhöhte Heterogenität der CSK_{wt}-Expression in den einzelnen Zellen auf. Die Kultivierung der Zellen über einen längeren Zeitraum führte insbesondere für die VE-Cadherin_{Y685F} transfizierten Zellen zu einer Abnahme der CSK-Expression. Deshalb wurden die Expressionen während der Proliferationsexperimente nochmals überprüft (vgl. Abbildungen 19 und 21).

4.4 Charakterisierung der Assoziation zwischen VE-Cadherin und CSK

Zur Überprüfung der Annahme, dass die Bindung von CSK an VE-Cadherin über die SH2-Domäne vermittelt wird, wurde das publizierte CSK-SH2-Bindungsmotiv (Songyang et al., 1994) mit der Aminosäuresequenz von VE-Cadherin (Breier et al., 1996) verglichen. Mit den Aminosäuren Tyrosin₆₈₅-Adenin₆₈₆-Glutamin₆₈₇-Valin₆₈₈ enthält VE-Cadherin eine SH2-Bindungssequenz, die zwischen den Bereichen der „juxtamembranen Domäne“ mit der p120^{ctn}-Bindungsstelle und der β - und γ -Catenin-Bindungsstelle lokalisiert ist. Die p120^{ctn}- und Catenin-Bindungsstellen sind im Gegensatz zu der Sequenz, in der sich das Bindungsmotiv der SH2-Domäne befindet, in der Familie der Cadherine konserviert (Nollet et al., 2000).

Die Frage, ob die SH2-Bindungssequenz innerhalb von VE-Cadherin tatsächlich um das Tyrosin₆₈₅ lokalisiert ist, wurde anhand einer VE-Cadherin-Mutante untersucht, in der das Tyrosin₆₈₅ durch das Phenylalanin₆₈₅ ersetzt wurde (hergestellt von Stefan Koch). Aufgrund dieser Mutation wurde neben dem Austausch der Aminosäure auch die Möglichkeit zur Phosphorylierung an dieser Position unterbunden. Die Interaktion von SH2-Domänen mit ihren Bindungspartnern ist abhängig von der Phosphorylierung der im Bindungsmotiv enthaltenen Tyrosine (Songyang et al., 1994), wie es u.a. für die Anbindung des Adapterproteins Shc an VE-Cadherin über dessen SH2-Domäne (Xu et al., 1997) oder der Anbindung von CSK an das membranständige Adaptermolekül Cbp (Kawabuchi et al., 2000) beschrieben wurde. Demnach sollte eine SH2-Domänen vermittelte Interaktion zwischen VE-Cadherin und CSK erst durch eine Tyrosin-Phosphorylierung des VE-Cadherin detektiert werden. Außerdem sollte der Austausch des Tyrosins₆₈₅ trotz der Phosphorylierung der übrigen Tyrosine des VE-Cadherins die Assoziation beider Proteine unterbinden.

4.4.1 *In-vivo*- und *In-vitro*-Assoziation zwischen VE-Cadherin und CSK

Zur Bestätigung der Ergebnisse des „yeast two hybrid screens“ wurde die Assoziation von VE-Cadherin und CSK mit biochemischen Methoden untersucht. Das Ziel dieser Experimente war die Kopräzipitation der beiden Proteine in *In-vitro*- und *In-vivo*-Experimenten. Neben der Verwendung von rekombinanten bzw. exogenen Proteinen wurde die Interaktion von endogenem CSK und VE-Cadherin in der Endothelium-Zell-Linie bEND.3 analysiert.

4.4.1.1 Die spezifische *In-vitro*-Assoziation von CSK mit VE-Cadherin

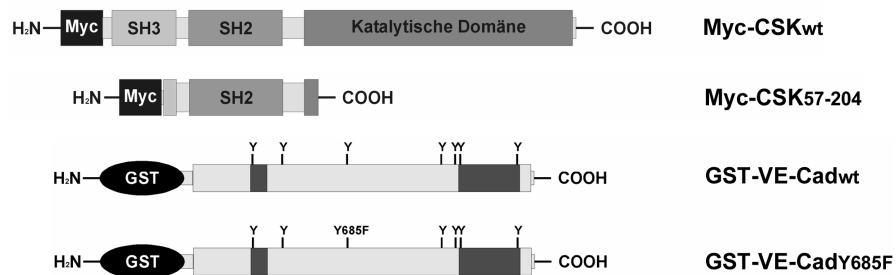
Die *In-vitro*-Assoziation von CSK und VE-Cadherin wurde mit Hilfe von „GST-pulldown“-Experimenten analysiert. Bei dieser Methode wird ein Interaktionspartner als GST-Fusionsprotein („bait“-Protein) exprimiert und über den GST-Teil an Glutathion-Sepharose-„beads“ gekoppelt. Über das gebundene Fusionsprotein kann der andere Interaktionspartner aus Lysaten präzipitiert werden.

In den durchgeführten Experimenten wurden als „bait“-Protein die Aminosäuren 621-764 des zytosolischen Teils von VE-Cadherin_{wt} (Abbildung 8A) eingesetzt. Die Verwendung der vollständigen zytosolischen Domäne von VE-Cadherin war aufgrund der geringen Proteinmenge, die aus den Bakterien isoliert werden konnte, nicht möglich. Stattdessen wurde die VE-Cadherin-Sequenz genutzt, die im „yeast two hybrid screen“ eine positive Interaktion mit der CSK-SH2-Domäne aufwies. Als negative Kontrollen wurden die Fusionsproteine GST-VE-Cadherin_{Y685F} und GST-N-Cadherin verwendet (AS 747-906) (s. 4.4), während eine unspezifische Bindung an den GST-Anteil der Fusionsproteine durch den Einsatz des GST-Proteins ausgeschlossen werden sollte. Zur Analyse einer phosphorylierungsabhängigen Assoziation der Proteine mit der CSK-SH2-Domäne wurde ein Teil der GST-Fusionsproteine vor der Kopräzipitation mit der humanen *p60^{c-src}*-Kinase behandelt.

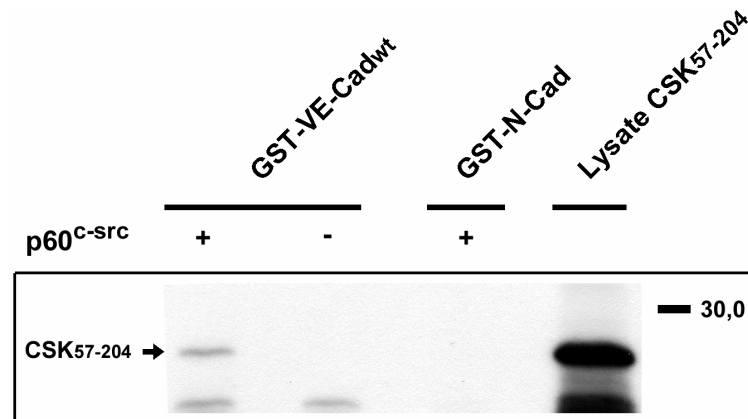
Die möglichen Interaktionspartner der Fusionsproteine wurden *in-vitro* über ein gekoppeltes Transkriptions/Translations-System mit Hilfe von Retikulozytenlysaten hergestellt und metabolisch mit [L-³⁵S]-Methionin markiert. Untersucht wurden die Assoziationen der „bait“-Proteine mit dem im „yeast two hybrid“-System gefundenen CSK-Fragment (AS57-204), CSK_{wt} und β -Catenin. Das aus dem „prey-Vektor“ isolierte CSK₅₇₋₂₀₄ beinhaltet als einzige funktionelle Einheit die SH2-Domäne von CSK. Als positive Kontrolle für die Funktionalität der eingesetzten GST-Cadherin-Fusionsproteine wurde β -Catenin als Bindungspartner eingesetzt. Die über die „GST-pulldown“-Experimente präzipitierten Proteine wurden mit Hilfe der SDS-Page getrennt und die SDS-Gele getrocknet. Die Analyse der gefällten Proteine erfolgte über die Fluorographie.

Nach der Präzipitation mit VE-Cadherin_{wt} ist eine Proteinbande auf der Höhe von 21,5kD zu detektieren, die der Größe von CSK₅₇₋₂₀₄ (21,5kD) entspricht und sich auf derselben Höhe wie das über die Kontroll-Lysate aufgetragene CSK₅₇₋₂₀₄ befindet (Abbildung 8B). Im Gegensatz dazu ist für N-Cadherin keine Assoziation festzustellen. Das vollständige CSK_{wt} wird ebenfalls mit VE-Cadherin_{wt} kopräzipitiert. Nach der Fällung mit dem GST-VE-Cadherin_{wt} liegt eine Bande bei 52kD vor, die ebenfalls im Kontroll-Lysat zu detektieren ist (Abbildung 8C).

A



B



C

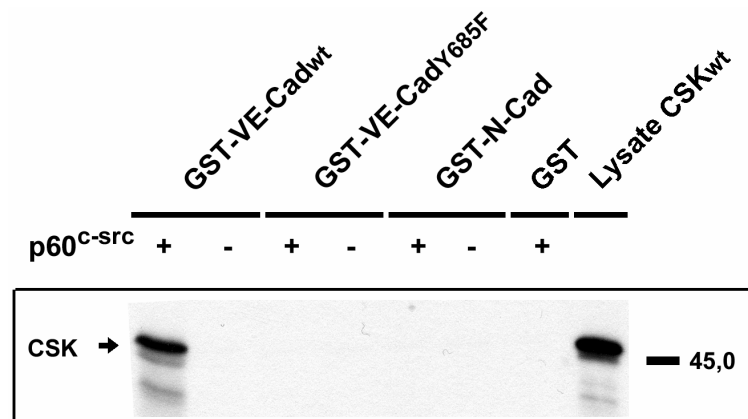


Abbildung 8: In-vitro-Kopräzipitation von CSK über die SH2-Domäne mit GST-VE-Cadherin. *A:* Schematische Übersicht der verwendeten VE-Cadherin- und CSK-Konstrukte. CSK₅₇₋₂₀₄ enthält als einziges funktionelles Element die SH2-Domäne. GST-VE-Cad_{Y685F} wurde an dem Tyrosin der CSK-SH2-Bindungssequenz mutiert. *B+C:* Ein Teil der GST-Fusionsproteine wurde vor der Präzipitation mit Hilfe der p60^{C-src} phosphoryliert. Die Detektion der präzipitierten, L-[³⁵S]Methionin markierten Proteine erfolgte nach der Trennung mittels der SDS-Page und dem Trocknen der Gele über die Fluorographie. Als Expressionskontrolle der in-vitro exprimierten Proteine wurden Aliquots der Lysate aufgetragen. *B:* In-vitro-Translation von CSK₅₇₋₂₀₄ und Phosphotyrosin abhängige Präzipitation mit GST-VE-Cadherin. *C:* In-vitro-Translation von CSK_{wt} und phosphorylierungsabhängige Präzipitation mit GST-VE-Cadherin.

Analog zu dem CSK-Fragment bindet CSK_{wt} nicht an GST-N-Cadherin, außerdem findet keine Interaktion mit dem mutierten VE-Cadherin_{Y685F} statt. Eine unspezifische Bindung an den GST-Teil der Fusionsproteine kann ausgeschlossen werden, da keine 52kD Bande nach der Fällung mit dem GST-Protein detektiert wird.

Die Voraussetzung für die Bindung von CSK₅₇₋₂₀₄ und CSK_{wt} ist die Phosphorylierung der Tyrosine des VE-Cadherins über die *p60^{c-src}*-Kinase. Ohne die vorausgegangene Behandlung der Fusionsproteine mit der Kinase können die Interaktionen zwischen VE-Cadherin und den CSK-Konstrukten nicht nachgewiesen werden (Abbildung 8B und C).

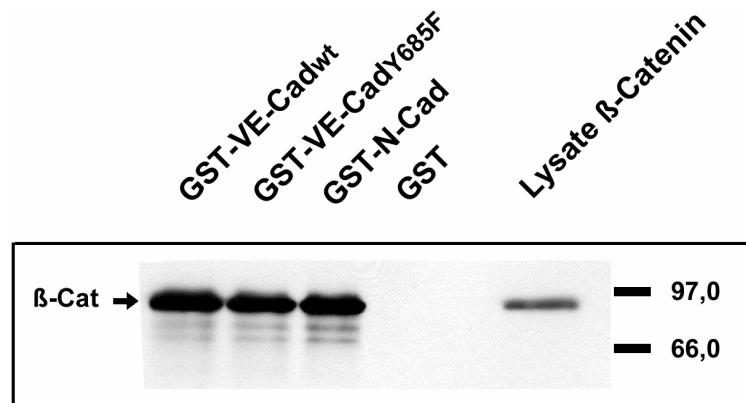


Abbildung 9: *In-vitro*-Kopräzipitation von β -Catenin mit den GST-Cadherin-Konstrukten. Die Detektion des kopräzipitierten, L - $[^{35}S]$ Methionin markierten β -Catenin erfolgte nach der Trennung mit Hilfe der SDS-Page und Trocknen der Gele über Fluorographie. Als Expressionskontrolle des *in-vitro* exprimierten Proteins wurde ein Aliquot des Lysats aufgetragen.

Die fehlende Interaktion der CSK-Konstrukte mit dem GST-N-Cadherin oder dem GST-VE-Cadherin_{Y685F} ist nicht auf eine artifizielle Bindungsunfähigkeit der Fusionsproteine zurückzuführen, wie sie z.B. durch eine untypische Faltung hervorgerufen wird. Die drei eingesetzten GST-Fusionsproteine binden im nahezu gleichem Umfang an β -Catenin (97kD) (Abbildung 9), dessen Signal in allen drei GST-Präzipitaten mit der gleichen Intensität detektiert wird. Mit Hilfe eines separaten Gels und der Coomassiefärbung wurde zusätzlich überprüft, ob eine vergleichbare Menge an Fusionsproteinen an die Sepharose-„beads“ gekoppelt bzw. die Proteine nicht degradiert waren (diese Daten sind nicht gezeigt).

4.4.1.2 *In-vivo*-Assoziation zwischen VE-Cadherin und CSK in heterologen Systemen

Die weiterführende Analyse der Assoziation von VE-Cadherin und CSK erfolgte mit Hilfe von *In-vivo*-Experimenten in heterologen Expressionssystemen. Dafür wurden COS7-Zellen transient und CHO-Zellen stabil mit VE-Cadherin_{wt} oder VE-Cadherin_{Y685F} zusammen mit CSK_{wt} transfiziert (s. 4.3). Aus den Lysaten der Zellen wurde einer der beiden Interaktionspartner immunopräzipitiert und die Menge des kopräzipitierten Bindungspartners mit Hilfe des Western-Blots analysiert. Da die Aussagen der COS7- und CHO-Experimente nahezu identisch waren, werden in diesem Abschnitt die Ergebnisse der Kopräzipitationen aus CHO-Zellen dargestellt. Dass die Präzipitationen ebenfalls in COS7-Lysaten durchgeführt werden können, ist der Abbildung 16B des Abschnitts 4.5.1 zu entnehmen.

Die stabil transfizierten CHO-Zellen exprimierten konstitutiv VE-Cadherin_{wt} oder VE-Cadherin_{Y685F}, endogenes CSK sowie induzierbares CSK_{wt}. Die Expression des induzierbaren CSK_{wt} konnte je nach Ansatz durch Zugabe von Mifepristone gestartet werden. Zur endogenen Tyrosin-Phosphorylierung der Proteine wurden einige Ansätze mit Pervanadat, einem Inhibitor von Phosphatasen, behandelt. Die Präzipitation der Proteine erfolgte in den Triton X-100-Lysaten von ca. 1×10^7 Zellen pro Ansatz. Nach der Trennung der Präzipitate mit Hilfe der SDS-Page und dem Transfer auf Nitrozellulose-Membranen wurden zunächst die Mengen der kopräzipitierten und anschließend die der präzipitierten Proteine auf derselben Membran über Immunoblots analysiert. Zur Kontrolle der Proteinexpression wurden Aliquots der Lysate über separate Western-Blots analysiert.

Analog zu den *In-vitro*-Experimenten kopräzipitiert VE-Cadherin_{wt} mit CSK, das im Blot als Doppelbande auf der Höhe von 50-52kD vorliegt (Abbildung 10A). Die Assoziation der Proteine ist abhängig von der endogenen Tyrosin-Phosphorylierung. Im Gegensatz zu den *In-vitro*-Analysen ist auch ohne die Phosphorylierung eine schwache Bande zu erkennen, die auf eine endogene „Grundphosphorylierung“ von VE-Cadherin in den Zellen hindeutet. Diese könnte eine CSK-Bindung im geringen Umfang ermöglichen. Das Auftreten der Doppelbande ist auf die Verwendung des α CSK-Antikörpers zurückzuführen, der sowohl an endogenes CSK (50,8kD, untere Bande) als auch an exogenes CSK (52kD, obere Bande) bindet. Im Vergleich zu den Kontroll-Lysaten (4. Blot) ist die untere Bande in allen Zell-Lysaten nachzuweisen, die 52kD-Bande kommt nach der Induktion von CSK_{wt} hinzu. Allerdings tritt eine Intensivierung des Signals der unteren Bande nach der Induktion von exogenem CSK in den Zellen auf und widerspricht einer strikten Trennung beider Formen.

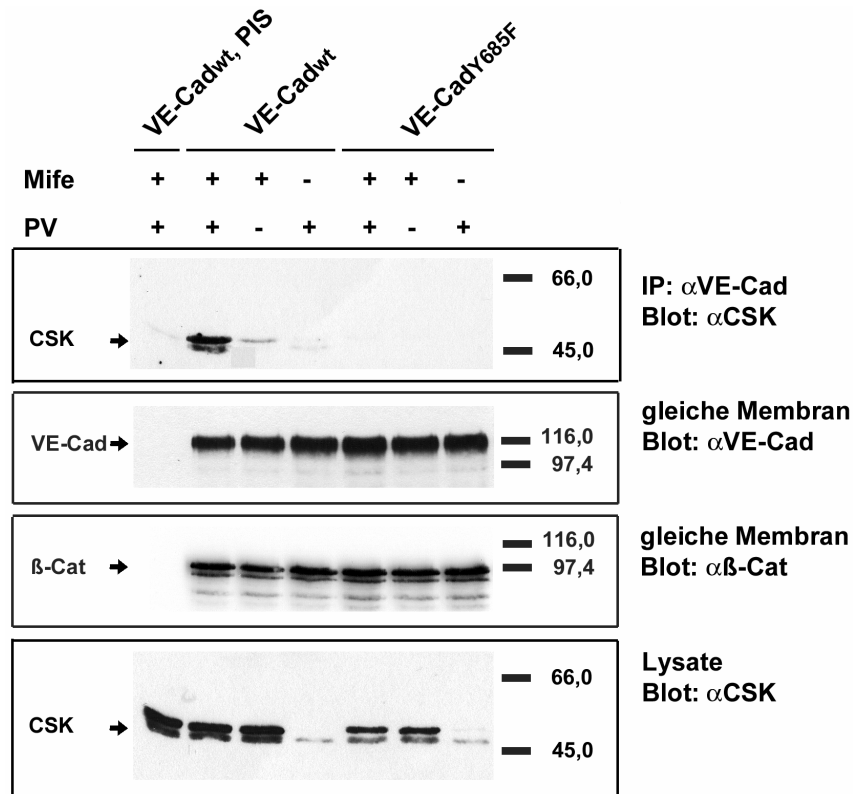
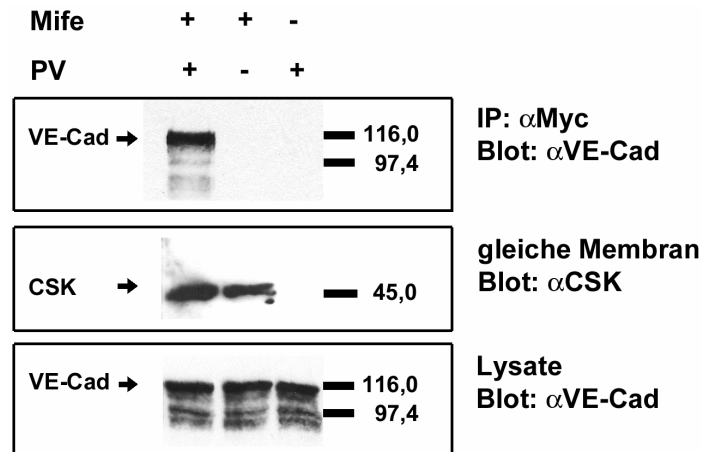
A**B**

Abbildung 10: Ko-Immunopräzipitationen von CSK und VE-Cadherin aus CHO-Zell-Lysaten. Die stabil mit VE-Cadherin_{wt}/VE-Cadherin_{Y685F} und induzierbaren CSK_{wt} transfizierten CHO-Zellen wurden für 16h +/- Mifepristone und +/- Pervanadat (PV) behandelt. Die Präzipitationen erfolgten aus Triton X-100-Lysaten der Zellen. Als Kontrolle der Proteinexpressionen wurden Aliquots der Lysate auf separate Gele aufgetragen. Nach der Trennung über die SDS-Page und dem Transfer auf Nitrozellulose-Membranen erfolgte die Analyse im Western-Blot. **A:** Präzipitation von VE-Cadherin und Analyse der kopräzipitierten Menge an CSK_{wt} (1. Blot). Als Kontrolle für den polyklonalen IP-Antikörper wurde das Prä-Immune-Serum (PIS) verwendet. Auf derselben Membran erfolgte der Immunoblot gegen VE-Cadherin. (2. Blot) und β-Catenin (3. Blot). **B:** Nach der Präzipitation von CSK_{wt} über den Myc-Tag aus den Lysaten von VE-Cad_{wt}/CSK_{wt} exprimierenden Zellen wurden die präzipitierten Mengen an VE-Cadherin_{wt} (1. Blot) sowie CSK_{wt} (2. Blot) mit Hilfe des Immunoblots analysiert.

VE-Cadherin_{wt} assoziiert ebenfalls mit endogenem CSK (1. Blot). Ohne die Induktion von CSK ist eine Bande bei 50,8kD nachzuweisen, deren Signal eine sehr geringe Intensität aufweist. Dieses schwache Signal ist auf die geringe Menge an endogenem CSK in den Zellen zurückzuführen (vgl. 4. Blot). Im Gegensatz zu VE-Cadherin_{wt} ist die Bindung von VE-Cadherin_{Y685F} an CSK trotz der Tyrosin-Phosphorylierung nicht nachzuweisen (1. Blot). Ein Artefakt kann ausgeschlossen werden, denn in den Lysaten der induzierten Zellen war ausreichend CSK vorhanden (4. Blot) und die Mengen an VE-Cadherin_{wt} sowie VE-Cadherin_{Y685F} (120kD) waren vergleichbar (2. Blot). Außerdem kopräzipitieren beide Konstrukte in nahezu gleichem Umfang mit β -Catenin (3. Blot).

