

Zellbiologie / Genetik

**Identifizierung der endothelspezifischen  
Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatase VE-  
PTP als VE-Cadherin - Ligand**

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

vorgelegt von  
Roman Nawroth  
aus Herford

-2002-

---

Dekan:	Prof. Dr. Rüdiger J. Paul
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Dietmar Vestweber
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Volker Gerke
Tag der mündlichen Prüfungen:	28., 29.5. und 4.6.2002
Tag der Promotion:	4.6.2002

## Publikationen

Wesentliche Teile dieser Arbeit werden wie folgt veröffentlicht:

Ulrike Samulowitz, Annegret Kuhn, Gertrud Brachtendorf, Roman Nawroth, Attila Braun, Agnes Bankfalvi, Werner Böcker, and Dietmar Vestweber. *Human endomucin: distribution pattern, expression on high endothelial venules and decoration with the MECA-79 epitope*. Am. J. Pathol., im Druck

Roman Nawroth, Gregor Poell, Alexander Ranft, Ulrike Samulowitz, Gregor Fachinger, Matthew Golding, Dave T. Shima, Urban Deutsch, and Dietmar Vestweber. *VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell-contacts*. EMBO J., in Revision

---

<b>1. Zusammenfassung</b>	1
<b>2. Einleitung</b>	3
<b>2.1. Immunüberwachung und Entzündung</b>	3
<b>2.2. Endothelzellen sind aktiv an der Überwachung des Immunsystems beteiligt</b>	4
2.2.1. Endothelzellen sind über hochentwickelte Kontaktbereiche miteinander verbunden	6
2.2.2. Proteine der Zell-Zell-Kontaktbereiche, die nicht in Subzellulären Strukturen organisiert sind	8
2.2.3. Regulation der Zell-Zell-Kontakte während der Extravasation von Leukozyten	9
2.2.4. Struktur und Funktion der Adherens Junctions bei der Kontrolle der endothelialen Zell-Zellkontakte	11
2.2.4.1. Regulation der Adhäsionsaktivität des Cadherin-Catenin-Komplexes über zytoplasmatische Faktoren	13
2.2.4.2. Der Cadherin-Catenin Komplex wird über Tyrosin Phosphorylierung in seiner Aktivität reguliert	15
<b>2.3. Über Protein-Tyrosinphosphorylierung werden Signalübertragungswege in Zellen reguliert</b>	16
2.3.1. Regulation der Signalübertragung durch Protein-Tyrosinphosphatasen	18
2.3.2. Verschiedene Phosphatasen assoziieren mit dem Cadherin-Catenin Komplex	19
<b>2.4. Zielsetzung der Arbeit.</b>	21
<b>3. Material und Methoden</b>	22
<b>3.1. Material</b>	22
3.1.1. spezielle Geräte	22
3.1.2. verwendete Verbrauchsmaterialien	23
3.1.3. Chemikalien	23
3.1.4. Enzyme	24
3.1.5. Oligonukleotide	24
3.1.6. Vektoren und rekombinante Plasmide	25
3.1.7. Antikörper	28
3.1.8. Bakterienstämme	29
3.1.9. verwendete Zelllinien	29
3.1.10. Versuchstiere	30
<b>3.2. Methoden</b>	30
<b>3.2.1. Aufzucht und Lagerung von Bakterienkulturen</b>	30
<b>3.2.2. Zellkultur</b>	30
3.2.2.1. Kulturbedingungen	31
3.2.2.2. Metabolische Markierung von Zellen	32