Die Interaktion der beiden Proteine ist auch über die Präzipitation von CSK_{wt} und dem anschließenden Immunoblot gegen VE-Cadherin nachzuweisen (Abbildung 10B). Im Vergleich zu den oben ausgeführten Ergebnissen kann eine Kopräzipitation ohne die Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin nicht nachgewiesen werden. Dies könnte auf eine geringere Sensitivität dieses Systems zurückzuführen sein. Im Gegensatz zu dem transfizierten CSK_{wt} wird endogenes CSK bei der Präzipitation mit Hilfe des α Myc-Antikörpers nicht berücksichtigt, angezeigt durch die einzelne CSK Bande bei 52kD (2. Blot). Dementsprechend wurde mit endogenem CSK assoziiertes VE-Cadherin nicht präzipitiert.

4.4.1.3 Die Bindung von endogenem CSK an endogenes VE-Cadherin in bEND.3

Über die *In-vitro*- und die *In-vivo*-Analyse in heterogenen Expressions-Systemen konnte bisher gezeigt werden, dass VE-Cadherin mit CSK phosphorylierungsabhängig interagiert. Die Frage, ob ebenfalls endogen exprimiertes CSK mit endogenem VE-Cadherin assoziiert, wurde mit Hilfe von Kopräzipitationen aus Lysaten der Endothelium-Zell-Linie bEND.3 beantwortet.

Da die exprimierte Menge an CSK im Gegensatz zu den heterogenen Systemen gering ist, wurde die ca. 5-fache Zellmenge (5×10^7 Zellen/Ansatz) zur Herstellung der Lysate eingesetzt. Vor der Triton X-100-Lyse wurde ein Teil der Ansätze mit Pervanadat behandelt. Zur Kontrolle der Proteinexpression wurden Lysat-Aliquots auf die Gele aufgetragen. Die Präzipitate und Lysate wurden mit Hilfe der SDS-Page getrennt und auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Anschließend erfolgte die Analyse der präzipitierten Mengen an CSK und VE-Cadherin mit Hilfe des Western-Blots.

Endogenes VE-Cadherin kopräzipitiert in Lysaten von bEnd.3-Zellen mit endogenem CSK (Abbildung 11). Auf der Höhe von 50,8kD ist nach der Präzipitation von VE-Cadherin die CSK spezifische Proteinbande zu detektieren, die von der endogenen Phosphorylierung abhängig ist (1. Blot). Das als negative Kontrolle eingesetzte Prä-Immune-Serum (PIS) präzipitiert ebenfalls ein Protein, dieses besitzt aber ein deutlich größeres Molekulargewicht als CSK. Aufgrund der starken Signale des Immunoblots gegen das präzipitierte VE-Cadherin (2. Blot) wurde dieser Blot nur sehr kurz exponiert und täuscht eine geringere Expression von VE-Cadherin in den Lysaten im Vergleich zu CSK (vgl. 1. Blot) vor.

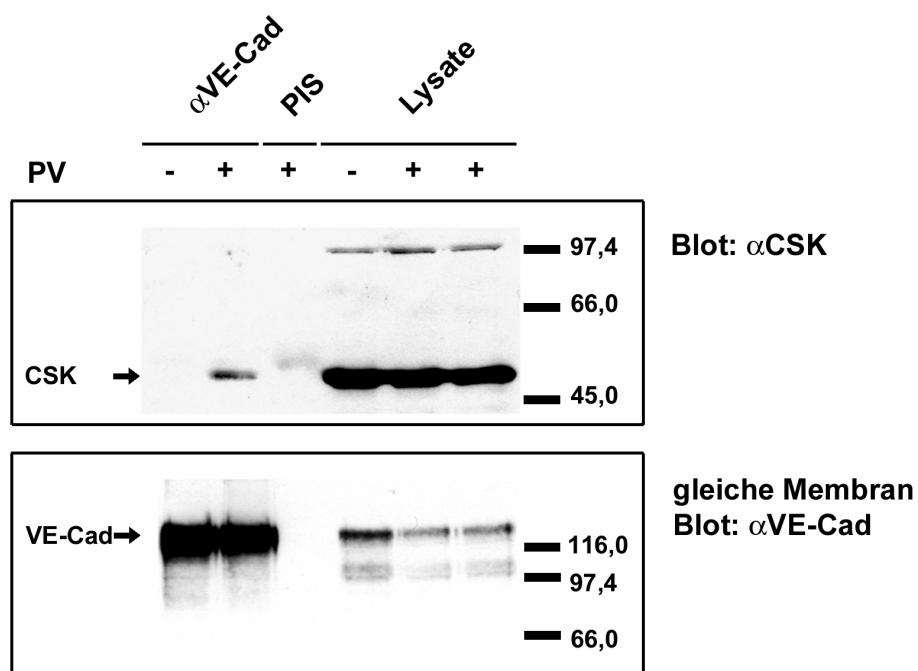


Abbildung 11: Ko-Immunopräzipitation von VE-Cadherin und endogenem CSK aus bEND.3-Zell-Lysaten. Ein Teil der bEND.3-Zellen wurde vor der Lyse mit Pervanadat (PV) behandelt. Die Präzipitation von VE-Cadherin erfolgte über den polyklonalen Antikörper aus Triton X-100-Lysaten. Als Kontrolle des IP-Antikörpers wurde das Prä-Immune-Serum (PIS) verwendet. Die Proteinexpressionskontrolle der Proteine erfolgte über die Auftragung von Lysaten. Nach der Trennung der Proteine über die SDS-Page und dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran wurde zunächst die Menge an CSK (1. Blot) und anschließend die Menge an VE-Cadherin (2. Blot) mit Hilfe des Western-Blots analysiert.

Sowohl in den *In-vitro*-als auch in den *In-vivo*-Experimenten assoziiert VE-Cadherin mit CSK_{wt}. *In-vitro* konnte gezeigt werden, dass die Assoziation spezifisch für VE-Cadherin, nicht aber für N-Cadherin ist. Die Assoziation der beiden Proteine wird über die Bindung der CSK-SH2-Domäne an das SH2-Bindungsmotiv der zytosolischen Domäne von VE-

Cadherin vermittelt und ist abhängig von der Phosphorylierung des enthaltenen Tyrosins. *In-vivo* wurde die Interaktion zwischen VE-Cadherin und CSK sowohl mit exogenen als auch mit endogenen Proteinen in verschiedenen Zellsystemen bestätigt.

4.4.2 Kolokalisierung von VE-Cadherin und CSK in immunzytochemischen Analysen

Neben den biochemischen Experimenten wurde zur Charakterisierung der Interaktion von CSK und VE-Cadherin die zellbiologische Methode der immunzytochemischen Färbung angewandt. Das Ziel dieser Experimente war die Visualisierung der Kolokalisierung beider Proteine in den Zellkontakten in Abhängigkeit von der endogenen Protein-Phosphorylierung.

Die stabil mit VE-Cadherin oder VE-Cadherin_{wt} und induzierbarem CSK transfizierten Zellen sowie untransfizierte CHO-Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und mit Methanol fixiert. Vor der Fixierung wurde in den Zellen, je nach Ansatz, für 9h CSK induziert und die Proteine für 5min über Pervanadat endogen phosphoryliert. VE-Cadherin, CSK_{wt} und β -Catenin wurden in den fixierten Zellen über spezifische Antikörper (α Myc für CSK_{wt}) erkannt und über *TexRed* (für CSK_{wt} und β -Catenin) bzw. *Cy2* (für VE-Cadherin) konjugierte sekundäre Antikörper gefärbt. Die Analyse der Lokalisierung beider Proteine erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopes (CLSM).

In allen untersuchten Ansätzen, in denen sowohl VE-Cadherin_{wt} als auch VE-Cadherin_{Y685F} exprimiert werden, sind diese in den Zellkontakten lokalisiert. In den VE-Cadherin_{wt}/CSK exprimierenden Zellen ist die Lokalisierung des induzierten CSK abhängig von der endogenen Protein-Phosphorylierung (Abbildung 12). Ohne den Zusatz von Pervanadat liegt CSK_{wt} (rote Färbung) größtenteils diffus innerhalb des Zytosols vor (B) und ist weder spezifisch an der Membran rekrutiert, noch mit VE-Cadherin kolokalisiert. Nach der endogenen Protein-Phosphorylierung wird CSK_{wt} an die Membran rekrutiert (A) und kolokalisiert mit VE-Cadherin. Dies wird in der Überlagerung der Bilder durch die kräftige Gelbfärbung der Zellkontakte angezeigt.

In den VE-Cadherin_{Y685F} transfizierten Zellen (Abbildung 13) ist die Rekrutierung von CSK_{wt} an die Membran nach der endogenen Protein-Phosphorylierung weniger stark ausgeprägt. Zwar findet ebenfalls eine schwache Rekrutierung an die Membran nach der Phosphorylierung statt (A), diese führt aber in der Überlagerung der Bilder zu keiner massiven Erhöhung der Gelbfärbung in den Zellkontakten, wie es in den VE-Cadherin_{wt} transfizierten Zellen zu beobachten ist. Diese Membranrekrutierung könnte auf weitere memb-

ranständige Proteine zurückzuführen sein, die phosphorylierungsabhängig CSK binden können.

Die beiden transfizierten VE-Cadherin-Konstrukte werden in den Zellen funktionell exprimiert und sind mit β -Catenin assoziiert (Abbildung 14).

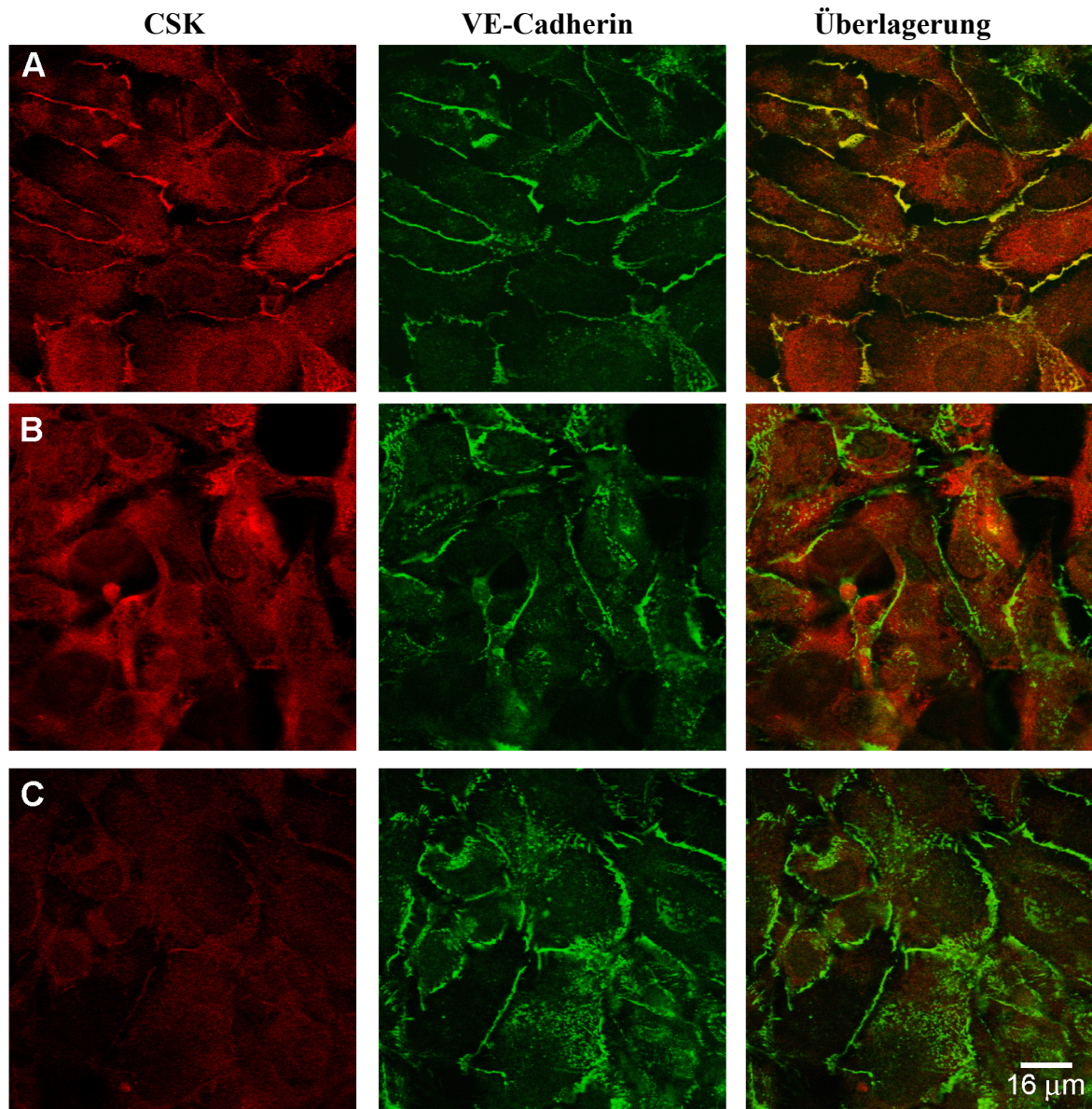


Abbildung 12: CSK bindet phosphorylierungsabhängig an VE-Cadherin_{wt} in CHO-Zellen. Die konfluenten CHO-Zellen (Klon: 20,9) wurden nach +/- 9h CSK-Induktion und +/- 5min Pervanadat-Behandlung mit MeOH fixiert und über spezifische Antikörper markiert. Rot: Färbung von CSK_{wt} über α Myc-Antikörper, Grün: Färbung von VE-Cadherin_{wt} über 11D4.1. Die Gelbfärbung in der Überlagerung der Bilder zeigt die Kolokalisierung der Proteine an. **A:** Induzierte, mit Pervanadat behandelte Zellen. **B:** Induzierte Zellen ohne Pervanadat-Behandlung. **C:** Nicht induzierte, mit Pervanadat behandelte Zellen.

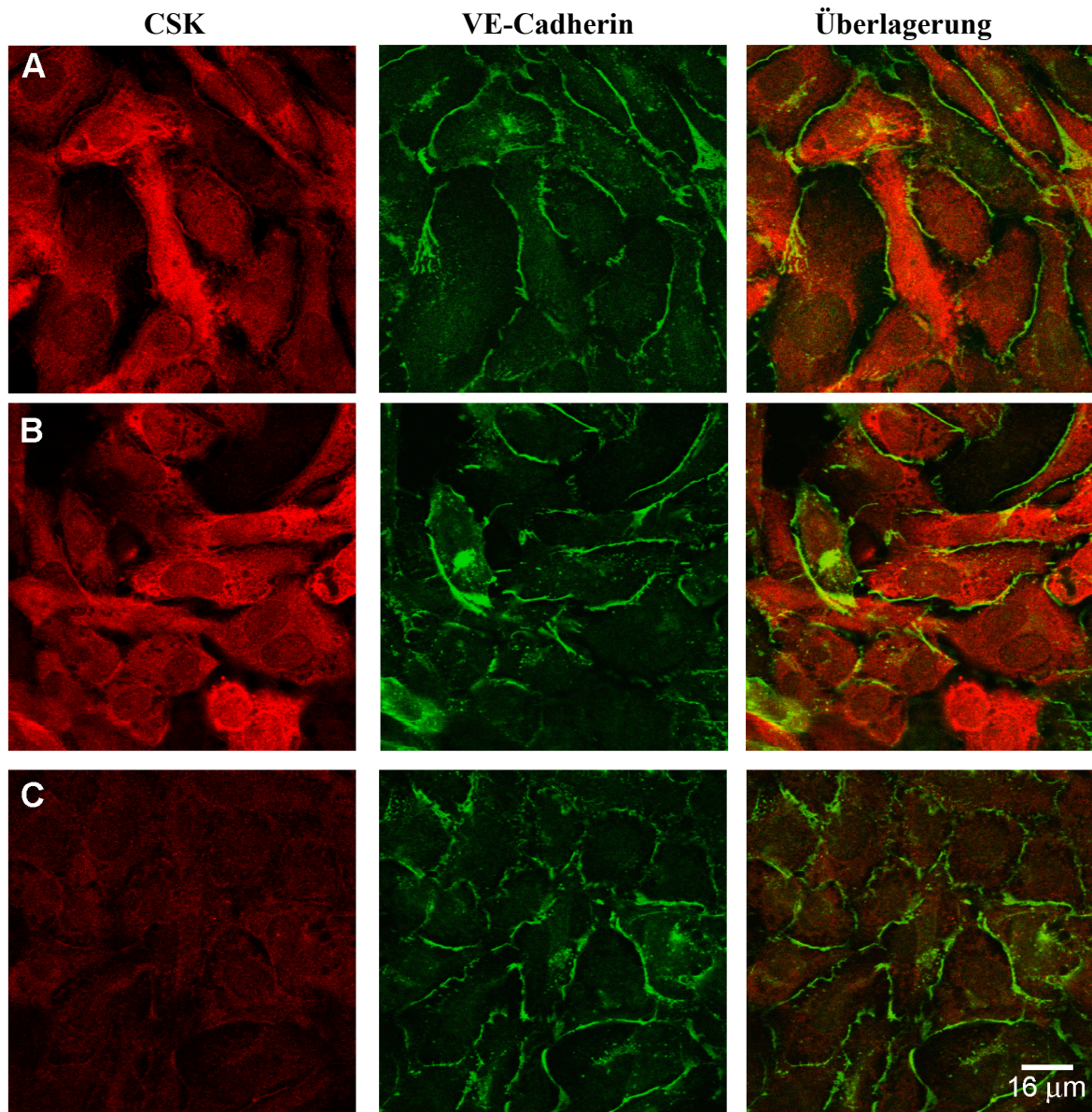


Abbildung 13: CSK bindet nicht an VE-Cadherin_{Y685F} in CHO-Zellen. Die konfluenten CHO-Zellen (Klon 3,30) wurden nach +/- 9h CSK-Induktion und +/- 5min Pervanadat-Behandlung mit MeOH fixiert und mit spezifischen Antikörpern markiert. Rot: Färbung von CSK_{wt} über α Myc-Antikörper, Grün: Färbung von VE-Cadherin_{Y685F} über IID4.1. Die Gelbfärbung in der Überlagerung der Bilder zeigt die Kolokalisierung der Proteine an. **A:** Induzierte, mit Pervanadat behandelte Zellen. **B:** Induzierte Zellen ohne Pervanadat-Behandlung. **C:** Nicht induzierte, Pervanadat behandelte Zellen.

Sowohl in den VE-Cadherin_{wt}/CSK transfizierten Zellen (20,9) als auch in den VE-Cadherin_{Y685F} transfizierten Zellen (3,30) ist in der Überlagerung der einzelnen Fluoreszenzbilder eine deutliche Gelbfärbung der Zellkontakte zu erkennen, die auf eine Kolokalisierung der Proteine hinweist. Als negative Kontrolle für diese Kolokalisierung und zur

Überprüfung der unspezifischen Bindung des VE-Cadherin-Antikörpers wurden zusätzlich untransfizierte CHO-Zellen mit dieser Methode analysiert (C). Ohne die Expression von VE-Cadherin ist keine Färbung der Zellkontakte zu detektieren und β -Catenin liegt diffus im Zytosol vor.

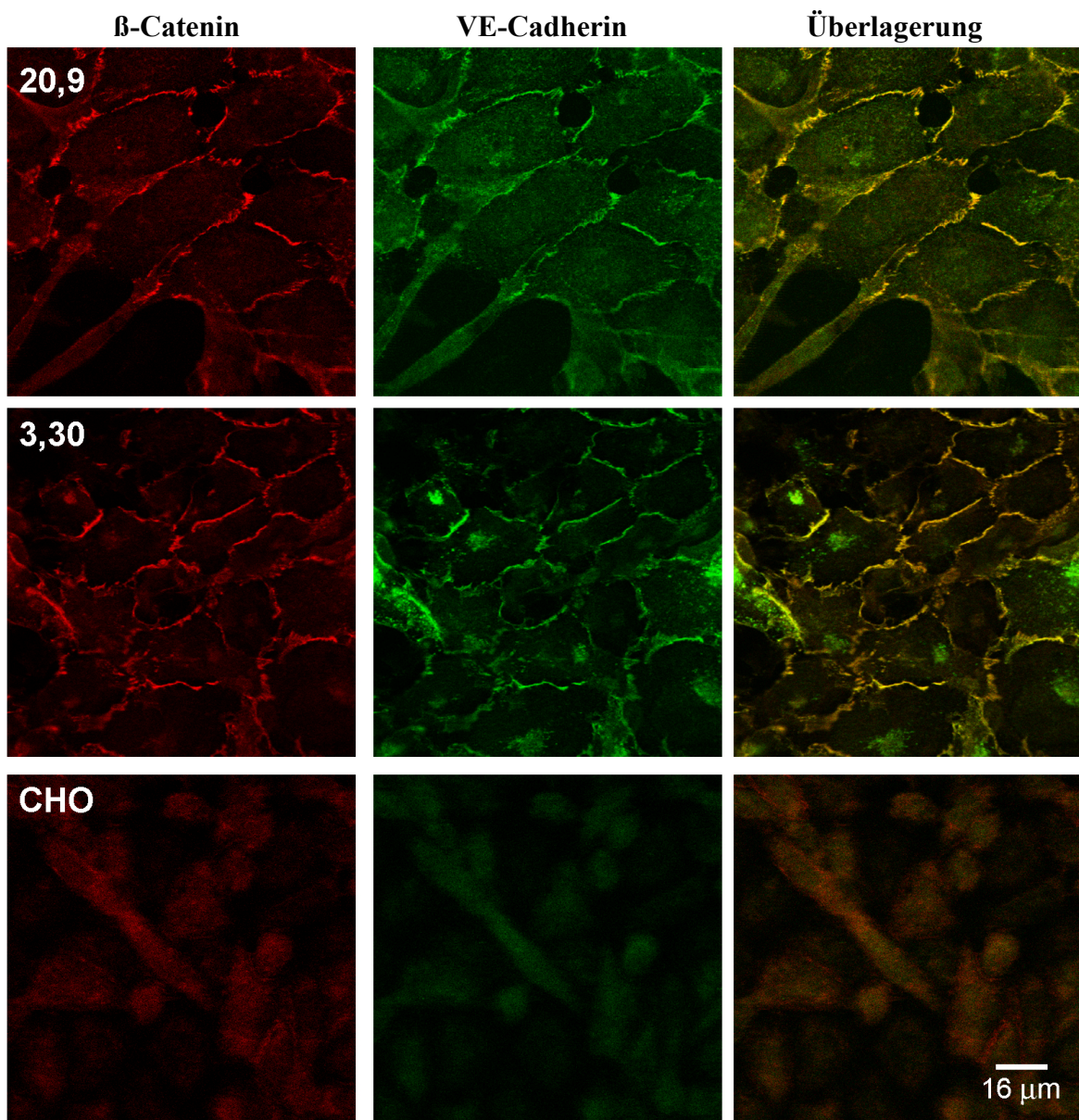


Abbildung 14: β -Catenin bindet an VE-Cadherin_{wt} sowie an VE-Cadherin_{Y685F} in CHO-Zellen. Die konfluenten CHO-Zellen wurden MeOH fixiert und die Proteine mit spezifischen Antikörpern markiert. Rot: Färbung von β -Catenin, Grün: Färbung von VE-Cadherin. Die Gelbfärbung in der Überlagerung der Bilder zeigt die Kolo-kalisierung der Proteine an. **A:** Mit VE-Cadherin_{wt} und induzierbarem CSK_{wt} transfizierte Zellen (Subklon 20,9). **B:** Mit VE-Cadherin_{Y685F} und induzierbarem CSK_{wt} transfizierte Zellen (Subklon 3,30). **C:** Nicht transfizierte CHO-Zellen.

Mit Hilfe der immunzytochemischen Färbungen konnte die Kollokalisierung von VE-Cadherin mit CSK in Abhängigkeit von der endogenen Phosphorylierung und dem vollständigen Bindungsmotiv der SH2-Domäne in CHO-Zellen visualisiert werden. Zwar kann CSK auch über andere Proteine an die Zellmembran rekrutiert werden, allerdings ist der Umfang dieser Rekrutierung erheblich geringer als der über VE-Cadherin_{wt} vermittelte Mechanismus.

4.5 Biologische Relevanz der VE-Cadherin-CSK-Interaktion

Nachdem auf biochemischem und zellbiologischem Weg gezeigt werden konnte, dass VE-Cadherin phosphorylierungsabhängig mit CSK interagiert, stellte sich die Frage nach der biologischen Relevanz dieser Interaktion. Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss CSK auf den Phosphorylierungsgrad der Tyrosine von VE-Cadherin nimmt. In der Literatur wurde gezeigt, dass ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Phosphorylierungsgrad der intrazellulären VE-Cadherin-Tyrosine und den Funktionen von VE-Cadherin besteht. So konnte z.B. in unserem Labor nachgewiesen werden, dass durch die Expression der Tyrosin-Phosphatase VE-PTP einerseits VE-Cadherin dephosphoryliert wird und andererseits die Zell-Zellkontakte gestärkt werden (Nawroth et al., 2002). Für CSK wäre eine ähnliche Funktion als Regulator der VE-Cadherin-Phosphorylierung denkbar. Dabei könnte CSK sowohl als Kinase eine aktive Phosphorylierung von VE-Cadherin durchführen, als auch durch seine beschriebene Funktion als Inhibitor der Src-Kinasen (Nada et al., 1991) eine Reduzierung des Phosphorylierungsgrades vermitteln. Für PECAM-1, einem weiteren endothelialen Adhäsionsprotein, wurde die Steigerung der Tyrosin-Phosphorylierung über die Koexpression mit CSK bereits beschrieben (Cao et al., 1998).

4.5.1 Einfluss von CSK auf die Phosphotyrosine von VE-Cadherin & PECAM-1

Die Frage, welche Einflussnahme CSK auf die Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin nimmt, wurde mit Hilfe von verschiedenen CSK-Konstrukten untersucht (Abbildung 15A). Als funktionelle Kontrolle wurde zusätzlich der Einfluss dieser Konstrukte auf Phosphotyrosine von PECAM-1 analysiert. CSK_{R107K} trägt eine Mutation in der SH2-Domäne und ist nur eingeschränkt zur Bindung an VE-Cadherin fähig. CSK_{K222R} wurde über eine Mutation in der Kinasedomäne katalytisch inaktiviert, während die Bindungsfähigkeit über die SH2-Domäne erhalten blieb. Neben CSK_{R107K} und CSK_{K222R} wurde das Konstrukt CSK₅₇₋₂₀₄ verwendet, das nur die SH2-Bindungsdomäne beinhaltet.

Die funktionellen Eigenschaften der CSK-Mutanten wurden in separaten Experimenten kontrolliert:

1. Kontrolle der katalytischen Aktivität - Die katalytische Aktivität wurde über die *In-vitro*-Autophosphorylierung der CSK-Mutanten im Vergleich zu CSK_{wt} analysiert. Die CSK-Konstrukte wurden in COS7-Zellen transient transfiziert und über den Myc-Tag aus den Triton X-100-Lysaten präzipitiert. Zur Analyse der Autophosphorylierung wurden die Präzipitate mit [γ ³²P]-ATP radioaktiv markiert und über die SDS-Page getrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulose-Membranen erfolgte die Analyse der Autoradiographie. Zur Kontrolle der Proteinexpression wurden Aliquots der Lysate auf separaten Gelen im Western-Blot auf den Gehalt der CSK-Konstrukte analysiert.

Von den eingesetzten CSK-Konstrukten sind CSK_{wt} und CSK_{R107K} katalytisch aktiv und können sich selbst phosphorylieren (Abbildung 16A, freundlicherweise von Henrik Vorschmitt zur Verfügung gestellt). In beiden Präzipitaten ist die typische CSK_{wt}-Proteinbande bei 52kD zu detektieren. Für CSK_{K222R} und CSK₅₇₋₂₀₄ kann dagegen keine katalytische Aktivität nachgewiesen werden. In den Kontroll-Lysaten sind die detektierten Intensitäten der Proteinbanden von CSK_{wt}, CSK_{R107K} und CSK_{K222R} (52kD) in allen Ansätzen (Blot: α Myc) nahezu identisch, während die Expression von CSK₅₇₋₂₀₄ leicht reduziert ist.

2. Kontrolle der SH2-Domänen-Bindung an VE-Cadherin - Die Bindungsfähigkeiten der SH2-Domänen der CSK-Mutanten wurden über die Kopräzipitationen mit VE-Cadherin überprüft. CSK_{R107K} und CSK_{K222R} wurden mit VE-Cadherin in COS7 transient kotransfiziert und die Zellen, je nach Ansatz, vor der Lyse mit Pervanadat behandelt. Nach der Präzipitation der CSK-Konstrukte über den Myc-Tag aus den Triton X-100-Lysaten folgten die Trennung über die SDS-Page und der Transfer auf Nitrozellulose-Membranen. Die Expression der Proteine wurde wiederum über die Zell-Lysate kontrolliert. Die Analyse der präzipitierten und exprimierten Proteinmengen erfolgte im Western-Blot.

Sowohl CSK_{R107K} als auch CSK_{K222R} sind zur Bindung an VE-Cadherin fähig (Abbildung 16B). Die Mutation der SH2-Domäne (CSK_{R107K}) inhibiert die Bindungsfähigkeit dieser Domäne nicht vollständig. Allerdings wird die Fähigkeit zur Assoziation mit VE-Cadherin im Vergleich zu der funktionellen SH2-Domäne (CSK_{K222R}) erheblich reduziert.

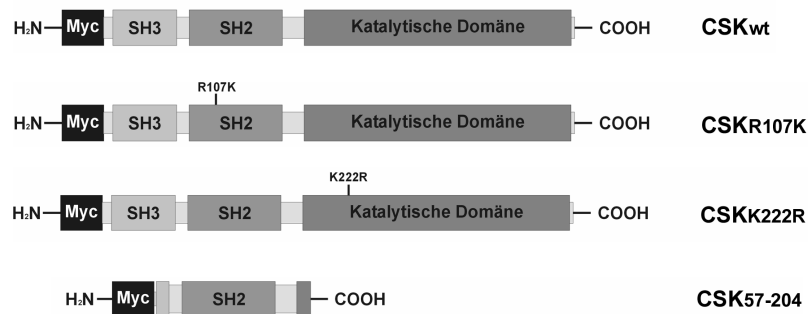
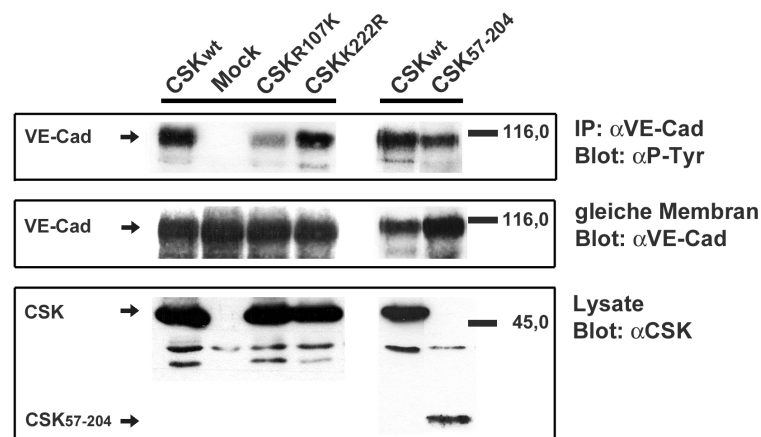
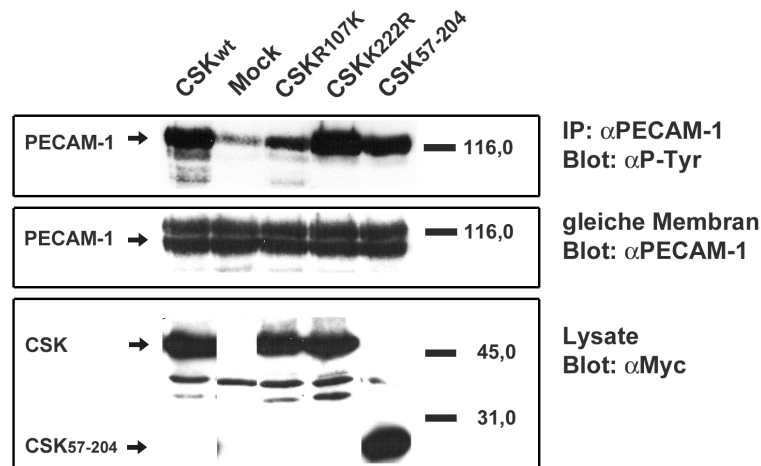
A**B****C**

Abbildung 15: Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin durch CSK. *A:* Schematische Übersicht der kotransfizierten CSK-Konstrukte. CSK_{R107K} kann aufgrund einer Mutation in der SH2-Domäne nur noch eingeschränkt mit VE-Cadherin assoziieren, während CSK_{K222R} katalytisch inaktiv ist. CSK₅₇₋₂₀₄ enthält als einziges, funktionelles Element die SH2-Domäne. *B & C:* VE-Cadherin und PECAM-1 wurden mit den CSK-Konstrukten transient in COS7 kotransfiziert. Nach der Triton X-100-Lyse der Zellen erfolgte die Präzipitation von VE-Cadherin bzw. PECAM-1, die Trennung der Präzipitate über die SDS-Page und der Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran. Die Menge an phosphorylierten Tyrosinen wurden im Western-Blot analysiert (1. Blot). Anschließend erfolgte die Analyse der präzipitierten Mengen an VE-Cadherin bzw. PECAM-1 auf derselben Membran (2. Blot). In einem separaten Western-Blot wurde die Expression der CSK-Konstrukte mit Hilfe der Zell-Lysate überprüft (3. Blot). Die voneinander abgesetzten Spuren (B) stellen die Ergebnisse von zwei separaten Experimenten dar.

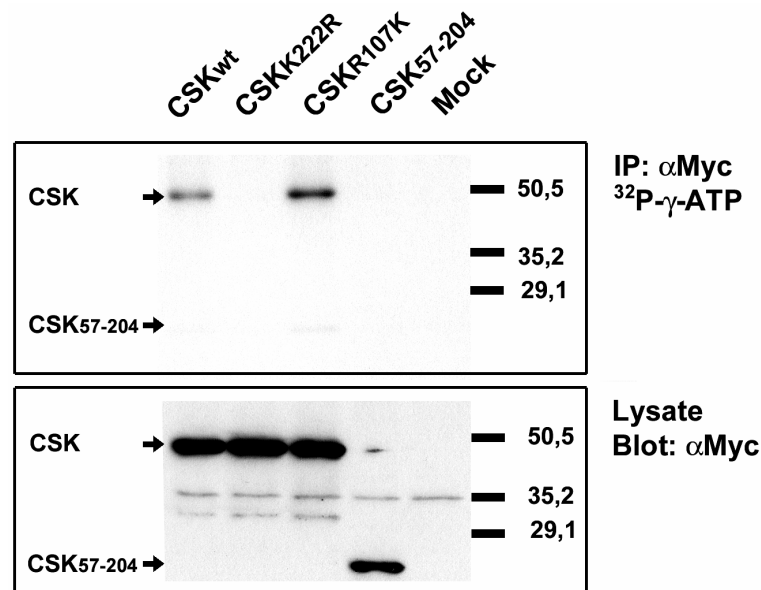
3. *Analyse der Tyrosin-Phosphorylierung* - Nach der transienten Transfektion von COS7 mit VE-Cadherin, PECAM-1 und den CSK-Konstrukten erfolgten die Präzipitationen von VE-Cadherin und PECAM-1 aus den Triton X-100-Lysaten, die Trennung der Proteine über die SDS-Page sowie der Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran. Mit Hilfe eines α P-Tyr-Antikörpers wurde im Immunoblot die Anwesenheit von phosphorylierten Tyrosinresten untersucht. Die Identifizierung der präzipitierten Proteine im Immunoblot gegen die Phosphotyrosine erfolgte über die Molekulargewichte sowie über die anschließenden Immunoblots mit spezifischen Proteinantikörpern auf derselben Membran. Die Kontrolle der Proteinexpressionen der CSK-Konstrukte in den Zell-Lysaten wurde in getrennten Western-Blots durchgeführt.

Nach der Expression von CSK_{wt} nimmt die Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin im Vergleich zu der „Grundphosphorylierung“ der „Mock“-Transfektion deutlich zu (Abbildung 15B). Die Expression von CSK_{K222R} führt zu einem vergleichbaren Anstieg der Tyrosin-Phosphorylierung, obwohl die Kinaseaktivität dieser Mutante vollständig inhibiert ist (vgl. Abbildung 16A). Eine Zunahme der Phosphorylierung kann auch durch die Kotransfektion mit der SH2-Domäne (CSK₅₇₋₂₀₄) herbeigeführt werden. Den geringsten Anstieg der Tyrosin-Phosphorylierung vermittelt die Expression des CSK mit der mutierten SH2-Domäne (CSK_{R107K}). Die Analyse der Proteinexpressionen mit Hilfe der Zell-Lysate zeigt, dass CSK_{wt}, CSK_{R107K} und CSK_{K222R} jeweils in einer vergleichbaren Menge exprimiert wird. Die Expression des CSK₅₇₋₂₀₄ ist im Vergleich zu den anderen Konstrukten etwas geringer.

Die Koexpression der CSK-Konstrukte mit PECAM-1 nimmt einen ähnlichen Einfluss auf die Tyrosin-Phosphorylierung der oberen Bande der PECAM-1-typischen Doppelbande (Abbildung 15C). CSK_{wt}, CSK_{K222R} und CSK₅₇₋₂₀₄ steigern die Phosphorylierung der Tyrosine in nahezu gleichem Umfang. Die geringste Menge an phosphorylierten Tyrosinresten ist nach der Expression von CSK_{R107K} zu detektieren.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass CSK nicht direkt über seine katalytische Kinaseaktivität an der Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin und PECAM-1 beteiligt zu sein scheint, denn die katalytisch inaktiven Konstrukte CSK_{K222R} und CSK₅₇₋₂₀₄ sind ebenfalls zur Steigerung der Phosphorylierung fähig. Die Änderung der Tyrosin-Phosphorylierung korreliert vielmehr mit der Bindungsfähigkeit der SH2-Domäne.

A



B

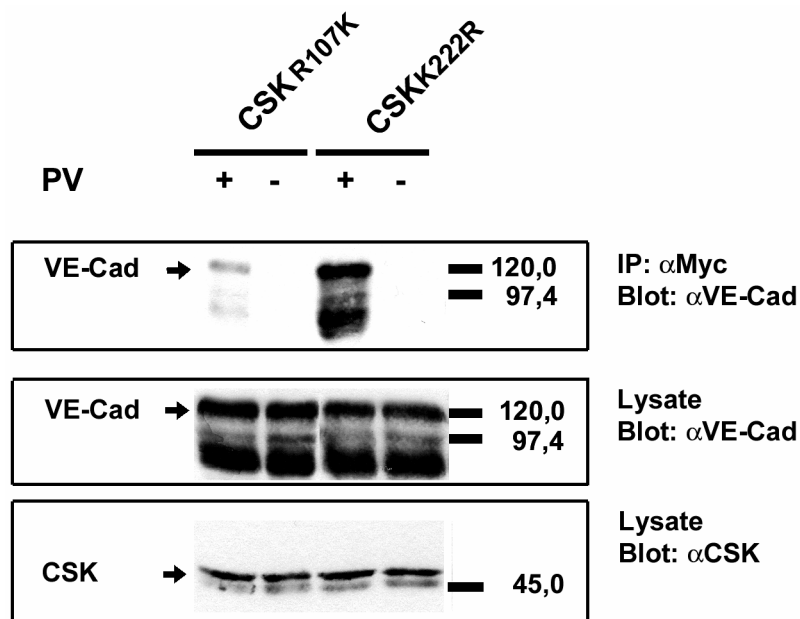


Abbildung 16: Funktionelle Kontroll-Experimente der CSK-Mutanten. **A:** Die CSK-Konstrukte wurden transient in COS7 transfiziert und über den Myc-Tag aus den Triton X-100-Lysaten präzipitiert. Anschließend erfolgte die In-vitro-Autophosphorylierung der Proteine mit [γ -³²P]-ATP. Nach der SDS-Page-Trennung und dem Trocknen des Gels wurde die Kinaseaktivität anhand der Autoradiographie analysiert. Die Expression der Proteine wurde über die Trennung von Lysat-Aliquots mit der SDS-Page, den Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran und den Immunoblot gegen den Myc-Tag kontrolliert (durchgeführt von Henrik Vorschmitt). **B:** Die CSK-Konstrukte wurden mit VE-Cadherin_{wt} transient in COS7 kotransfiziert. Nach der Inkubation einiger Ansätze mit Pervanadat (PV) erfolgte die Präzipitation der CSK-Konstrukte über den Myc-Tag aus den Triton X-100-Lysaten, die Trennung der Präzipitate mit Hilfe der SDS-Page und der Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran. Die Assoziation der CSK-Konstrukte mit VE-Cadherin wurde über Immunoblots gegen VE-Cadherin analysiert (1. Blot). Die Kontrolle der Proteinexpressionen erfolgte über die Zell-Lysate in separaten Western-Blots (2. und 3. Blot).

4.5.2 Der Einfluss von CSK auf die Zellkontaktintegrität

Die Frage, ob die Bindung von CSK an VE-Cadherin einen Einfluss auf die Integrität der über VE-Cadherin verstärkten Zellkontakte ausübt, wurde mit Hilfe von Permeabilitätsexperimenten untersucht. Die stabil mit VE-Cadherin_{wt} oder VE-Cadherin_{Y685F} und CSK_{wt} transfizierten Zellen wurden auf *Transwell*-Filtern ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Zur Veranschaulichung der VE-Cadherin vermittelten Stärkung der Zell-Zellkontakte wurden zusätzlich untransfizierte CHO-Zellen und VE-Cadherin transfizierte CHO-Zellen verwendet. Nach der Induktion von CSK wurde die innerhalb einer Stunde durch die Zellschicht diffundierte Menge eines Fluoreszenzfarbstoffes (FITC-Dextran, 42kD) über die Fluoreszenz ermittelt. Diese galt als Maß für die Durchlässigkeit der Zellschichten gegenüber Makromolekülen. Zur Berechnung der prozentualen Permeabilität wurden die gemessenen Fluoreszenzwerte der nicht induzierten Ansätze =100% gesetzt und die Werte nach der Induktion daran normiert. Dasselbe Verfahren wurde bei den CHO-Zellen (=100%) in Bezug auf die VE-CHO-Zellen verwendet.

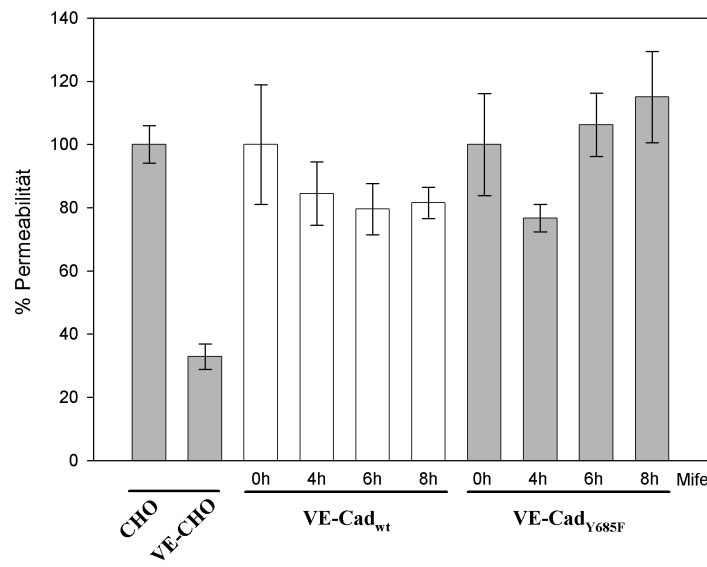


Abbildung 17: CSK nimmt keinen Einfluss auf die VE-Cadherin vermittelte Stärkung der Zell-Zellkontakte. Die CHO-Zellen (Klon 20,9, Klon 3,30 (s. 4.3.1), VE-Cadherin transfizierte Zellen und untransfizierte CHO-Zellen) wurden in *Transwell*-Filtern ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Nach der angegebenen Induktionsdauer mit Mifepristone wurden die Fluoreszenzen des durch die Zellschichten diffundierten Fluoreszenzfarbstoffes (FITC-Dextran, 42kD) als Maß für die Durchlässigkeit der Zellschichten gemessen. Die Werte der induzierten Ansätze wurden auf die der nicht induzierten Ansätze (=100%) normiert (bzw. die Werte der VE-Cadherin transfizierten Ansätze (VE-CHO) auf die Werte der untransfizierten CHO-Zellen). Die dargestellten Balken entsprechen n=3 Werten.

Durch die Expression von VE-Cadherin in CHO-Zellen wird die Durchlässigkeit der Zellschichten auf $32,9\% \pm 4\%$ der Durchlässigkeit untransfizierter Zellen reduziert und bestätigt die Verstärkung der Zell-Zellkontakte durch VE-Cadherin (Abbildung 17). Einen Einfluss der Assoziation von VE-Cadherin mit CSK auf diese Verstärkung kann allerdings nicht nachgewiesen werden. Zwar wird die Durchlässigkeit der VE-Cadherin_{wt}/CSK_{wt} transfizierten Zellen durch die Induktion von CSK_{wt} von $100\% \pm 18,9\%$ auf maximal $79,6\% \pm 8,1\%$ nach 6h reduziert, doch ist diese Abnahme nicht signifikant und konnte auch in weiteren Experimenten nicht hinreichend nachgewiesen werden.

4.5.3 Der Einfluss der CSK-VE-Cadherin-Assoziation auf die Adhäsivität des Cadherins

Die Untersuchung des Einflusses der CSK-VE-Cadherin-Bindung auf die VE-Cadherin vermittelte Ausbildung von Zell-Zellkontakten wurde mit Hilfe von Aggregationsexperimenten durchgeführt. Die stabil mit VE-Cadherin_{wt} oder VE-Cadherin_{Y685F} sowie induzierbaren CSK_{wt} transfizierten CHO-Zellen wurden mit und ohne Induktion von CSK_{wt} vereinzelt und die Anzahl der Partikel vor und nach der Inkubation für 1h bei 100rpm bestimmt. Die Aggregation definierte sich aus der Abnahme der Partikel durch die Zusammenlagerung der Zellen.

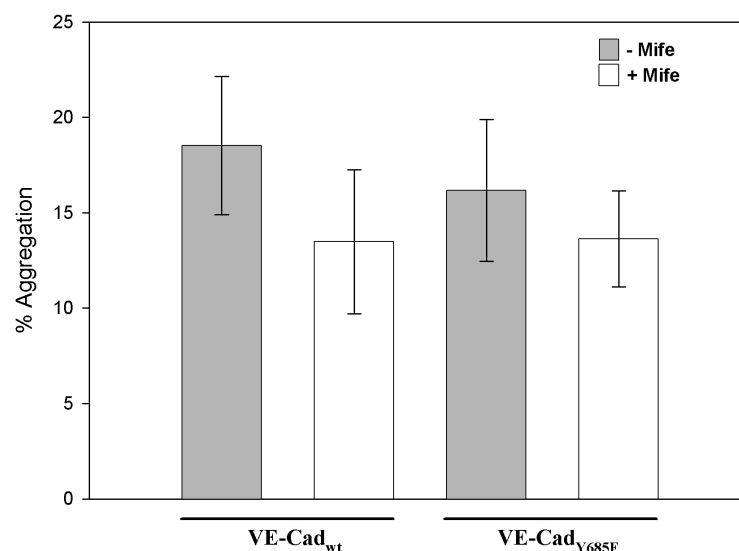


Abbildung 18: Die CSK-VE-Cadherin-Assoziation nimmt keinen Einfluss auf die Adhäsivität des Cadherins. Nach der +/- 6h Induktion von CSK_{wt} wurden die CHO-Zellen (Klon 20,9 und 3,30 (s. 4.3.1)) vereinzelt und die Anzahl der Partikel vor und nach der Inkubation für 1h bei 100rpm ausgezählt. Als Maß für die Aggregation wurden die Partikelzahlen aufeinander normiert. Die Balken stellen n=4 Werte dar.

Durch die Induktion von CSK_{wt} kann in den transfizierten CHO-Zellen keine signifikante Änderung der Aggregationsfähigkeit in Abhängigkeit von der Bindung zu VE-Cadherin gezeigt werden (Abbildung 18). In den VE-Cadherin_{wt}/CSK_{wt} transfizierten Zellen nimmt die Aggregationsfähigkeit von 18,5% ±3,6% auf 13,5% ±3,8% durch die Induktion ab, ein ähnlicher Effekt ist jedoch ebenfalls in den Zellen zu zeigen, in denen VE-Cadherin CSK nicht rekrutieren kann (nicht induziert: 16,2% ±3,7%, induziert: 13,6% ±2,5%). Ein Einfluss der Assoziation zwischen VE-Cadherin und CSK auf die Aggregationsfähigkeit von CHO-Zellen konnte somit nicht nachgewiesen werden.

4.5.4 Der Einfluss der CSK-VE-Cadherin-Assoziation auf die Proliferationsrate von CHO-Zellen

Neben der Ausbildung und Stabilisierung von Zell-Zellkontakten wird für VE-Cadherin in der Literatur eine weitere wichtige Funktion in der Regulation der Zellproliferation diskutiert. Bisher konnte gezeigt werden, dass VE-Cadherin an der Kontakt-Inhibition der Zellproliferation beteiligt ist (Caveda et al., 1996). In konfluenten Zellen nimmt VE-Cadherin an der Inhibition der VEGF stimulierten Proliferation teil (Lampugnani et al., 2003).

Die Frage, ob die Assoziation von VE-Cadherin und mit dem Src-Kinasen-Inhibitor CSK Einfluss auf die Zellproliferationsrate ausübt, wurde anhand von Proliferationsexperimenten mit CHO-Zellen untersucht. Der Zusammenhang zwischen der Proliferation und der Rekrutierung von CSK über VE-Cadherin wurde in transfizierten CHO-Zellen analysiert, die induzierbares CSK_{wt} sowie VE-Cadherin_{wt} oder die CSK-bindungsunfähige Mutante VE-Cadherin_{Y685F} exprimierten. Ob das transfizierte VE-Cadherin ebenfalls in den CHO-Zellen Kontakt inhibierend auf die Zellproliferation wirkt, wurde über die Blockierung von VE-Cadherin mit funktionellen Antikörpern bei verschiedenen Zelldichten untersucht. In den zusätzlich mit Flk-1 (VEGF-R2) transfizierten Zellen sollte der Einfluss dieser Rezeptor-Tyrosin-Kinase auf die Zellproliferation in Hinblick auf die VE-Cadherin-CSK-Assoziation geklärt werden.

Die VE-Cadherin-CSK-Assoziation nimmt Einfluss auf die Zellproliferation – Die stabil mit VE-Cadherin_{wt} (Klon 20,9 und 29,5) bzw. VE-Cadherin_{Y685F} (Klon 2,24 und 3,30) und CSK_{wt} transfizierten CHO-Zellen wurden in einer subkonfluenten Zelldichte ausgesät und über Nacht kultiviert. Nach der +/- Induktion von CSK_{wt} für 8h wurden die Zellen mit [Methyl-³H]-Thymidin metabolisch markiert und nach weiteren 20h geerntet. Die Analyse

der aufgenommenen Radioaktivitäten erfolgte mit Hilfe des *Scintillation Counters*. Die gemessenen Radioaktivitäten der induzierten Ansätze wurden in jedem Experiment gegenüber denen der nicht induzierten Ansätze normiert (nicht induziert entspricht dem Wert 100) und anschließend gemittelt. Zur Kontrolle der CSK_{wt}-Expression wurden die Harnstoff-SDS-Lysate der Klone 20,9 (VE-Cadherin_{wt}/CSK_{wt}) und 3,30 (VE-Cadherin_{Y685F}/CSK_{wt}) nach der Angleichung der Proteingehalte mit Hilfe des BCA-Tests im Western-Blot über den α Myc-Antikörper analysiert.

Durch die Induktion von CSK_{wt} wird in den Zell-Linien, in denen CSK an VE-Cadherin_{wt} bindet, die Proliferationsrate auf ca. 60% der nicht induzierten Zellen reduziert (Abbildung 19A, Klon 20,9: 61,2% \pm 8,9%, Klon 29,5: 63,1% \pm 9,9%). Im Gegensatz dazu bleibt die Proliferationsrate der Zell-Linien, in denen VE-Cadherin_{Y685F} keine Bindung zu CSK eingehen kann, nahezu unbeeinflusst von der Induktion des CSK_{wt} (Klon 2,24: 97,4% \pm 0,16%, Klon 3,30: 99,4% \pm 10,5%). Dass der detektierte Effekt der VE-Cadherin-CSK-Assoziation auf die Zellproliferation nicht auf einer unterschiedlichen Expressionsmenge an CSK_{wt} beruht, kann für die Klone 3,30 und 20,9 anhand der im Western-Blot analysierten Lysate ausgeschlossen werden (Abbildung 19B). Die Menge des Proteins nach 28h Induktion ist in den VE-Cadherin_{wt} transfizierten Zellen im Vergleich zu den VE-Cadherin_{Y685F} transfizierten Zellen sogar etwas reduziert.

Einfluss von VE-Cadherin auf die Kontakt-Inhibition der Zellteilung in CHO-Zellen – Zur Analyse des Einflusses von VE-Cadherin auf die Kontakt-Inhibition der Zellproliferation wurden die stabil mit VE-Cadherin_{wt} (Klon 20,9) bzw. VE-Cadherin_{Y685F} (Klon 3,30) und CSK_{wt} transfizierten CHO-Zellen in unterschiedlichen Dichten (subkonfluent bis konfluent) ausgesät und die von VE-Cadherin vermittelten Zell-Zellkontakte in einigen Ansätzen über Antikörper blockiert. Die drei eingesetzten monoklonalen Antikörper waren gegen die erste, dritte und fünfte extrazelluläre Domäne von VE-Cadherin gerichtet und reduzierten in Aggregationsexperimenten die Ausbildung von Zell-Zellkontakten (persönliche Mitteilung von Stephan Kloep). Die Werte der mit Antikörpern behandelten Ansätze wurden auf die Werte der nicht behandelten Ansätze (=100) normiert.

In beiden verwendeten Zell-Linien ist keine signifikante Auswirkung der VE-Cadherin-Blockierung mit Hilfe von Antikörpern auf die Zellproliferation zu beobachten (Abbildung 20). Dieses gilt sowohl für subkonfluent als auch für konfluent ausgesäte Zellschichten und ist unabhängig von der Mutation des VE-Cadherin_{Y685F}.

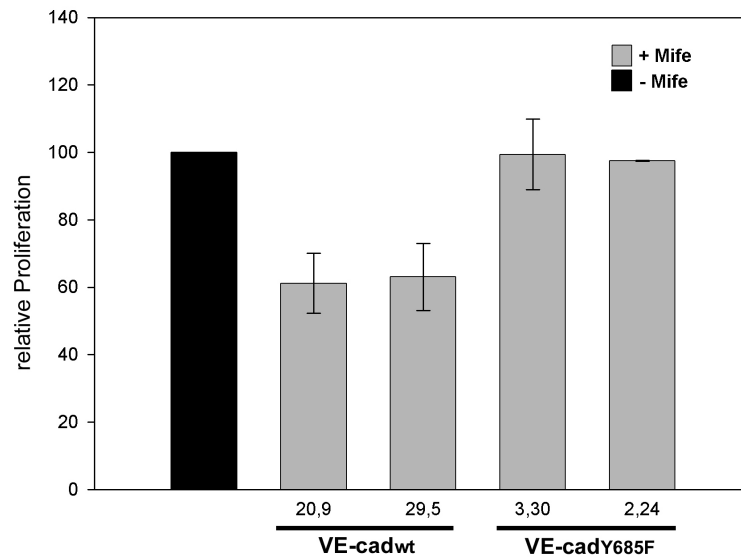
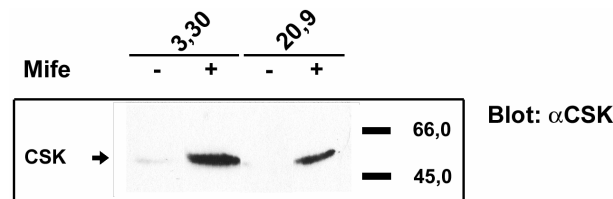
A**B**

Abbildung 19: Die CSK-VE-Cadherin-Assoziation reduziert die Zellproliferation von CHO-Zellen. **A:** Die mit VE-Cadherin_{wt}/CSK_{wt} (Klone 20,9 und 29,5) und VE-Cadherin_{Y685F}/CSK_{wt} (Klone 2,24 und 3,30) transfizierten Zellen wurden subkonfluent für +/- 8h induziert, anschließend für 20h mit Tritium-Thymidin markiert und geerntet. Die grauen Balken repräsentieren die gemittelten Radioaktivitäten der induzierten Zellen von 2 (Klon 2,24), 6 (Klone 29,5 und 3,30) und 7 (Klon 20,9) unabhängigen Experimenten mit je 6 einzelnen Werten und sind normiert auf die Werte der nicht induzierten Zellen (schwarzer Balken, =100). **B:** Kontrolle der CSK_{wt}-Expression nach 28h Induktion. Gleiche Proteinmengen von Harnstoff-SDS-Zell-Lysaten wurden auf den CSK_{wt}-Gehalt im Western-Blot analysiert.

Flk-1 nimmt keinen Einfluss auf die Zellproliferation in CHO-Zellen – Um den Einfluss von Flk-1 auf die über die VE-Cadherin-CSK-Assoziation vermittelte Reduktion der Proliferation zu analysieren, wurden die zusätzlich mit Flk-1 transfizierten Zell-Linien in den Proliferationsexperimenten verwendet. Durch die Überexpression ist diese Rezeptor-Tyrosin-Kinase konstitutiv aktiv und phosphoryliert in CHO-Zellen transfiziertes VE-Cadherin an den Tyrosinresten (Nawroth et al., 2002). Die Experimente wurden analog zu den nicht Flk-1 transfizierten Zellen durchgeführt.

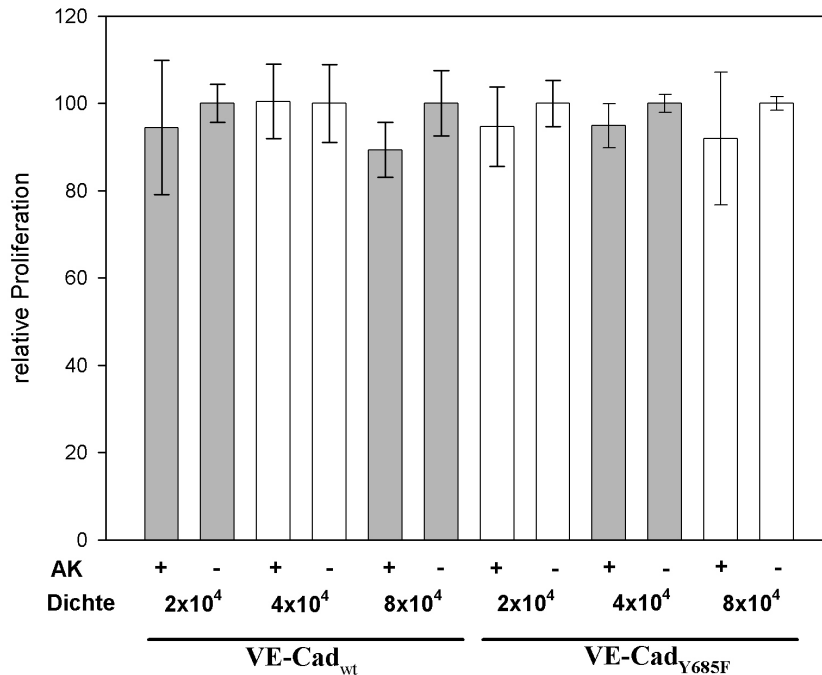


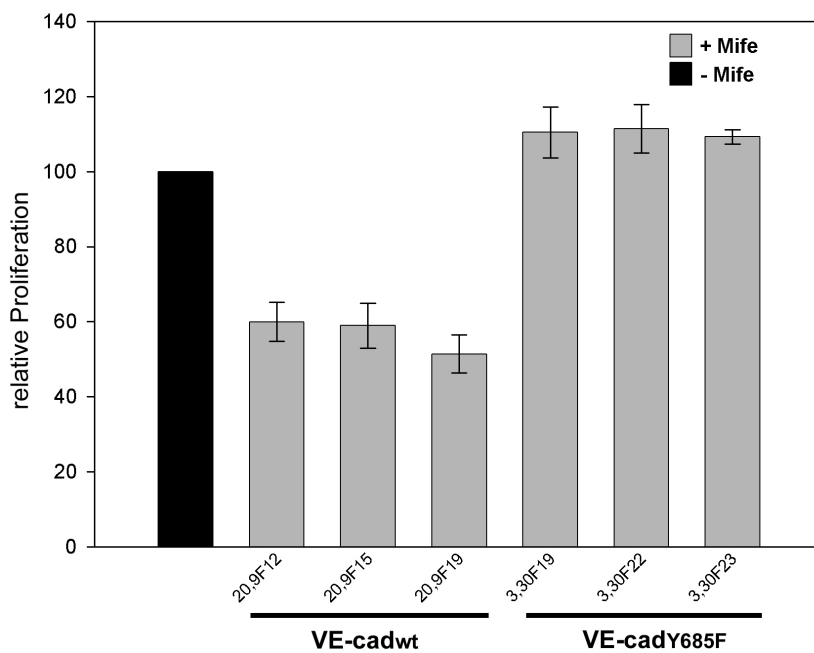
Abbildung 20: Die Kontakt-Inhibition der Proliferation kann in CHO-Zellen nicht über α VE-Cadherin-Antikörper inhibiert werden. Die stabil mit VE-Cadherin_{wt} bzw. VE-Cadherin_{Y685F} und CSK_{wt} transfizierten CHO-Zellen wurden in unterschiedlichen Dichten [Zellen/Schale] ausgesät, mit funktionellen Antikörpern gegen VE-Cadherin behandelt (VE1.1, VE57.1, 11D4.1, je 250 μ g/ml) und für 20h mit Tritium-Thymidin markiert. Die Balken repräsentieren die normierten Radioaktivitäten (nicht induziert = 100) von 4 einzelnen Messwerten (n=4).

In den Zellen, in denen die Assoziation zwischen VE-Cadherin und CSK stattfinden kann, wird die Proliferation der Zellen nach der CSK_{wt}-Induktion auf ca. 50-60% der Proliferation der nicht induzierten Zellen reduziert (Abbildung 21A, Klon 20,9F12: 59,9% \pm 5,1%, Klon 20,9F15: 59% \pm 6%, Klon 20,9F19: 51,4% \pm 5). Ohne die Assoziation von CSK an VE-Cadherin ist die Zellproliferationsrate nach der CSK_{wt}-Induktion gegenüber den nicht induzierten Zellen um ca. 10% erhöht (Klon 3,30F19: 110,5% \pm 6,8%, Klon 3,30F22: 111,4% \pm 6,4%, Klon 3,30F23: 109,3% \pm 1,9%). Die Kontrolle der Expression von CSK_{wt} (Abbildung 21B) zeigt in den Klonen 20,9F12-F19 und 3,30F19 die nahezu gleiche Menge an CSK_{wt}, während in den Klonen 3,30F22 und 3,30F23 die gebildete Menge an CSK_{wt} leicht reduziert ist.

Bei einem Vergleich der Proliferationsraten der mit und ohne Flk-1 transfizierten Zellen kann kein signifikanter Effekt von Flk-1 auf die CSK-VE-Cadherin-Assoziation vermittelte Reduktion der Zellteilung beobachtet werden (vgl. Abbildung 20 mit Abbildung 21). Zwar nimmt die Proliferationsrate in den Flk-1/VE-Cadherin_{wt} transfizierten Zellen nach

der Induktion insgesamt um wenige Prozente stärker ab (z.B. Klon 20,9F19: 51,4% \pm 5%, Klon 20,9:61,2% \pm 8,9%), allerdings ist dieser Effekt nicht signifikant. Auffällig ist, dass in den Zellen, in denen VE-Cadherin nicht mit CSK assoziiert, eine Zunahme der Proliferation nach der CSK_{wt}-Induktion von ca. 10% nur in den zusätzlich mit Flk-1 transfizierten Zellen zu beobachten ist. Aufgrund der Streuung der experimentellen Ergebnisse ist dieser Befund jedoch ebenfalls nicht signifikant nachzuweisen.

A



B

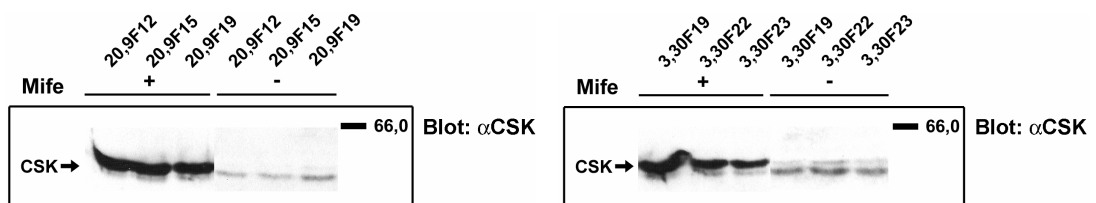


Abbildung 21: Flk-1 nimmt keinen Einfluss auf die VE-Cadherin/CSK vermittelte Reduktion der Proliferation in CHO-Zellen. **A:** Die mit Flk-1/VE-Cadherin_{wt}/CSK_{wt} (Klone 20,9F12-19) bzw. Flk-1/VE-Cadherin_{Y685F}/CSK_{wt} (Klone 3,30F19-23) transfizierten Zellen wurden subkonfluent für +/- 8h induziert, anschließend für 20h mit Tritium-Thymidin markiert und geerntet. Die grauen Balken repräsentieren die gemittelten Radioaktivitäten der induzierten Zellen von 3 (Klone 20,9F12 und 3,30F23) und 5 (übrige Klone) unabhängigen Experimenten mit je 6 einzelnen Werten und sind normiert auf die Werte der nicht induzierten Zellen (schwarzer Balken = 100). **B:** Kontrolle der CSK_{wt}-Expression nach 28h Induktion. Gleiche Proteinmengen von Harnstoff-SDS-Zell-Lysaten wurden auf den CSK_{wt}-Gehalt im Western-Blot analysiert.

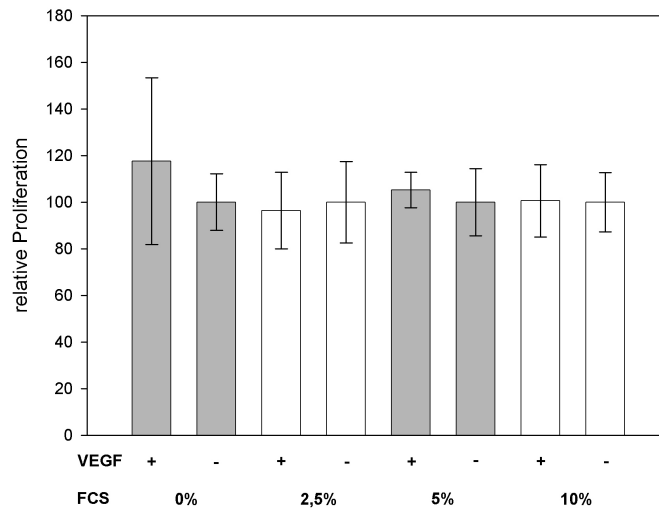
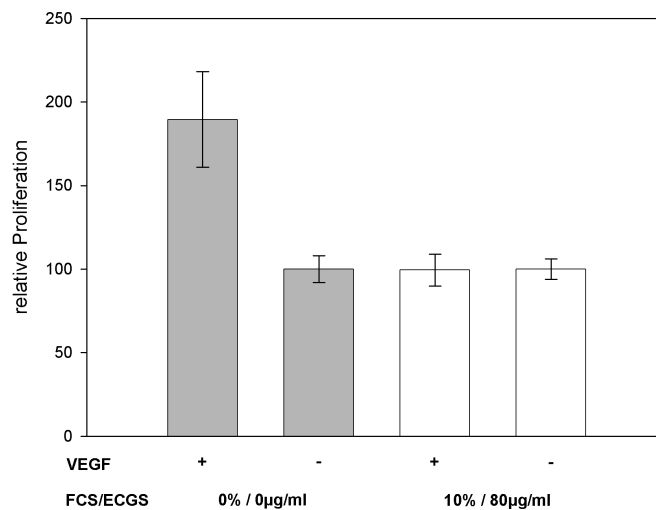
A**B**

Abbildung 22: Einfluss von VEGF auf die Zellproliferation. Die CHO- bzw. HUVEC-Zellen wurden in FCS- bzw. FCS/ECGS-Mangelmedium kultiviert und 8h vor der Tritium-Thymidinmarkierung mit 25ng/ml VEGF im subkonfluenten Zustand stimuliert. Die Balken repräsentieren die gemessenen, normierten Radioaktivitäten (nicht stimuliert: =100) von n=4 einzelnen Messungen. **A:** Einfluss von VEGF auf Flk-1/VE-Cadherin_{wt}/CSK_{wt} transfizierte CHO-Zellen. **B:** Einfluss von VEGF auf HUVEC-Zellen.

Da unter diesen Bedingungen kein Effekt von Flk-1 auf die Zellen nachzuweisen war, sollte die Aktivität dieser Rezeptor-Tyrosin-Kinase durch die Zugabe des Liganden VEGF gesteigert werden. Zur Reduktion der in dem FCS des Kulturmediums befindlichen Wachstumsfaktoren, die neben VEGF ebenfalls proliferationsfördernd sind, wurden die Zellen in Medien mit unterschiedlichen FCS-Anteilen (0%, 2,5%, 5% und 10%) über

Nacht kultiviert. Acht Stunden vor der Markierung mit Tritium-Thymidin wurden die mit Flk-1 transfizierten CHO-Zellen mit unterschiedlichen Mengen an VEGF (0-160 ng/ml) stimuliert und anschließend wie oben beschrieben behandelt. Als funktionelle Kontrolle wurde der Einfluss von 25ng/ml VEGF auf HUVEC-Zellen analysiert, die in FCS/ECGS-Mangelmedium kultiviert wurden. Die gemessenen Werte sind normiert auf die Proliferationsrate ohne VEGF-Stimulation (=100).

Durch die Zugabe von VEGF kann in den mit Flk-1 transfizierten Zellen keine signifikante Steigerung der Proliferation erreicht werden, unabhängig von dem Gehalt an FCS im Kulturmedium (Abbildung 22A). Im Gegensatz dazu findet in den HUVEC-Zellen eine deutliche Steigerung der Proliferationsrate nach der VEGF-Stimulation statt (Abbildung 22B, Steigerung auf 189% \pm 28,5%). Diese Steigerung der Zellteilung kann allerdings nur unter Ausschluss anderer Wachstumsfaktoren im Kulturmedium (FCS- und ECGS-Mangelmedium) nachgewiesen werden.

Von den durchgeführten Experimenten mit CHO-Zellen ist das Ergebnis eines exemplarischen Versuches dargestellt. In weiteren Experimenten wurden die VEGF-Konzentrationen variiert und Zellen mit unterschiedlichen Flk-1 Expressionen analysiert. Die Aussagen dieser Versuche waren allerdings nahezu identisch mit dem dargestellten Experiment.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit Hilfe der Proliferationsexperimente eine Reduzierung der Zellteilung von CHO-Zellen durch die Assoziation von VE-Cadherin mit CSK gezeigt werden konnte. Über die Induktion von CSK_{wt} wird die Proliferationsrate in VE-Cadherin_{wt} exprimierenden Zellen um ca. 40-50% verringert, während die Koexpression der bindungsunfähigen Mutante von VE-Cadherin diesen Effekt verhindert. Die Reduktion der Zellteilung ist unabhängig von der Flk-1-Expression. Die Abhängigkeit der Zellproliferation von der Blockierung der VE-Cadherin vermittelten Kontaktbildung über VE-Cadherin spezifische Antikörper konnte dagegen nicht nachgewiesen werden.

5 Diskussion

Die Bildung und Aufrechterhaltung der Diffusionsbarriere zwischen Blut und Geweben wird über die Auskleidung der Gefäße, dem Endothel, gewährleistet. Diese Zellbarriere ermöglicht die koordinierte Öffnung der lateralen Zell-Zellkontakte und darüber den selektiven Austausch von Substanzen und Zellen des Immunsystems. Neben den Regulationsprozessen in ausgewachsenen Gefäßen ist das Endothel zusätzlich an der Neubildung und der Wundheilung von Gefäßen beteiligt. Die komplexen Mechanismen der Vaskulogenese und der Angiogenese werden u.a. durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren gesteuert, deren Signale in die Endothelzellen übertragen werden und dort zelluläre Antworten induzieren. Abhängig von der Größe und der Funktion der Gefäße werden die Zell-Zellkontakte über eine Reihe von unterschiedlichen Strukturen gebildet, denen z.B. die „tight junctions“, die *Complexi Adhaerentes* und die „adherence junctions“ zugeordnet werden. Innerhalb des Endothels sind die „adherence junctions“ von besonderer Bedeutung. In den postkapillären Venolen, in denen die Transmigration von Leukozyten und die Versorgung der Gewebe mit Nährstoffen stattfinden, werden die Zell-Zellkontakte größtenteils über diese „junctions“ gebildet. Die in den „junctions“ vorzufindenden transmembranen Adhäsionsmoleküle sind die zentralen Bestandteile der Zellkontakte. In den „adherence junctions“ ist das Transmembranprotein VE-Cadherin lokalisiert, das mit weiteren VE-Cadherinen der Nachbarzelle in *trans*-Konformation dimerisiert und darüber die Kontakte knüpft. Intrazellulär ist VE-Cadherin über β -, γ - und α -Catenin mit dem Zytoskelett assoziiert. Die Ausbildung des Komplexes und die Kopplung an das Zytoskelett moduliert die Adhäsivität des Cadherins und die Integrität der Zell-Zellkontakte, über die die Permeabilitätseigenschaften des Endothels kontrolliert werden (Vleminckx and Kemler, 1999). Die Variation der Zusammensetzung des Cadherin-Catenin-Komplexes während verschiedener Wachstumsstadien der Zellen und funktionellen Zellzuständen geht mit einer Änderung des Tyrosin-Phosphorylierungsgrades der Komponenten einher. Dieses deutet auf die funktionelle Regulation des Komplexes über die Phosphorylierung der Tyrosine hin, denn die Stabilität der Zell-Zellkontakte nimmt mit zunehmender Tyrosin-Phosphorylierung ab (Volberg et al., 1991). Bis jetzt sind wenige Phosphatasen und Kinasen identifiziert worden, die in verschiedenen Zelltypen mit den Cadherin-Catenin-Komplexen assoziieren oder deren Phosphorylierungsstatus modulieren. So konnte bis heute gezeigt werden, dass der Cadherin-Catenin-Komplex in Epithelzellen über Enzyme aus der Familie der Src-Kinasen phosphoryliert und die Zell-Zellkontakte geschwächt werden (Tsukita et al., 1991). Spezi-

fisch für das Endothel ist die Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin über den aktivierten VEGF-R2 und die darauf folgende Reduzierung der Diffusionsbarriere. Diese Reaktion wird allerdings nicht direkt über die RTK katalysiert, sondern durch zytosolische Kinasen der Src-Familie (Esser et al., 1998; Lin et al., 2003). Eine endothelspezifische Dephosphorylierung des VE-Cadherins konnte für die Phosphatasen VE-PTP und DEP-1 nachgewiesen werden (Lampugnani et al., 2003; Nawroth et al., 2002).

Neben der Funktion als Regulator der Zellkontakte wird in dem Cadherin-Catenin-Komplex eine wichtige Kontrollinstanz bei der Signalweiterleitung des Wachstumsfaktors VEGF vermutet. Einerseits ist während der frühen embryonalen Gefäßneubildung, der Vaskulogenese, die Assoziation von VE-Cadherin und β -Catenin für die Weiterleitung des VEGF-Signals notwendig. Dieses Signal begünstigt das Zellwachstum und die Differenzierung der Endothelzellen gegenüber der Apoptose (Carmeliet et al., 1999). Andererseits scheint der Cadherin-Catenin-Komplex die VEGF vermittelte Steigerung der Zellproliferation in vollständig ausgebildeten Endothelien zu reduzieren bzw. zu unterbinden (Lampugnani et al., 2003). Demnach vermittelt der Cadherin-Catenin-Komplex in Abhängigkeit vom Stadium der Zellen auf denselben Stimulus unterschiedliche Reaktionen der Zellen. Dieses deutet auf eine genau abgestimmte Regulation der funktionellen Proteine hin, die mit dem Cadherin-Catenin-Komplex interagieren.

5.1 „C-terminal-Src-Kinase“, ein VE-Cadherin assoziiertes Protein

Im Rahmen dieser Dissertation konnte mit Hilfe des „yeast two hybrid“-Systems erstmals die „C-terminal Src-Kinase“ (CSK) als VE-Cadherin assoziiertes Protein identifiziert werden. In den durchgeführten *In-vitro*- und *In-vivo*-Experimenten wurde diese Interaktion bestätigt und deren Abhängigkeit von der Tyrosin-Phosphorylierung des VE-Cadherins nachgewiesen.

CSK ist eine zytosolische Protein-Tyrosin-Kinase, die Ende der 80er Jahre kloniert wurde (Okada and Nakagawa, 1988). Mit ihren 450 Aminosäuren (50,8kD) umfasst diese Kinase drei funktionelle Domänen. N-terminal befindet sich die SH3 („src homology“) Domäne gefolgt von der SH2- und der katalytischen Domäne (Nada et al., 1991). Die SH3- und SH2-Domänen sind Bindungsdomänen, über die diese Kinase mit anderen Proteinen interagiert. Die SH3-Domäne bindet an prolinreiche Sequenzen, während die SH2-Domäne definierte Bindungssequenzen mit einem phosphorylierten Tyrosin erkennt.

Das dominante Substrat für CSK sind die zytosolischen Protein-Tyrosin-Kinasen der Src-Familie, deren Struktur der von CSK ähnlich ist. Die Src-Kinasen besitzen ebenfalls die SH3-, SH2- und eine katalytische Domäne. Zusätzlich befindet sich N-terminal von der SH3-Domäne eine SH4-Domäne mit einem myristylierten Glycin, das die Kinasen zur Bindung an die Innenseite der Zellmembran befähigt. Im Gegensatz zu CSK besitzen Src-Kinasen C-terminal ein konserviertes Tyrosin (z.B. Tyr₅₂₇ der c-Src), über dessen Phosphorylierung die Aktivität des Enzyms reguliert werden kann. Im phosphorylierten Zustand bindet dieses Tyrosin intramolekular an die eigene SH2-Domäne und deaktiviert die Kinase über die nachfolgende Konformationsänderung. Die Dephosphorylierung dieses Tyrosins stellt die Kinaseaktivität wieder her. CSK katalysiert die Phosphorylierung dieses regulatorischen Tyrosins und ist daher ein negativer Regulator der Src-Kinasen-Aktivität (Nada et al., 1991). Für CSK selbst ist bislang kein eindeutiger Regulationsmechanismus nachgewiesen worden. Wahrscheinlich liegt diese Kinase ungebunden im inaktivierten Zustand vor. Intramolekulare Wechselwirkungen zwischen dem SH3 und SH2 liegenden Verbindungsstück und der katalytischen Domäne scheinen diese Domäne nach der Bindung an die Liganden zu aktivieren (Shekhtman et al., 2001). Während die Src-Kinasen größtenteils über die Myristylierung ihres N-Terminus an der Zellmembran verankert sind und nur im geringen Umfang frei im Zytosol vorliegen (Tatosyan and Mizenina, 2000) ist CSK ein zytosolisches Protein, das bei Bedarf über seine Bindungsdomänen an die Orte der Src-Aktivitäten rekrutiert wird. Eine direkte Anbindung an die Src-Kinasen konnte bislang nicht nachgewiesen werden, so dass die regulatorische Phosphorylierung der Src-Kinasen durch CSK erst nach einer indirekten Assoziation stattfinden kann.

Neben der hier gezeigten Interaktion von CSK mit VE-Cadherin konnten bislang nur wenige membranständige aber auch zytosolische Proteine identifiziert werden, mit denen CSK interagiert. Häufig sind diese Proteine in Komplexen lokalisiert, die an Wegen der Src vermittelten Signalweiterleitung beteiligt sind. Eines dieser Proteine ist das ubiquitär exprimierte transmembrane Adapterprotein PAG/Cbp („phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains“/„CSK-binding protein“)(Brdicka et al., 2000). Cbp ist in T-Zellen zusammen mit Proteinen der T-Zellrezeptor vermittelten Signalweiterleitung in Membranmikrodomänen („lipid rafts“) lokalisiert. Neben diesem Adapterprotein befinden sich Mitglieder der Src-Kinasen, die von CSK reguliert werden, in dem Komplex. CSK bindet mit Hilfe der SH2-Domäne an phosphoryliertes Cbp, dessen Tyrosin-Phosphorylierung von der Aktivierung der T-Zellen abhängig ist. Weitere Adaptermoleküle, die phosphorylierungsabhängig CSK über dessen SH2-Domäne rekrutieren, sind Dok-3,

das u.a. an der negativen Regulation der Signalweiterleitung von Immunrezeptoren der B-Zellen beteiligt ist (Lemay et al., 2000) und Paxillin der fokalen Adhäsionskontakte (Sabe et al., 1994). Neben der Bindung an die Adapterproteine konnte für CSK auch die Assoziation mit den zytosolischen Phosphatasen PEP, PEP-PEST und PTP-HSCF nachgewiesen werden (Cloutier and Veillette, 1996; Davidson et al., 1997; Wang et al., 2001).

Anhand der Interaktion von CSK mit diesen Phosphatasen werden die beiden möglichen Mechanismen der CSK-Assoziation verdeutlicht: Die Bindungen an PEP bzw. PEP-PEST werden über die SH3-Domäne von CSK vermittelt, während CSK mit Hilfe der SH2-Domäne mit PEP-HSCF interagiert. Funktionell wird in diesen Assoziationen ein synergistischer Effekt der Proteine während der Inhibition der Src-Kinasen vermutet: Die Phosphatase dephosphoryliert das regulatorische Tyrosin des katalytischen Zentrums der Src-Kinasen, dessen Phosphorylierung zur Aktivierung der Kinasen notwendig ist, während CSK das regulatorische Tyrosin des C-Terminus phosphoryliert (Wang et al., 2001).

5.1.1 Die Vermittlung der CSK-Bindung an VE-Cadherin über die SH2-Domäne

Die SH2-Domänen vermittelte Bindung von Enzymen, Adapterproteinen oder Strukturproteinen an ihre Liganden ist ein häufig anzutreffendes Bindungsprinzip (Alberts et al., 2004). Die Motive, an die diese Domänen binden, bestehen aus einer definierten Aminosäuresequenz, die ein phosphoryliertes Tyrosin enthalten. Über die Phosphorylierung dieses Tyrosins wird die Kontrolle der Anbindung gewährleistet. Durch die Arbeiten dieser Dissertation konnte dieses Bindungsprinzip auch für die Interaktion zwischen VE-Cadherin und CSK aufgrund folgender Befunde abgeleitet werden:

1. Das mit Hilfe des „yeast two hybrid“-Systems identifizierte CSK-Fragment (Aminosäuren 57-204), das mit VE-Cadherin interagiert, beinhaltet als einzige vollständige und funktionelle Komponente die SH2-Domäne der Kinase. In den *In-vitro*-Interaktionsexperimenten konnte bestätigt werden, dass die isolierte SH2-Domäne zur Bindung an VE-Cadherin befähigt ist.
2. Die Assoziation von VE-Cadherin mit CSK sowie mit der isolierten SH2-Domäne ist abhängig von der Phosphorylierung der Cadherin-Tyrosine. Diese Abhängigkeit ist ein signifikantes Merkmal der SH2 vermittelten Bindung (Songyang et al., 1994).
3. Die Verringerung der Affinität der CSK-SH2-Domäne über die Mutation des Arginins (R107K) reduziert die Assoziation von VE-Cadherin mit der Kinase. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die Mutation des Arginins₁₀₇ nicht zur vollständigen Unter-

bindung der SH2-Bindungskapazität ausreicht (Lemay et al., 2000), so dass weiterhin eine reduzierte Assoziation detektiert wird.

4. Die SH2-Domäne bindet an ein spezifisches Bindungsmotiv. Das Bindungsmotiv der CSK-SH2-Domäne (pTyr–Thr/Ala/Ser–X–Met/Ile/Val)(Songyang et al., 1994) ist in der Aminosäuresequenz von VE-Cadherin an den Positionen 685-688 (pTyr–Thr–Gln–Val) lokalisiert. Die Mutation des Tyrosins₆₈₅ von VE-Cadherin unterbindet die Interaktion von VE-Cadherin mit CSK sowohl in den *In-vitro*- als auch in den *In-vivo*-Interaktionsexperimenten unabhängig von dem VE-Cadherin-Phosphorylierungsstatus.

Innerhalb der Cadherin-Familie ist VE-Cadherin das einzige Protein, das in der Aminosäuresequenz ein CSK-SH2-Bindungsmotiv aufweist (die AS-Sequenzen der Cadherine wurden rezensiert von Nollet et al. (Nollet et al., 2000)). In Übereinstimmung damit konnte für N-Cadherin in den *In-vitro*-Interaktionsexperimenten dieser Dissertation keine Assoziation mit CSK nachgewiesen werden. N-Cadherin ist neben VE-Cadherin ein weiteres klassisches Cadherin, das von Endothelzellen exprimiert wird. Dieses ist allerdings nicht in den lateralen Zell-Zellkontakten, sondern entlang der gesamten Zellmembran lokalisiert. Aufgrund seiner Verteilung wird angenommen, dass N-Cadherin Kontakte zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen bildet (Navarro et al., 1998). Dies weist darauf hin, dass die Assoziation mit CSK ein endothelspezifischer Mechanismus des VE-Cadherins ist. Allerdings werden für die Festigung dieser Hypothese zusätzliche Untersuchungen benötigt.

In dem vorherigen Abschnitt wurde bereits ausgeführt, dass CSK mit weiteren membranständigen Adapterproteinen, wie z.B. PAG/Cbp, Dok-3 und Paxillin, über die SH2-Domäne assoziieren kann. Vermutlich sind einige der CSK bindenden Proteine für eine schwache Rekrutierung dieser Kinase an die Zellmembran in den immunhistochemischen Färbungen verantwortlich. Die endogene Phosphorylierung mit Hilfe von Pervanadat führt zu einer unspezifischen Protein-Tyrosin-Phosphorylierung, die neben VE-Cadherin auch andere CSK-bindende Proteine umfasst. In den VE-Cadherin_{wt} exprimierenden Zellen wird deren Assoziation mit CSK von der Interaktion mit VE-Cadherin überlagert. Die Detektion dieser Interaktionen wird erst durch die Unterbindung der VE-Cadherin-CSK-Bindung über die Tyrosinmutation möglich. Die schwache Rekrutierung von CSK an die Membranen in den mit Pervanadat behandelten, VE-Cadherin_{Y685F} exprimierenden Zellen könnte auf diese Interaktionen zurückzuführen sein.

Die Bindungsmotive der SH2-Domänen sind spezifisch für die jeweiligen Proteine, die diese Domäne enthalten. So konnte z.B. die Bindung der SH2-Domäne von CSK an PTP-HSCF nachgewiesen werden (Wang et al., 2001). Zusätzlich wurden in dieser Studie die Assoziationen der SH2-Domänen von Chk, einer CSK verwandten Kinase, sowie anderer Kinasen und Phosphatasen (z.B. Lck, Fyn, SHIP) mit PTP-HSCF untersucht. Eine effiziente Bindung konnte allerdings nur die SH2-Domäne von CSK vermitteln. Dementsprechend können über ein einzelnes Protein spezifisch mehrere SH2 vermittelte Bindungspartner rekrutiert werden, ohne dass kompetitive Konkurrenz um die Bindungsstelle auftritt. Für VE-Cadherin wurde das Strukturprotein Shc als weiterer Bindungspartner identifiziert, das ebenfalls über die SH2-Domäne an die zytosolische Domäne bindet (Zanetti et al., 2002). Obwohl das Bindungsmotiv der Shc-SH2-Domäne noch nicht genau in der VE-Cadherin-Aminosäuresequenz definiert wurde, scheint diese innerhalb der Catenin-Bindungssequenz des C-terminalen Endes (AS702-784) lokalisiert zu sein. Das CSK-SH2-Bindungsmotiv (AS685-688) ist räumlich davon getrennt, so dass theoretisch eine gemeinsame Bindung an VE-Cadherin nicht ausgeschlossen ist. Eine zeitgleiche Bindung von CSK, p120^{ctn} und den Cateninen ist theoretisch ebenfalls möglich. Das Bindungsmotiv der SH2-Domäne von CSK befindet sich zwischen der „juxtamembranen Domäne“ mit dem p120^{ctn}-Bindungsmotiv und dem Bereich der Catenin-Bindungssequenz von VE-Cadherin (Nollet et al., 2000). Eine sterische Behinderung der CSK-Anbindung durch p120^{ctn} sowie den Cateninen ist daher unwahrscheinlich.

5.2 Die indirekte Beeinflussung der Phosphotyrosine des VE-Cadherin durch CSK

Der VE-Cadherin vermittelte Aufbau der Zell-Zellkontakte und die Weiterleitung der VEGF stimulierten Signale korrelieren mit einer Änderung des Phosphorylierungsstatus dieses Transmembranproteins. Die Kinase CSK scheint nicht aktiv über die katalytische Aktivität an der Phosphorylierung von VE-Cadherin beteiligt zu sein. Die Änderung der Menge an Phosphotyrosinen innerhalb von VE-Cadherin beruht vielmehr auf der Anbindungsfähigkeit der SH2-Domäne. Das Prinzip der Protektion der Phosphotyrosine über SH2-Domänen wurde bereits für die Assoziation der Phosphatase PTP-HSCF mit CSK beschrieben (Wang et al., 2001). Wang et al. konnten analog zu den Ergebnissen dieser Dissertation zeigen, dass die isolierte SH2-Domäne ausreicht, um eine erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung zu detektieren. Für diesen Mechanismus könnten zwei Ursachen in Fra-

ge kommen: Einerseits schützt die SH2-Domäne das bereits phosphorylierte Bindungstyrosin nach der Anbindung vor der Dephosphorylierung durch endogene Phosphatasen. Andererseits könnte die CSK-SH2-Domäne die Anbindung endogener Phosphatasen kompetitiv inhibieren. Voraussetzung dafür wäre eine SH2-Domänen vermittelte Assoziation der Phosphatase mit VE-Cadherin, deren SH2-Bindungsmotiv mit dem CSK-SH2-Motiv identisch ist. Eine entsprechende Phosphatase wurde jedoch bis jetzt nicht identifiziert.

Theoretisch ist unter physiologischen Bedingungen ein weiterer indirekter Einfluss von VE-Cadherin assoziiertem CSK auf dessen Tyrosin-Phosphorylierung möglich, der im COS7-Zellsystem allerdings nicht nachgewiesen werden konnte. CSK könnte nach der Rekrutierung die Phosphorylierung weiterer VE-Cadherin-Tyrosine über die Inaktivierung endogener Src-Kinasen verhindern. Dieses Modell entspräche den bisher beschriebenen Mechanismen der Rekrutierung von CSK zu den Stellen der Src-Aktivität und der anschließenden Deaktivierung der Src-Kinasen. Neben dem Tyrosin₆₈₅ besitzt murines VE-Cadherin in seiner zytosolischen Domäne sieben zusätzliche Tyrosine (Breier et al., 1996), die potenzielle Substrate für die Src-Kinasen darstellen. Einige dieser Tyrosine könnten die Bindungen weiterer Mediatoren an VE-Cadherin vermitteln, wie es z.B. für das Strukturprotein Shc nachgewiesen wurde (Zanetti et al., 2002). Bislang wurde für VE-Cadherin noch keine Kinase identifiziert, die dessen Tyrosin-Phosphorylierung direkt katalysiert. Allerdings wird die Beteiligung der Src-Kinasen bei der Phosphorylierung von VE-Cadherin durch den aktivierten VEGF-R2 vermutet (Esser et al., 1998; Lin et al., 2003). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass in HUVEC-Zellen die VEGF stimulierte Phosphorylierung von VE-Cadherin sowohl über die chemische Inhibition der Src-Kinasen-Aktivierung als auch durch exogenes CSK blockiert bzw. reduziert werden kann (Lin et al., 2003). Diese Reduktion ist der erste Hinweis auf die Teilnahme von src-verwandten Kinasen an der Regulation der VEGF stimulierten VE-Cadherin-Phosphorylierung in primären endothelialen Zellen.

Neben VE-Cadherin wurde PECAM-1 als ein weiteres endotheliales Adhäsionsprotein identifiziert, dessen Tyrosin-Phosphorylierung von CSK beeinflusst wird (Cao et al., 1998). PECAM-1 besitzt theoretisch zwei potenzielle CSK-SH2-Bindungsstellen in seiner zytosolischen Domäne. Die relevanten Tyrosine dieser Motive befinden sich an den Positionen 663 und 686, von denen das Tyrosin 686 nach der Koexpression mit CSK phosphoryliert vorliegt. In dieser Studie bleibt allerdings offen, ob PECAM-1 mit CSK über dessen SH2-Domäne direkt interagiert und inwieweit diese Kinase aktiv oder passiv an der Tyrosin-Phosphorylierung teilnimmt. Die Ergebnisse dieser Dissertation deuten darauf hin, dass

die CSK abhängige PECAM-1-Phosphorylierung über denselben Mechanismus verläuft, der für VE-Cadherin gezeigt wurde. Analog zu der Assoziation mit VE-Cadherin ist die Menge an Phosphotyrosinen innerhalb von PECAM-1 abhängig von der Expression der SH2-Domäne und deren Fähigkeit zur Anbindung, während die Inaktivierung der katalytischen CSK-Domäne im Vergleich zu CSK_{wt} keine Änderung der Phosphorylierung bewirkt.

5.3 Physiologische Relevanz der Assoziation von VE-Cadherin mit CSK

Soweit bislang bekannt ist, ist die physiologische Funktion von CSK eng verknüpft mit der Funktion seines Substrats, den Kinasen aus der Src-Familie. Der Prototyp der Src-Kinasen wurde erstmalig als das transformierende Protein (*v*-Src) des *Rous sarcoma*-Virus identifiziert und ist die mutierte Variante des zellulären *c*-Src (Stehelin et al., 1976). Der viralen *v*-Src fehlt im Vergleich zu *c*-Src das regulatorische Tyrosin des C-Terminus, das in *c*-Src über CSK phosphoryliert wird. Als Folge entzieht sich *v*-Src der negativen Regulation und ist konstitutiv aktiv. Mittlerweile sind eine Reihe weiterer Kinasen dieser Familie charakterisiert worden (u.a. Fyn, Yes, Lck, Lyn, Blk, Fgr, Hck und die Unterfamilie der Frk-Kinasen). Die Expression der Enzyme in den Geweben ist von Kinase zu Kinase unterschiedlich. Während Src, Fyn und Yes überwiegend ubiquitär exprimiert werden, liegen Hck, Lck sowie Lyn vornehmlich in hämatopoetischen Zellen vor (Bolen and Brugge, 1997). Die Funktionen der Src-Kinasen decken ein breites Spektrum der Zellregulation ab. Dieses umfasst die Umstrukturierung des Zytoskeletts, die Zelldifferenzierung, die Regulation der Adhäsion und der Migration sowie der Apoptose und der Angiogenese (Thomas and Brugge, 1997). Aufgrund ihrer Einflussnahme auf die große Anzahl an zellulären Prozessen ist die Regulation dieser Kinasen elementar für geordnete Zellfunktionen. Eine gestörte Regulation ist häufig an einer onkogenen Entwicklung von Zellen beteiligt (rezensiert von Frame (Frame, 2002)). So konnte z.B. gezeigt werden, dass konstitutiv aktivierte *c*-Src analog zu der viralen *v*-Src zur Transformation von Zellen sowie zur Ausbildung von Tumoren führt. Für CSK wird dagegen eine antionkogene Wirkung beschrieben. Die Expression dieses Inhibitors der Src-Kinasen vermindert z.B. die Metastasierung von Krebszellen des Darms (Nakagawa et al., 2000).

5.3.1 Einfluss von CSK auf die Cadherin-Adhäsivität und die Integrität der Zell-Zellkontakte

Die Einflussnahme der Src-Kinasen auf die Integrität der Zell-Zellkontakte wurde bislang in Epithelzellen untersucht. Die Aktivierung von temperatursensitiver v-Src in epithelialen MDCK-Zellen führt zu einer erhöhten Phosphorylierung von E-Cadherin der „adherence junctions“ und den assoziierten Komplexproteinen (Behrens et al., 1993). Diese korreliert mit dem Verlust der Zell-Zellkontakte und der Umverteilung des E-Cadherins über die gesamte Zellmembran. Zusätzlich ist eine erhöhte invasive Fähigkeit der Zellen zu beobachten. Dieser Prozess ist über die Deaktivierung der v-Src (durch Modulation der Temperatur) umkehrbar. Diese Studie belegt, dass einerseits die Aufrechterhaltung der Zell-Zellkontakte in den „adherence junctions“ über Aktivierung der Src-Kinase unterbunden wird und dass andererseits dieser Prozess über die Aktivität der Kinase regulierbar ist.

Es konnte bisher gezeigt werden, dass in Endothelien die Integrität der Zell-Zellkontakte mit der Tyrosin-Phosphorylierung des Cadherin-Catenin-Komplexes korreliert. So führt z.B. die Stimulation von Endothelzellen mit VEGF-A neben der Tyrosin-Phosphorylierung der Cadherin-Catenin-Komplexkomponenten auch zur Reduktion der Zellkontaktintegrität und der damit einhergehenden Steigerung der Permeabilität (Esser et al., 1998). In CHO-Zellen wird die Integrität der VE-Cadherin vermittelten Zellkontakte über die Tyrosin-Dephosphorylierung des VE-Cadherins mit Hilfe der Phosphatase VE-PTP erhöht (Nawroth et al., 2002) und die Adhäsivität des Cadherin gesteigert (persönliche Mitteilung von Stephan Kloep). Effekte auf die Adhäsionsfunktion konnten allerdings für die Assoziation von VE-Cadherin und CSK im Rahmen dieser Dissertation nicht signifikant nachgewiesen werden. Als Ursache für diese negativen Befunde können sowohl methodische als auch physiologische Gründe in Frage kommen. Es ist möglich, dass unter physiologischen Bedingungen CSK nicht an der Ausbildung und Aufrechterhaltung der VE-Cadherin vermittelten Zellkontakte beteiligt ist. Die Regulation der Zell-Zellkontakte korreliert zwar mit dem Phosphorylierungsstatus des Cadherins, in COS7 konnte jedoch für CSK keine aktive Phosphorylierung von VE-Cadherin nachgewiesen werden. D.h. die Adhäsivität von VE-Cadherin und die Integrität der Zellkontakte wird wahrscheinlich nicht über die Bindung von CSK beeinflusst. Methodisch ist es jedoch möglich, dass das verwendete CHO-Zellsystem nicht über die nötige Proteinausstattung verfügt, über die in Endothelzellen ein möglicher Effekt der CSK-VE-Cadherin-Assoziation vermittelt würde. Zurzeit werden in unserem Labor Endothelium-Zellen mit deletiertem VE-Cadherin hergestellt, die mit VE-Cadherin_{wt} und VE-Cadherin_{Y685F} retransfiziert werden. Die Verwendung dieser Retrans-

fektanten in Aggregations- und Permeabilitätsexperimenten könnte die Frage klären, inwieweit die Assoziation von VE-Cadherin und CSK die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Zell-Zellkontakte beeinflusst.

5.3.2 Die Regulation der Zellproliferation über die Assoziation von CSK und VE-Cadherin

Verschiedene Studien konnten bislang belegen, dass die Cadherine an der Regulation der Zellproliferation in Abhängigkeit von der Zellkonfluenz beteiligt sind. Die exogene Expression von E-Cadherin EMT/6 in Karzinom-Zellen, die für dieses Protein defizient sind, reduziert deren Proliferationsrate. Die Blockierung der E-Cadherin-Dimerisierung über Antikörper wird in diesen als auch in humanen Lungen,- Darm- und Brust-Karzinom-Zellen von einem Anstieg des aufgenommenen Tritium-Thymidins begleitet (St. Croix et al., 1998). Mit VE-Cadherin transfizierte CHO-Zellen weisen im Vergleich zu den Kontrollzellen eine reduzierte Proliferation mit steigender Konfluenz auf. Dieser Effekt wird über die Deletion der Catenin-Bindungssequenz sowie die Blockierung der VE-Cadherin-Dimerisierung mit Hilfe von funktionellen Antikörpern unterbunden (Caveda et al., 1996). Für CSK wurde bislang noch keine Teilnahme an der Zell-Zellkontakt vermittelten Regulation der Zellproliferation beschrieben. Allerdings führt die Deletion von CSK in Maus-embryonen zu einer abnormalen Vergrößerung der Blutgefäße des Dottersacks und zu einer Reduzierung der quervernetzenden Gefäße. Dieser Phänotyp deutet auf eine gestörte Regulation der Angiogenese in den Embryonen hin (Duan et al., 2004; Imamoto and Soriano, 1993; Nada et al., 1993).

Im Rahmen dieser Dissertation konnte nachgewiesen werden, dass die Zellproliferation von CHO-Zellen durch die Assoziation von VE-Cadherin mit CSK reduziert wird. Voraussetzung für diese Reduktion ist die Fähigkeit des VE-Cadherins, mit CSK eine Bindung einzugehen. Die Abhängigkeit der verminderten Zellteilung von der Konfluenz der Zellen konnte bislang über den Tritium-Thymidin-Einbau nicht nachgewiesen werden. Auch ohne die Expression von VE-Cadherin regulieren CHO-Zellen Dichte abhängig ihre Proliferationsrate und bilden zweidimensionale Monoschichten. Dementsprechend könnte in diesem Zellsystem eine Überlagerung der CSK vermittelten und der endogenen Regulation der Zellproliferation vorliegen. Allerdings zeigt eine nicht genauer quantifizierte Beobachtung, dass die absolute Zellzahl von konfluenten VE-Cadherin_{wt} exprimierenden Zellen auf einer definierten Fläche geringer ist als die von konfluenten VE-Cadherin_{Y685F} exprimierenden Zellen. Dieses würde auf die Teilnahme des Tyrosins_{Y685F} an der VE-Cadherin vermittelten

Regulation der Proliferation hindeuten. Zurzeit werden von Ruth Funke in unserem Labor Experimente durchgeführt, die diese Beobachtung genauer analysieren werden.

Basierend auf der Annahme, dass auch im Endothel die Assoziation von VE-Cadherin und CSK Einfluss auf die Proliferationsrate der Zellen nimmt, kann ein hypothetischer Mechanismus über die Teilnahme von CSK innerhalb der VEGF-R2 vermittelten Signalweiterleitung abgeleitet werden (s. Abbildung 23). Dieser gründet sich auf die bisher beschriebenen Inhibitionen verschiedener Signaltransduktionswege durch die Rekrutierung von CSK zu den Orten der Src-Kinasen-Aktivität. So konnte z.B. in Blutplättchen gezeigt werden, dass CSK zusammen mit Src in dem α IIb β 3-Integrin-Komplex kolokalisiert und dass darüber die Src-Kinase im inaktivierten Zustand gehalten wird. Die Adhäsion der Plättchen an Fibrinogen wird von der CSK-Dissoziation aus dem Komplex begleitet, die wiederum zur Aktivierung der Src-Kinase führt. Die Src-Kinase ist nun in der Lage, die nachfolgende Signalweiterleitung zu aktivieren und letztendlich die Umstrukturierung des Zytoskeletts einzuleiten (Oberfell et al., 2002). Eine ähnliche Funktion könnte CSK bei der VEGF-R2 vermittelten Signalweiterleitung erfüllen. In kontaktinhibierten Zellen, zu denen z.B. diejenigen des ausgebildeten Endothels gezählt werden, ist die Zellantwort auf die Stimuli von Wachstumsfaktoren reduziert (Fagotto and Gumbiner, 1996; Vinals and Pouyssegur, 1999). Bislang konnte nachgewiesen werden, dass die Tyrosinreste von VE-Cadherin in konfluenten Zellen nach der Stimulation mit VEGFA über den VEGF-R2 phosphoryliert werden (Esser et al., 1998; Lampugnani et al., 2003). Diese Reaktion wird vermutlich nicht direkt über den aktivierten VEGF-R2 katalysiert, sondern indirekt über rezeptorgekoppelte Src-Kinasen (Eliceiri et al., 1999; Lin et al., 2003). Die erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin schafft nach dem Modell die Voraussetzung für die Bindung von CSK über die SH2-Domäne. Mit VE-Cadherin assoziiertes CSK befindet sich in räumlicher Nähe der an VEGF-R2 gebundenen Src-Kinase und kann diese sowie die nachfolgenden Signalwege deaktivieren. Der Phosphorylierungsgrad des VEGF-R2 ist nach dessen Stimulation in konfluenten Zellen gegenüber dem in subkonfluenten Zellen wesentlich erniedrigt. Sowohl die Phosphorylierungen des VE-Cadherins als die auch des VEGF-R2 unterliegen in konfluenten Zellen nach der Stimulation einer Kinetik. Während die Phosphorylierung des VEGF-R2 nach fünf Minuten das Maximum aufweist und die Tyrosine in den folgenden 25min dephosphoryliert werden, erreicht die Phosphorylierung von VE-Cadherin das Maximum nach ca. 30min. Auch in den folgenden 16 Stunden bleibt ein erhöhter Phosphorylierungsgrad erhalten (Esser et al., 1998). Die schnelle Dephosphorylierung des VEGF-R2 in konfluenten Zellen wird vermutlich über rekrutierte Phosphatasen vermittelt, wie

z.B. über die Konfluenz abhängige Phosphatase DEP-1 oder die endothelspezifische Phosphatase VE-PTP. Zu den rekrutierten Phosphatasen würde CSK synergistisch wirken, indem die Phosphatasen die Dephosphorylierungen katalysieren und CSK die erneute Phosphorylierung über die Src-Kinasen verhindert.

Die Rekrutierung von CSK über VE-Cadherin hätte ebenfalls Einfluss auf die Phosphorylierung der nachfolgenden Proteine des Signalweges. So wird z.B. das Gerüstprotein Shc über die Aktivierung des VEGF-R2 phosphoryliert, assoziiert nachfolgend mit Grb-Sos und Ras und fördert auf diese Weise die Zellproliferation. In konfluenten Zellen wird Shc von phosphoryliertem VE-Cadherin über seine SH2-Domäne rekrutiert und innerhalb des Komplexes von dort befindlichen Phosphatasen dephosphoryliert. Als Folge wird der nachfolgende Signaltransduktionsweg unterbrochen (Zanetti et al., 2002). Rekrutiertes CSK könnte die Dephosphorylierung von Shc synergistisch unterstützen, indem es die erneute Phosphorylierung des Proteins über die Src-Kinasen verhindert.

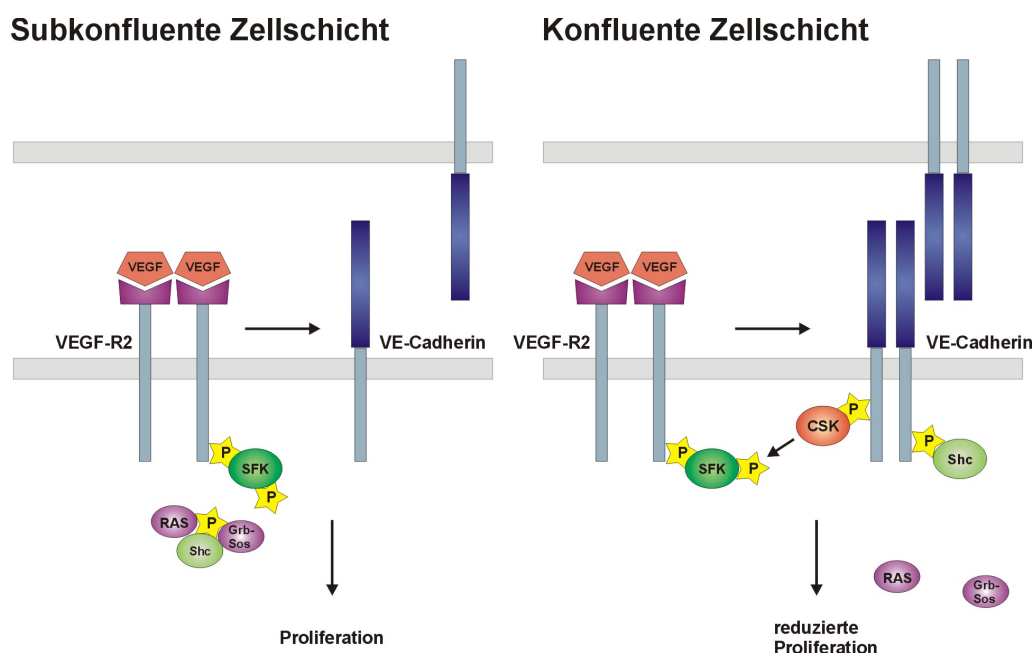


Abbildung 23: Theoretisches Modell der Teilnahme von CSK an der VE-Cadherin vermittelten Kontakt-Inhibition der VEGF stimulierten Zellproliferation. In konfluenten Zellen führt die Phosphorylierung von VE-Cadherin über den aktivierten VEGF-R2 zur Bindung von CSK. Dieses inhibiert die über VEGF-R2 rekrutierten Kinasen der Src-Familie (SFK) und unterbindet die weitere Phosphorylierung der Komplexproteine. Nachfolgende, Phosphotyrosin abhängige Signalwege, wie z.B. der des Gerüstproteins Shc, werden darüber unterbrochen.

Unterstützt wird dieses Modell durch die Hinweise darauf, dass die Src-Kinasen an der VEGF-Regulation der Angiogenese beteiligt sind. Esser konnte 1999 zeigen, dass in einem Mausmodell die VEGF vermittelte Angiogenese sowohl über eine katalytisch inaktive Src-Kinase als auch über die Expression von CSK reduziert wird (Esser et al., 1998).

In HUVEC-Zellen wird die Phosphorylierung von VE-Cadherin nach der Stimulation der Zellen mit VEGF sowohl über einen chemischen Inhibitor der Src-Kinasen-Aktivierung als auch durch exogenes CSK reduziert. Geringe Dosen des Inhibitors sowie exogenes CSK verhindern die Formierung der Gefäßsprosse, während hohe Dosen des Inhibitors zusätzlich die Proliferation der Zellen reduzieren (Lin et al., 2003).

Neben VE-Cadherin wird das Adhäsionsprotein PECAM-1 über den aktivierten VEGF-R2 phosphoryliert (Esser et al., 1998). Die Untersuchungen der vorliegenden Dissertation zeigten, dass die Bindung der CSK-SH2-Domäne zur erhöhten Phosphorylierung von PECAM-1 ausreicht. Im Gegensatz zu VE-Cadherin ist dieses Adhäsionsprotein nicht an der Kontakt-Inhibition der Zellproliferation beteiligt (Halama et al., 1999), so dass die Inhibition der Proliferation nach der Ausbildung der Zell-Zellkontakte offenbar ein VE-Cadherin spezifischer Mechanismus im Endothel ist.

Bislang konnte in den durchgeführten Experimenten keine Abhängigkeit der Zellproliferation von der Expression des VEGF-R2 in CHO-Zellen nachgewiesen werden. Die Ursache für dieses Ergebnis könnte in der unvollständigen Ausstattung der CHO-Zellen mit den notwendigen Proteinen begründet sein. So ist z.B. die Phosphatase VE-PTP spezifisch für das Endothel und wird in CHO-Zellen nicht exprimiert (Nawroth et al., 2002). Außerdem bleibt offen, ob der aktivierte VEGF-R2 in CHO- und Endothelzellen dieselbe Kinase rekrutiert.

Als zusammenfassendes Ergebnis dieser Dissertation ist festzuhalten, dass VE-Cadherin mit CSK assoziiert. Die Bindung der beiden Proteine erfordert die Phosphorylierung des VE-Cadherin-Tyrosins₆₈₅ und wird über die CSK-SH2-Domäne vermittelt. VE-Cadherin ist das einzige klassische Cadherin mit einem CSK-SH2-Bindungsmotiv, so dass diese Assoziation vermutlich ein VE-Cadherin spezifischer Mechanismus ist. Die Kinase CSK katalysiert nicht aktiv die Phosphorylierung der VE-Cadherin-Tyrosine, stattdessen werden die Phosphotyrosine indirekt über die Bindung der SH2-Domäne vor der Dephosphorylierung geschützt. In funktionellen Zellstudien mit VE-Cadherin_{wt}, VE-Cadherin_{Y685F} sowie induzierbarem CSK exprimierenden Zellen konnte kein Einfluss dieser Assoziation auf die Adhäsivität des Cadherins und die Integrität der Zellkontakte nachgewiesen werden. Die

Proliferation der Zellen, in denen VE-Cadherin mit CSK assoziiert, wird durch die Expression von CSK jedoch signifikant reduziert. Bislang können die Ergebnisse der Zellproliferation von transfizierten CHO-Zellen nur als Modell für die „echte“ VE-Cadherin vermittelte Kontakt-Inhibition der Zellproliferation im Endothel angesehen werden. Für die weiterführenden, experimentellen Untersuchungen werden zurzeit in unserem Labor VE-Cadherin defiziente Endotheliom-Zell-Linien hergestellt, die mit VE-Cadherin_{wt} und VE-Cadherin_{Y685F} retransfiziert und in Proliferationsexperimenten analysiert werden. Parallel dazu wird der Einfluss der Inhibition der endogenen CSK-Expression (mit Hilfe der siRNA) auf die Proliferation von HUVEC-Zellen untersucht. In derselben Zell-Linie soll demnächst zusätzlich geklärt werden, welchen Einfluss die Zelldichte und die Aktivierung des VEGF-R2 auf die Assoziation zwischen VE-Cadherin und CSK nimmt.

6 Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2004) Molekularbiologie der Zelle. *Wiley-VCH-Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim*.
- Anderson, J.M. and Van Itallie, C.M. (1995a) Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am. J. Physiol.*, **269**, 467-475.
- Anderson, J.M. and Van Itallie, C.M. (1995b) Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol*, **269**, G467-475.
- Andriopoulou, P., Navarro, P., Zanetti, A., Lampugnani, M.G. and Dejana, E. (1999) Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, **19**, 2286-2297.
- Balda, M.S., Whitney, J.A., Flores, C., Gonzalez, S., Cerejido, M. and Matter, K. (1996) Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J. Cell Biol.*, **134**, 1031-1049.
- Balsamo, J., Arregui, C., Leung, T. and Lilien, J. (1998) The nonreceptor protein tyrosine phosphatase PTP1B binds to the cytoplasmic domain of N-cadherin and regulates the cadherin-actin linkage. *J. Cell Biol.*, **143**, 523-532.
- Barth, A.I., Nathke, I.S. and Nelson, W.J. (1997) Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 683-690.
- Baumhueter, S., Dybdal, N., Kyle, C. and Lasky, L.A. (1994) Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood*, **84**, 2554-2565.
- Bazzoni, G., Martinez Estrada, O. and Dejana, E. (1999) Molecular structure and functional role of vascular tight junctions. *Trends Cardiovasc Med*, **9**, 147-152.
- Behrens, J., Vakaet, L., Friis, R., Winterhager, E., Van Roy, F., Mareel, M.M. and Birchmeier, W. (1993) Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/b-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-src gene. *J. Cell Biol.*, **120**, 757-766.
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. and Birchmeier, W. (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, **382**, 638-642.
- Bixby, J.L. (2001) Ligands and signaling through receptor-type tyrosine phosphatases. *IUBMB Life*, **51**, 157-163.
- Bolen, J.B. and Brugge, J.S. (1997) Leukocyte protein tyrosine kinases: potential targets for drug discovery. *Annu Rev Immunol*, **15**, 371-404.
- Boller, K., Vestweber, D. and Kemler, R. (1985) Cell-adhesion molecule uvomorulin is localized in the intermediate junctions of adult intestinal epithelial cells. *J. Cell. Biol.*, **100**, 327-332.
- Braga, V.M.M., Del Maschio, A., Machesky, L. and Dejana, E. (1999) Regulation of cadherin function by Rho and Rac. modulation by junction maturation and cellular context. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 9-22.
- Braga, V.M.M., Machesky, L.M., Hall, A. and Hotchin, N.A. (1997) The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J. Cell Biol.*, **137**, 1421-1431.
- Brdicka, T., Pavlistova, D., Leo, A., Bruyns, E., Korinek, V., Angelisova, P., Scherer, J., Shevchenko, A., Hilgert, I., Cerny, J., Drbal, K., Kuramitsu, Y., Kornacker, B., Horejsi, V. and Schraven, B. (2000) Phosphoprotein associated with glycosphingoli-

- pid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation. *J Exp Med*, **191**, 1591-1604.
- Breier, G., Breviario, F., Caveda, L., Berthier, R., Schnurch, H., Gotsch, U., Vestweber, D., Risau, W. and Dejana, E. (1996) Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood*, **87**, 630-641.
- Breviario, F., Caveda, L., Corada, M., Martin Padura, I., Navarro, P., Golay, J., Introna, M., Gulino, D., Lampugnani, M.G. and Dejana, E. (1995) Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **15**, 1229-1239.
- Burns, A.R., Walker, D.C., Brown, E.S., Thurmon, L.T., Bowden, R.A., Keese, C.R., Simon, S.I., Entman, M.L. and Smith, C.W. (1997) Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners. *J. Immunol.*, **159**, 2893-2903.
- Burrige, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G. and Turner, C. (1988) Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol*, **4**, 487-525.
- Butcher, E.C. (1991) Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, **67**, 1033-1036.
- Cambier, J.C. (1997) Inhibitory receptors abound? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5993-5995.
- Cao, M.Y., Huber, M., Beauchemin, N., Famiglietti, J., Albelda, S.M. and Veillette, A. (1998) Regulation of mouse PECAM-1 tyrosine phosphorylation by the Src and Csk families of protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.*, **273**, 15765-15772.
- Carmeliet, P., Lampugnani, M.-G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oosthuysen, B., Dewerchin, M., Zanetti, A., Angellilo, A., Mattot, V., Nuyens, D., Lutgens, E., Clotman, F., de Ruiter, M.C., Gittenberger-de Groot, A., Poelmann, R., Lupu, F., Herbert, J.-M., Collen, D. and Dejana, E. (1999) Targeted Deficiency or Cytosolic Truncation of the VE-cadherin Gene in Mice Impairs VEGF-Mediated Endothelial Survival and Angiogenesis. *Cell*, **98**, 147-157.
- Caveda, L., Martin-Padura, I., Navarro, P., Breviario, F., Corada, M., Gulino, D., Lampugnani, M.G. and Dejana, E. (1996) Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin). *J. Clin. Invest.*, **98**, 886-893.
- Cloutier, J.F. and Veillette, A. (1996) Association of inhibitory tyrosine protein kinase p50csk with protein tyrosine phosphatase PEP in T cells and other hemopoietic cells. *Embo J*, **15**, 4909-4918.
- Corada, M., Mariotti, M., Thurston, G., Smith, K., Kunkel, R., Brockhaus, M., Lampugnani, M.G., Martin-Padura, I., Stoppacciaro, A., Ruco, L., McDonald, D.M., Ward, P.A. and Dejana, E. (1999) Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9815-9820.
- Daniel, J.M. and Reynolds, A.B. (1995) The tyrosine kinase substrate p120cas binds directly to E-cadherin but not to the adenomatous polyposis coli protein or alpha-catenin. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 4819-4824.
- Daniel, J.M. and Reynolds, A.B. (1997) Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function. *Bioessays*, **19**, 883-891.
- Davidson, D., Cloutier, J.F., Gregorieff, A. and Veillette, A. (1997) Inhibitory tyrosine protein kinase p50csk is associated with protein-tyrosine phosphatase PTP-PEST in hemopoietic and non-hemopoietic cells. *J Biol Chem*, **272**, 23455-23462.

- Dejana, E. (1996) Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J. Clin. Invest.*, **98**, 1949-1953.
- Dejana, E., Corada, M. and Lampugnani, M.G. (1995) Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J.*, **9**, 910-918.
- DeLisser, H.M., Chilkotowsky, J., Yan, H.C., Daise, M.L., Buck, C.A. and Albelda, S.M. (1994) Deletions in the cytoplasmic domain of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) result in changes in ligand binding properties. *J. Cell Biol.*, **124**, 195-203.
- Diamond, J. (1977) The epithelial junction: bridge, gate and fence. *Physiologist*, 10-18.
- Dor, Y. and Keshet, E. (1997) Ischemia-driven angiogenesis. *Trends in Cardiovascular Medicine*, **7**, 289-294.
- Duan, L.J., Imamoto, A. and Fong, G.H. (2004) Dual roles of the C-terminal Src kinase (Csk) during developmental vascularization. *Blood*, **103**, 1370-1372.
- Dvorak, H.F., Brown, L.F., Detmar, M. and Dvorak, A.M. (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*, **146**, 1029-1039.
- Dvorak, H.F., Nagy, J.A., Feng, D., Brown, L.F. and Dvorak, A.M. (1999) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*, **237**, 97-132.
- Eastman, Q. and Grosschedl, R. (1999) Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 233-240.
- Ebnet, K., Schulz, C.U., Meyer-zu-Brickwedde, M.-K., Pendl, G.G. and Vestweber, D. (2000) Junctional Adhesion Molecule (JAM) interacts with the PDZ domain containing proteins AF-6 and ZO-1. *J. Biol. Chem.*, **275**, 27979-27988.
- Ebnet, K., Suzuki, A., Ohno, S. and Vestweber, D. (2004) Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci*, **117**, 19-29.
- Eliceiri, B.P., Paul, R., Schwartzberg, P.L., Hood, J.D., Leng, J. and Cheresch, D.A. (1999) Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell*, **4**, 915-924.
- Eriksson, U. and Alitalo, K. (1999) Structure, expression and receptor-binding properties of novel vascular endothelial growth factors. *Curr Top Microbiol Immunol*, **237**, 41-57.
- Esser, S., Lampugnani, M.G., Corada, M., Dejana, E. and Risau, W. (1998) Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J. Cell Sci.*, **111**, 1853-1865.
- Fagotto, F. and Gumbiner, B.M. (1996) Cell contact-dependent signaling. *Dev Biol*, **180**, 445-454.
- Fanning, A.S. and Anderson, J.M. (1998) PDZ domains and the formation of protein networks at the plasma membrane. *Curr Top Microbiol Immunol*, **228**, 209-233.
- Farquhar, M.G. and Palade, G.E. (1963) Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol*, **17**, 375-412.
- Feng, D., Nagy, J.A., Pyne, K., Dvorak, H.F. and A.M., D. (1998) Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J. Exp. Med.*, **187**, 903-915.
- Ferrara, N. (1999) Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol*, **237**, 1-30.
- Ferrara, N. and Davis-Smyth, T. (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, **18**, 4-25.
- Fields, S. and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.

- Flamme, I., Frolich, T. and Risau, W. (1997) Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol*, **173**, 206-210.
- Frame, M.C. (2002) Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta*, **1602**, 114-130.
- Frank, S., Hubner, G., Breier, G., Longaker, M.T., Greenhalgh, D.G. and Werner, S. (1995) Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*, **270**, 12607-12613.
- Fuchs, M., Muller, T., Lerch, M.M. and Ullrich, A. (1996) Association of human protein-tyrosine phosphatase kappa with members of the armadillo family. *J. Biol. Chem.*, **271**, 16712-11679.
- Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H.E., Behrens, J., Sommer, T. and Birchmeier, W. (2002) Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol*, **4**, 222-231.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K. and Tsukita, S. (1998a) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*, **141**, 1539-1550.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. and Tsukita, S. (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.*, **123**, 1777-1788.
- Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K. and Tsukita, S. (1998b) A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol*, **143**, 391-401.
- Garrod, D.R. (1986) Desmosomes, cell adhesion molecules and the adhesive properties of cells in tissues. *J Cell Sci Suppl*, **4**, 221-237.
- Geiger, B., Volk, T. and Volberg, T. (1985) Molecular heterogeneity of adherens junctions. *J Cell Biol*, **101**, 1523-1531.
- Gerber, H.P., Dixit, V. and Ferrara, N. (1998a) Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, **273**, 13313-13316.
- Gerber, H.P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B.A., Dixit, V. and Ferrara, N. (1998b) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem*, **273**, 30336-30343.
- Gluzman, Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, **23**, 175-182.
- Gory-Faure, S., Prandini, M.H., Pointu, H., Roullot, V., Pignot-Paintrand, I., Vernet, M. and Huber, P. (1999) Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development*, **126**, 2093-2102.
- Goto, F., Goto, K., Weindel, K. and Folkman, J. (1993) Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest*, **69**, 508-517.
- Gotsch, U., Borges, E., Bosse, R., Böggemeyer, E., Simon, M., Mossmann, H. and Vestweber, D. (1997) VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J. Cell Sci.*, **110**, 583-588.
- Gumbiner, B. (1987) Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. *Am J Physiol*, **253**, C749-758.
- Gumbiner, B.M. (1993) Breaking through the tight junction barrier [comment]. *J. Cell Biol.*, **123**, 1631-1633.

- Gumbiner, B.M. (1996) Cell Adhesion: The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis. *Cell*, **84**, 345-357.
- Gumbiner, B.M. (2000) Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol*, **148**, 399-404.
- Halama, T., Staffler, G., Hoch, S., Stockinger, H., Wolff, K. and Petzelbauer, P. (1999) Vascular-endothelial cadherin (CD144)- but not PECAM-1 (CD31)-based cell-to-cell contacts convey the maintenance of a quiescent endothelial monolayer. *Int Arch Allergy Immunol*, **120**, 237-244.
- Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, **279**, 509-514.
- Hamaguchi, M., Matsuyoshi, N., Ohnishi, Y., Gotoh, B., Takeichi, M. and Nagai, Y. (1993) p60^{v-src} causes tyrosine phosphorylation and inactivation of the N-cadherin-catenin cell adhesion system. *EMBO J.*, **12**, 307-314.
- Hazan, R.B. and Norton, L. (1998) The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, **273**, 9078-9084.
- Hellberg, C.B., Burden-Gulley, S.M., Pietz, G.E. and Brady-Kalnay, S.M. (2002) Expression of the receptor protein-tyrosine phosphatase, PTPmu, restores E-cadherin-dependent adhesion in human prostate carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, **277**, 11165-11173.
- Hirano, S., Kimoto, N., Shimoyama, Y., Hirohashi, S. and Takeichi, M. (1992) Identification of a neural alpha-catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. *Cell*, **70**, 293-301.
- Hirschi, K.K. and D'Amore, P.A. (1997) Control of angiogenesis by the pericyte: molecular mechanisms and significance. *Exs*, **79**, 419-428.
- Hollenberg, S.M., Sternglanz, R., Cheng, P.F. and Weintraub, H. (1995) Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system. *Mol Cell Biol*, **15**, 3813-3822.
- Hordijk, P.L., ten Klooster, J.P., van der Kammen, R.A., Michiels, F., Oomen, L.C. and Collard, J.G. (1997) Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. *Science*, **278**, 1464-1466.
- Hoschuetzky, H., Aberle, H. and Kemler, R. (1994) β -catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J. Cell Biol.*, **127**, 1375-1380.
- Hua, C.T., Gamble, J.R., Vadas, M.A. and Jackson, D.E. (1998) Recruitment and activation of SHP-1 protein-tyrosine phosphatase by human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1). Identification of immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-like binding motifs and substrates. *J. Biol. Chem.*, **273**, 28332-28340.
- Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B.G. and Kemler, R. (1996) Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech. Dev.*, **59**, 3-10.
- Hulsken, J., Behrens, J. and Birchmeier, W. (1994) Tumor-suppressor gene products in cell contacts: the cadherin-APC-armadillo connection. *Curr Opin Cell Biol*, **6**, 711-716.
- Ilan, N., Mahooti, S., Rimm, D.L. and Madri, J.A. (1999) PECAM-1 (CD31) functions as a reservoir for and a modulator of tyrosine- phosphorylated β -catenin. *J. Cell Sci.*, **112**, 3005-3014.
- Imamoto, A. and Soriano, P. (1993) Disruption of the csk gene, encoding a negative regulator of Src family tyrosine kinases, leads to neural tube defects and embryonic lethality in mice. *Cell*, **73**, 1117-1124.
- Imamura, Y., Itoh, M., Maeno, Y., Tsukita, S. and Nagafuchi, A. (1999) Functional domains of α -Catenin required for the strong state of cadherin-based cell adhesion. *J. Cell Biol.*, **144**, 1311-1322.

- Itoh, M., Morita, K. and Tsukita, S. (1999) Characterization of ZO-2 as a MAGUK Family Member Associated with Tight as well as Adherens Junctions with a Binding Affinity to Occludin and Catenin. *J. Biol. Chem.*, **274**, 5981-5986.
- Itoh, M., Nagafuchi, A., Moroi, S. and Tsukita, S. (1997) Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to α catenin and actin filaments. *J. Cell Biol.*, **138**, 181-192.
- Jackson, D.E., Ward, C.M., Wang, R. and Newman, P.J. (1997) The protein-tyrosine phosphatase SHP-2 binds platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) and forms a distinct signaling complex during platelet aggregation. Evidence for a mechanistic link between PECAM-1- and integrin-mediated cellular signaling. *J. Biol. Chem.*, **272**, 6986-6993.
- Johnson-Leger, C., Aurrand-Lions, M. and Imhof, B.A. (2000) The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair? *J. Cell Sci.*, **113**, 921-933.
- Kaibuchi, K., Kuroda, S., Fukata, M. and Nakagawa, M. (1999) Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTPases. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 591-596.
- Kawabuchi, M., Satomi, Y., Takao, T., Shimonishi, Y., Nada, S., Nagai, K., Tarakhovsky, A. and Okada, M. (2000) Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases. *Nature*, **404**, 999-1003.
- Klagsbrun, M. and D'Amore, P.A. (1996) Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, **7**, 259-270.
- Knudsen, K.A., Soler, A.P., Johnson, K.R. and Wheelock, M.J. (1995) Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J. Cell Biol.*, **130**, 67-77.
- Kuzuya, M., Satake, S., Esaki, T., Yamada, K., Hayashi, T., Naito, M., Asai, K. and Iguchi, A. (1995) Induction of angiogenesis by smooth muscle cell-derived factor: possible role in neovascularization in atherosclerotic plaque. *J Cell Physiol*, **164**, 658-667.
- Kypta, R.M., Su, H. and Reichardt, L.F. (1996) Association between a transmembrane protein tyrosine phosphatase and the cadherin-catenin complex. *J. Cell Biol.*, **134**, 1519-1529.
- Lampugnani, M., Zanetti, A., Corada, M., Takahashi, T., Balconi, G., Breviario, F., Orsenigo, F., Cattelino, A., Kemler, R., Daniel, T.O. and Dejana, E. (2003) Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J Cell Biol*, **161**, 793-804.
- Lampugnani, M.G., Corada, M., Andriopoulou, P., Esser, S., Risau, W. and Dejana, E. (1997) Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells. *J. Cell Sci.*, **110**, 2065-2077.
- Lampugnani, M.G., Corada, M., Caveda, L., Breviario, F., Ayalon, O., Geiger, B. and Dejana, E. (1995) The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, β -catenin, and α -catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J. Cell Biol.*, **129**, 203-217.
- Lampugnani, M.G. and Dejana, E. (1997) Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Curr. Opin. Cell Biol*, **9**, 674-682.
- Lemay, S., Davidson, D., Latour, S. and Veillette, A. (2000) Dok-3, a novel adapter molecule involved in the negative regulation of immunoreceptor signaling. *Mol Cell Biol*, **20**, 2743-2754.
- Lin, M.T., Yen, M.L., Lin, C.Y. and Kuo, M.L. (2003) Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by resveratrol through interruption of Src-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation. *Mol Pharmacol*, **64**, 1029-1036.

- Matsumura, T., Wolff, K. and Petzelbauer, P. (1997) Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5 and CD31 interactions with filamentous actin. *J. Immunol.*, **158**, 3408-3416.
- Matsuyoshi, N., Hamagushi, M., S., T., Nagafuchi, A., Tsukita, S. and Takeichi, M. (1992) Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. *J. Cell Biol.*, **118**, 703-714.
- McCarthy, K.M., Skare, I.B., Stankewich, M.C., Furuse, M., Tsukita, S., Rogers, R.A., Lynch, R.D. and Schneeberger, E.E. (1996) Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci*, **109 (Pt 9)**, 2287-2298.
- Meadows, K.N., Bryant, P. and Pumiglia, K. (2001) Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation. *J Biol Chem*, **276**, 49289-49298.
- Meng, K., Rodriguez-Pena, A., Dimitrov, T., Chen, W., Yamin, M., Noda, M. and Deuel, T.F. (2000) Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta - catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta /zeta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 2603-2608.
- Miller, J.R. and Moon, R.T. (1996) Signal transduction through β -Catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes Dev*, **10**, 2527-2539.
- Mitic, L.L. and Anderson, J.M. (1998) Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol*, **60**, 121-142.
- Muller, T., Choidas, A., Reichmann, E. and Ullrich, A. (1999) Phosphorylation and free pool of beta-catenin are regulated by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration. *J Biol Chem*, **274**, 10173-10183.
- Muller, W.A., Weigl, S.A., Deng, X. and Phillips, D.M. (1993) PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med.*, **178**, 449-460.
- Nada, S., Okada, M., MacAuley, A., Cooper, J.A. and Nakagawa, H. (1991) Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src. *Nature*, **351**, 69-72.
- Nada, S., Yagi, T., Takeda, H., Tokunaga, T., Nakagawa, H., Ikawa, Y., Okada, M. and Aizawa, S. (1993) Constitutive activation of Src family kinases in mouse embryos that lack Csk. *Cell*, **73**, 1125-1135.
- Nakagawa, T., Tanaka, S., Suzuki, H., Takayanagi, H., Miyazaki, T., Nakamura, K. and Tsuruo, T. (2000) Overexpression of the csk gene suppresses tumor metastasis in vivo. *Int J Cancer*, **88**, 384-391.
- Navarro, P., Caveda, L., Brenciaro, F., Mandoteanu, I., Lampugnani, M.G. and Dejana, E. (1995) Catenin-dependent and -independent functions of vascular endothelial cadherin. *J. Biol. Chem.*, **270**, 30965-30970.
- Navarro, P., Ruco, L. and Dejana, E. (1998) Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization. *J. Cell Biol.*, **140**, 1475-1484.
- Nawroth, R., Poell, G., Ranft, A., Samulowitz, U., Fachinger, G., Golding, M., Shima, D.T., Deutsch, U. and Vestweber, D. (2002) VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. *EMBO J.*, **21**, 4885-4895.
- Newman, P.J., Berndt, M.C., Gorski, J., White, G.C., Lyman, S., Paddock, C. and Muller, W.A. (1990) PECAM-1 (CD31) cloning and reation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*, **247**, 1219-1222.
- Nollet, F., Kools, P. and van Roy, F. (2000) Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol*, **299**, 551-572.

- Novak, A. and Dedhar, S. (1999) Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf. *Cell Mol Life Sci*, **56**, 523-537.
- Obergfell, A., Eto, K., Mocsai, A., Buensuceso, C., Moores, S.L., Brugge, J.S., Lowell, C.A. and Shattil, S.J. (2002) Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with $[\alpha]IIIb[\beta]3$ initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J Cell Biol*, **157**, 265-275.
- Okada, M. and Nakagawa, H. (1988) Protein tyrosine kinase in rat brain: neonatal rat brain expresses two types of pp60c-src and a novel protein tyrosine kinase. *J Biochem (Tokyo)*, **104**, 297-305.
- Osawa, M., Masuda, M., Harada, N., Lopes, R.B. and Fujiwara, K. (1997) Tyrosine phosphorylation of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in mechanically stimulated vascular endothelial cells. *Eur. J. Cell Biol.*, **72**, 229-237.
- Ozawa, M., Baribault, H. and Kemler, R. (1989) The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *Embo J.*, **8**, 1711-1717.
- Ozawa, M., Ringwald, M. and Kemler, R. (1990) Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4246-4250.
- Panes, J. and Granger, D.N. (1998) Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology*, **114**, 1066-1090.
- Pawson, T. and Scott, J.D. (1997) Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*, **278**, 2075-2080.
- Pelicci, G., Lanfrancone, L., Grignani, F., McGlade, J., Cavallo, F., Forni, G., Nicoletti, I., Pawson, T. and Pelicci, P.G. (1992) A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell*, **70**, 93-104.
- Pepper, M.S., Ferrara, N., Orci, L. and Montesano, R. (1992) Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, **189**, 824-831.
- Pertz, O., Bozic, D., Koch, A.W., C., F., Brancaccio, A. and Engel, J. (1999) A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J.*, **18**, 1738-1747.
- Pfeifer, M. (1995) Cell adhesion and signal transduction: the Armadillo connection. *Trends Cell Biol*, **5**, 224-229.
- Pitts, J.D. and Finbow, M.E. (1986) The gap junction. *J Cell Sci Suppl*, **4**, 239-266.
- Plate, K.H. and Risau, W. (1995) Angiogenesis in malignant gliomas. *Glia*, **15**, 339-347.
- Pumphrey, N.J., Taylor, V., Freeman, S., Douglas, M.R., Bradfield, P.F., Young, S.P., Lord, J.M., Wakelam, M.J., Bird, I.N., Salmon, M. and Buckley, C. (1999) Differential association of cytoplasmic signalling molecules SHP-1, SHP-2, SHIP and phospholipase C-gamma1 with PECAM-1/CD31. *FEBS Lett.*, **450**, 77-83.
- Rabbani, S.A. (1998) Metalloproteases and urokinase in angiogenesis and tumor progression. *In Vivo*, **12**, 135-142.
- Rabiet, M.J., Plantier, J.L., Rival, Y., Genoux, Y., Lampugnani, M.G. and Dejana, E. (1996) Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **16**, 488-496.
- Rahimi, N. and Kazlauskas, A. (1999) A role for cadherin-5 in regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 activity in endothelial cells. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 3401-3407.

- Rimm, D.L., Koslov, E.R., Kebriaei, P., Cianci, C.D. and Morrow, J.S. (1995) Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 8813-8817.
- Risau, W. (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, **386**, 671-674.
- Risau, W. and Flamme, I. (1995) Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **11**, 73-91.
- Sabe, H., Hata, A., Okada, M., Nakagawa, H. and Hanafusa, H. (1994) Analysis of the binding of the Src homology 2 domain of Csk to tyrosine-phosphorylated proteins in the suppression and mitotic activation of c-Src. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 3984-3988.
- Sagawa, K., Kimura, T., Swieter, M. and Siraganian, R.P. (1997a) The protein-tyrosine phosphatase SHP-2 associates with tyrosine phosphorylated adhesion molecule PECAM-1 (CD31). *J. Biol. Chem.*, **272**, 31086-31091.
- Sagawa, K., Swaim, W., Zhang, J., Unsworth, E. and Siraganian, R.P. (1997b) Aggregation of the high affinity IgE receptor results in the tyrosine phosphorylation of the surface adhesion protein PECAM-1 (CD31). *J. Biol. Chem.*, **272**, 13412-13418.
- Schenkel, A.R., Mamdouh, Z., Chen, X., Liebman, R.M. and Muller, W.A. (2002) CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat. Immunol.*, **3**, 143-150.
- Schiestl, R.H. and Gietz, R.D. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet*, **16**, 339-346.
- Schlessinger, J. (1988) Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci*, **13**, 443-447.
- Schmelz, M. and Franke, W.W. (1993) Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: the syndesmos connecting retothelial cell of lymph nodes. *Eur. J. Cell Biol.*, **61**, 274-289.
- Schmelz, M., Moll, R., Kuhn, C. and Franke, W.W. (1994) Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: II. Different types of lymphatic vessels. *Differentiation*, **57**, 97-117.
- Schmidt, A., Heid, H.W., Schafer, S., Nuber, U.A., Zimbelmann, R. and Franke, W.W. (1994) Desmosomes and cytoskeletal architecture in epithelial differentiation: cell type-specific plaque components and intermediate filament anchorage. *Eur. J. Cell Biol.*, **65**, 229-245.
- Schneeberger, E.E. and Lynch, R.D. (1992) Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol*, **262**, L647-661.
- Schnitzer, J.E. (1993) Update on cellular and molecular basis of capillary permeability. *Cardiovasc Med*, **3**, 124-130.
- Schwarz, M.A., Owaribe, K., Kartenbeck, J. and Franke, W.W. (1990) Desmosomes and hemidesmosomes: constitutive molecular components. *ann. rev. Cell Biol.*, **6**, 461-491.
- Shapiro, L., Fannon, A.M., Kwong, P.D., Thompson, A., Lehmann, M.S., Grubel, G., Legrand, J.F., Als-Nielsen, J., Colman, D.R. and Hendrickson, W.A. (1995) Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature*, **374**, 327-337.
- Shaw, S.K., Bamba, P.S., Perkins, B.N. and Luscinskas, F.W. (2001) Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J. Immunol.*, **167**, 2323-2330.
- Shekhtman, A., Ghose, R., Wang, D., Cole, P.A. and Cowburn, D. (2001) Novel mechanism of regulation of the non-receptor protein tyrosine kinase Csk: insights from NMR mapping studies and site-directed mutagenesis. *J Mol Biol*, **314**, 129-138.

- Simcha, I., Kirkpatrick, C., Sadot, E., Shtutman, M., Polevoy, G., Geiger, B., Peifer, M. and Ben-Ze'ev, A. (2001) Cadherin sequences that inhibit beta-catenin signaling: a study in yeast and mammalian cells. *Mol Biol Cell*, **12**, 1177-1188.
- Simionescu, M., Simionescu, N. and Palade, G.E. (1975) Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. The microvasculature. *J Cell Biol*, **67**, 863-885.
- Simionescu, M., Simionescu, N. and Palade, G.E. (1976) Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. Arteries and veins. *J Cell Biol*, **68**, 705-723.
- Simionescu, N. and Simionescu, M. (1991) Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. A look from cell biology. *Cell Biol. Rev.*, **25**, 5-80.
- Songyang, Z., Shoelson, S.E., McGlade, J., Olivier, P., Pawson, T., Bustelo, X.R., Barbacid, M., Sabe, H., Hanafusa, H., Yi, T. and et al. (1994) Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol Cell Biol*, **14**, 2777-2785.
- Springer, T.A. (1995) Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol.*, **57**, 827-872.
- St. Croix, B., Sheehan, C., Rak, J.W., Florenes, V.A., Slingerland, J.M. and Kerbel, R.S. (1998) E-Cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(KIP1). *J. Cell Biol.*, **142**, 557-571.
- Stanley, P., Caillibot, V. and Siminovitch, L. (1975) Selection and characterization of eight phenotypically distinct lines of lectin-resistant Chinese hamster ovary cell. *Cell*, **6**, 121-128.
- Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M. and Vogt, P.K. (1976) DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*, **260**, 170-173.
- Takahashi, T., Takahashi, K., Mernaugh, R., Drozdoff, V., Sipe, C., Schoecklmann, H., Robert, B., Abrahamson, D.R. and Daniel, T.O. (1999) Endothelial localization of receptor tyrosine phosphatase, ECRT/DEP-1, in developing and mature renal vasculature. *J Am Soc Nephrol*, **10**, 2135-2145.
- Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K. and Shibuya, M. (2001) A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *Embo J*, **20**, 2768-2778.
- Takaishi, K., Sasaki, T., Kotani, H., Nishioka, H. and Takai, Y. (1997) Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J. Cell Biol.*, **139**, 1047-1059.
- Takeichi, M. (1990) Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem*, **59**, 237-252.
- Tanihara, H., Sano, K., Heimark, R.L., St John, T. and Suzuki, S. (1994) Cloning of five human cadherins clarifies characteristic features of cadherin extracellular domain and provides further evidence for two structurally different types of cadherin. *Cell Adhes Commun*, **2**, 15-26.
- Tatosyan, A.G. and Mizenina, O.A. (2000) Kinases of the Src family: structure and functions. *Biochemistry (Mosc)*, **65**, 49-58.
- Telo, P., Breviario, F., Huber, P., Panzeri, C. and Dejana, E. (1998) Identification of a novel cadherin (vascular endothelial cadherin-2) located at intercellular junctions in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **273**, 17565-17572.
- Telo, P., Lostaglio, S. and Dejana, E. (1997) Structure of intercellular junctions in the endothelium. *Therapie*, **52**, 395-398.
- Terman, B.I. and Dougher-Vermazen, M. (1996) Biological properties of VEGF/VPF receptors. *Cancer Metastasis Rev*, **15**, 159-163.

- Thomas, S.M. and Brugge, J.S. (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 513-609.
- Tsukita, S., Furuse, M. and Itoh, M. (1996) Molecular dissection of tight junctions. *Cell Struct Funct*, **21**, 381-385.
- Tsukita, S., Furuse, M. and Itoh, M. (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nature Reviews, Mol. Cell Biol.*, **2**, 285-292.
- Tsukita, S., Oishi, K., Akiyama, T., Yamanashi, Y., Yamamoto, T. and Tsukita, S. (1991) Specific proto-oncogenic tyrosine kinases of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where the level of tyrosine phosphorylation is elevated. *J. Cell Biol.*, **113**, 867-879.
- Tsukita, S., Tsukita, S., Nagafuchi, A. and Yonemura, S. (1992) Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **4**, 834-839.
- Ukropec, J.A., Hollinger, M.K., Salva, S.M. and Woolkalis, M.J. (2000) SHP2 association with VE-cadherin complexes in human endothelial cells is regulated by thrombin. *J. Biol. Chem.*, **275**, 5983-5986.
- Ukropec, J.A., Hollinger, M.K. and Woolkalis, M.J. (2002) Regulation of VE-cadherin linkage to the cytoskeleton in endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Exp Cell Res*, **273**, 240-247.
- Valiron, O., Chevrier, V., Usson, Y., Breviario, F., Job, D. and Dejana, E. (1996) Desmoplakin expression and organization at human umbilical vein endothelial cell-to-cell junctions. *J Cell Sci*, **109 (Pt 8)**, 2141-2149.
- Vaporciyan, A.A., DeLisser, H.M., Yan, H.-C., Mendiguren, I.I., Thom, S.R., Jones, M.L., Ward, P.A. and Albelda, S.M. (1993) Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science*, **262**, 1059-1064.
- Varon, D., Jackson, D.E., Shenkman, B., Dardik, R., Tamarin, I., Savion, N. and Newman, P.J. (1998) Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 serves as a costimulatory agonist receptor that modulates integrin-dependent adhesion and aggregation of human platelets. *Blood*, **91**, 500-507.
- Vestweber, D. (2000) Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts. *J. Pathol.*, **190**, 281-291.
- Vestweber, D. and Blanks, J.E. (1999) Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol. Rev.*, **79**, 181-213.
- Vestweber, D. and Kemler, R. (1985) Identification of a putative cell adhesion domain of uvomorulin. *EMBO J.*, **4**, 3393-3398.
- Vinals, F. and Pouyssegur, J. (1999) Confluence of vascular endothelial cells induces cell cycle exit by inhibiting p42/p44 mitogen-activated protein kinase activity. *Mol Cell Biol*, **19**, 2763-2772.
- Vittet, D., Buchou, T., Schweitzer, A., Dejana, E. and Huber, P. (1997) Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 6273-6278.
- Vivier, E. and Daeron, M. (1997) Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol. Today*, **18**, 286-291.
- Vleminckx, K. and Kemler, R. (1999) Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling. *Bioessays*, **21**, 211-220.
- Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M. and Cooper, J.A. (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*, **74**, 205-214.
- Volberg, T., Geiger, B., Dror, R. and Zick, Y. (1991) Modulation of intercellular adherens-type junctions and tyrosine phosphorylation of their components in RSV-transformed cultured chick lens cells. *Cell Regul.*, **2**, 105-120.

- Volberg, T., Zick, Y., Dror, R., Sabanay, I., Gilon, C., Levitzki, A. and Geiger, B. (1992) The effect of tyrosine-specific protein phosphorylation on the assembly of adherens-type junctions. *Embo J*, **11**, 1733-1742.
- Wang, B., Lemay, S., Tsai, S. and Veillette, A. (2001) SH2 domain-mediated interaction of inhibitory protein tyrosine kinase Csk with protein tyrosine phosphatase-HSCF. *Mol Cell Biol*, **21**, 1077-1088.
- Weiss, A. and Schlessinger, J. (1998) Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell*, **94**, 277-280.
- Wong, R.K., Baldwin, A.L. and Heimark, R.L. (1999) Cadherin-5 redistribution at sites of TNF-alpha and IFN-gamma-induced permeability in mesenteric venules. *Am. J. Physiol.*, **276**, H736-748.
- Xiao, K., Allison, D.F., Buckley, K.M., Kottke, M.D., Vincent, P.A., Faundez, V. and Kowalczyk, A.P. (2003) Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *J Cell Biol*, **163**, 535-545.
- Xu, Y., Guo, D.F., Davidson, M., Inagami, T. and Carpenter, G. (1997) Interaction of the adaptor protein Shc and the adhesion molecule cadherin. *J Biol Chem*, **272**, 13463-13466.
- Yap, A.S., Briehner, W.M., Pruschy, M. and Gumbiner, B.M. (1997) Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Curr. Biol.*, **7**, 308-315.
- Zanetti, A., Lampugnani, M.G., Balconi, G., Breviario, F., Corada, M., Lanfrancone, L. and Dejana, E. (2002) Vascular endothelial growth factor induces Shc association with vascular endothelial cadherin: a potential feedback mechanism to control vascular endothelial growth factor receptor-2 signaling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**, 617-622.
- Zeng, L., D'Alessandri, L., Kalouse, M.B., Vaughan, L. and Pallen, C.J. (1999) Protein tyrosine phosphatase alpha (PTPalpha) and contactin form a novel neuronal receptor complex linked to the intracellular tyrosine kinase fyn. *J. Cell Biol.*, **147**, 707-714.
- Zondag, G.C., Reynolds, A.B. and Moolenaar, W.H. (2000) Receptor Protein-tyrosine Phosphatase RPTPmu binds to and dephosphorylates the Catenin p120(ctn). *J. Biol. Chem.*, **275**, 11264-11269.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

3-AT:	3-Aminotriazol
A:	Ampere
APS:	Ammoniumpersulfat
AS:	Aminosäure
bp:	Basenpaare
BPB:	Bromphenolblau
BSA:	Rinderserumalbumin
cDNA:	Complementary DNA
cfu:	Colony forming unit
CHO:	Chinese hamster ovary
CSK:	C-terminal-Src-Kinase
D:	Dalton
DEPC:	Diethylphosphorylcyanide
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
dNTP:	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT:	Dithiothreitol
ECGF:	Endothelial cell growth supplement
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
EGF:	Epidermal growth factor
et al.:	Et alii
FCS:	Fötales Rinder Serum (fetal calf serum)
FGF:	Fibroblast growth factor
g:	Gramm
x g:	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GFP:	Green fluorescent protein
GST:	Glutathion-S-Transferase
h:	Stunden
HEPES:	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]

HRP:	Horseradish peroxidase
HUVEC:	Human umbilical vein endothelial cell
IgG:	Immunglobulin
IP:	Immunopräzipitation
IPTG:	Isopropyl β -D-Thiogalactopyranosid
ITIM-Motiv:	„Immunoreceptor tyrosine-based“-Motiv
kb:	Kilobasen
kD:	Kilodalton
l:	Liter
M:	Molar
MDCK:	Madine Darby Canine Kidney
MEM:	minimal essential medium
MPCD:	Membrane proximale conserved domain
mRNA:	Messenger RNA
N-:	Amino
ODx:	Optische Dichte bei Wellenlänge x nm
ORF:	Open reading frame
p.A.:	per Analyse
PBS:	Phosphate buffered saline
PCR:	Polymerase chain reaction
PDGF-BB:	Platelet derived growth factor BB
PE:	R-Phycoerythrin
PEG:	Polyethylenglycol
PMSF:	Phenylmethylsulfonylfluorid
PV:	Pervanadat
rATP:	Ribosyl-Adenosintriphosphat
RNA:	Ribonukleinsäure
rpm:	Umdrehungen pro Minute
RPTP:	Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatase
RT:	Raumtemperatur
RTK:	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
PTP:	Protein-Tyrosin-Phosphatase
PTP-HSCF:	Protein tyrosine phosphatase HSCF
RT-PCR:	Reverse transcriptase polymerase chain reaction

s.:	siehe
SAP:	Shrimp alkaline phosphatase
SD:	Synthetic dropout
SDS:	Sodiumdodecylsulfate
SDS-PAGE:	Sodiumdodecylsulfat-polyacrylamide-gelelektrophorese
TE:	TRIS/EDTA-Puffer
TEMED:	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TK:	Protein-Tyrosin-Kinase
Trafo.:	Transformation
TRIS:	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UAS:	Upstream activation site
UKM:	Universitätsklinikum Münster
UV:	Ultraviolett
V:	Volt
VE-cadherin:	Vascular endothelial cadherin
VEGF:	Vascular endothelium growth factor
VEGF-R2:	Vascular endothelium growth factor receptor 2
VE-PTP:	Vascular endothelial protein tyrosine phosphatase
wt:	Wildtyp
w/v:	Weight/volume
X-Gal:	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -Galactopyranosid

7.2 Lebenslauf

Name: Ulf Baumeister
Geburtstag: 27. Mai 1974
Geburtsort: Münster
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

08/1980 - 07/1984 Marien-Grundschule in Münster-Hiltrup
08/1984 - 06/1993 Kardinal-von-Galen-Gymnasium in Münster-Hiltrup
04.06.1993 Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

10/1993 - 08/1999 Studium der Biologie an der Westfälischen Wilhelms-Universität
Münster
09/1995 Vordiplom der Biologie
18.08.1999 Abschluss: Diplom der Biologie

Praktika

01/1996 - 02/1996 Sechswöchiges Praktikum zum elektronenmikroskopischen Arbeiten
am Landesinstitut für den Öffentlichen Gesundheitsdienst NRW

Tätigkeiten

04/1997 Studentische Hilfskraft am Institut für Medizinische Physik und
Biophysik der Universität Münster
04/1998 - 09/1998 Studentische Hilfskraft bei der Betriebseinheit für die Zoologischen
Institute der Universität Münster
09/1998 - 03/1999 Studentische Hilfskraft am Institut für Neuro- und Verhaltensbiolo-
gie der Universität Münster

- 08/1999 Studentische Hilfskraft am Institut für Zoophysiologie der Universität Münster
- 11/1999 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Zoophysiologie der Universität Münster
- 12/1999 - Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Zellbiologie des Zentrums für Molekularbiologie der Entzündung der Universität Münster

Dissertation

- Beginn: 12/1999
- Institut: Institut für Zellbiologie/ZMBE, UKM Münster
- Betreuer: Prof. Dr. Dietmar Vestweber

(Ulf Baumeister)

7.3 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bedanken ...

- bei Prof. Dr. Dietmar Vestweber für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Bereitstellung dieses interessanten Themas und die Betreuung dieser Dissertation mit ihren aufschluss- und lehrreichen Diskussionen.
- bei Prof. Dr. Walter Stöcker für die Übernahme des Korreferates.
- bei PD Dr. Klaus Ebnet für die Einführungen in die verschiedenen Methoden, die intensive Durchsicht der vorliegenden Arbeit und die ständige Bereitschaft zu Diskussionen aller Art.
- bei Henrik Vorschmitt, Stefan Koch, Tanja Decker und Ruth Funke für die Teilnahme und die Unterstützung bei der Bearbeitung dieses Projektes. Henrik Vorschmitt möchte ich speziell für die Bereitstellung der optisch ansprechenden Autoradiographie in Abbildung 16 danken.
- bei Dr. Trudi Brachtendorf für die Durchsicht dieser Arbeit und die zehn Jahre gemeinsamen Studiums.
- bei Sybille Witt, Heinz Kleff und den anderen „guten Geistern“ des ZMBEs für die Erleichterung der Arbeit und die Organisation der netten Weihnachtsfeiern.
- bei allen (ehemaligen) Kollegen und Mitarbeitern des Instituts für die Hilfsbereitschaft bei der Lösung mancher Probleme, die nette Arbeitsatmosphäre sowie den Spaß während und nach der Arbeit.
- bei meinen Eltern und Schwiegereltern für die Durchsicht der Arbeit.
- bei meinen Eltern, Schwiegereltern, Geschwistern und meinem Freundeskreis für die private Unterstützung.
- bei allen, die ich in dieser Danksagung übersehen habe.
- Zum Schluss möchte ich mich bedanken bei der liebsten Frau der Welt, Berit Baumeister, für die vielen Dinge, deren Aufzählung hier zu lang wäre.