---

3.2.2.3. Kryokonservierung von Zellen	32
<b>3.2.3. Molekularbiologische Methoden</b>	<b>33</b>
3.2.3.1. Isolierung und Aufreinigung von Nucleinsäuren	33
3.2.3.1.1. Isolierung von Plasmid DNA	33
3.2.3.1.2. Aufreinigung von Nucleinsäuren	34
3.2.3.2. Präzipitation von Nucleinsäuren	34
3.2.3.3. Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäurelösungen	34
3.2.3.4. Gelelektrophorese in Agarosegelen	35
3.2.3.5. Polymerase-Ketten-Reaktion	36
3.2.3.6. Klonierung von Nucleinsäuren in Plasmid-Vektoren	37
3.2.3.6.1. Restriktion von DNA	38
3.2.3.6.2. Modifikationen von linearisierten DNA-Fragmenten	38
3.2.3.6.3. PCR-Klonierung	39
3.2.3.6.4. Ligation	39
3.2.3.6.5. Klonierung mit dem TOPO TA System	39
3.2.3.6.5.1. Anfügen von 3' A-Überhängen an PCR-Produkte	39
3.2.3.6.5.2. TOPO <sup>®</sup> Klonierungs-Reaktion und Transformation	40
3.2.3.7. Transformation von Bakterien	40
3.2.3.7.1. Elektrotransformation von E.coli	40
3.2.3.7.2. Transformation von chemisch kompetenten Bakterien	41
3.2.3.8. Transfektion von Eukaryotischen Zellen	42
3.2.3.8.1. Transfektion mit Polykationen (DEAE-Dextran)	42
3.2.3.8.2. Transfektion mit GeneJammer <sup>™</sup> Transfection Reagent	43
3.2.3.9. Klonanalyse mittels PCR-colony-screen	43
3.2.3.10. Sequenzierung	44
<b>3.2.4. Proteinbiochemische und Immunbiochemische Methoden</b>	<b>44</b>
3.2.4.1. Gewinnung von Kaninchen-Antiseren	44
3.2.4.1.1. Antigen	44
3.2.4.1.2. Peptid-Ovalbumin-Konjugat	45
3.2.4.1.3. Immunisierung	45
3.2.4.1.4. Affinitätsreinigung von polyklonalen Antikörpern	46
3.2.4.2. Herstellung und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	47
3.2.4.2.1. Präzipitation mit GST- Fusionsproteinen	48
3.2.4.3. In vitro Transkription / Translation in Retikulozytenlysaten	49
3.2.4.3.1. in vitro Phosphorylierung der TNT Lysate mit p60c-src	50
3.2.4.4. Aufreinigung von Fc-Fusionsproteinen	50

3.2.4.5. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	51
3.2.4.6. Herstellung von Zellysaten für Immunopräzipitationen	51
3.2.4.7. Immunpräzipitation	52
3.2.4.8. <i>in vitro</i> Dephosphorylierung von Proteinen	53
3.2.4.9. Nachweis von Proteinen	53
3.2.4.9.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	53
3.2.4.9.2. Färben von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blau	55
3.2.4.9.3. Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen durch Fluorographie	55
3.2.4.9.4. Immunblot	56
<b>4. Ergebnisse</b>	56
<b>4.1. Identifizierung von VE-Cadherin assoziierten Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatasen</b>	57
<b>4.2. Die Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatase VE-PTP bindet an VE-Cadherin</b>	57
4.2.1. Heterologe Expression von VE-PTP und Koimmunpräzipitation von VE-Cadherin.	59
4.2.2. VE-PTP interagiert nicht mit N-Cadherin, JAM-1 oder Flk-1	61
4.2.3. VE-PTP interagiert mit PECAM-1	63
<b>4.3. VE-PTP interagiert mit VE-Cadherin, aber nicht mit anderen Komponenten des Cadherin-Catenin Komplexes</b>	65
<b>4.4. Charakterisierung der Domänen von VE-Cadherin und VE-PTP, die für eine Interaktion von Bedeutung sind</b>	67
4.4.1. Die zytoplasmatische Domäne von VE-Cadherin ist für eine Interaktion mit VE-PTP nicht notwendig	68
4.4.2. Die Membranproximale Fibronektin III Domäne von VE-PTP interagiert mit VE-Cadherin	69
4.4.3. Die Assoziation von VE-PTP und VE-Cadherin wird über die membranproximalen Proteindomänen beider Proteine vermittelt.	71
<b>4.5. Klonierung der cDNA von VE-PTP</b>	72
<b>4.6. Herstellung und Charakterisierung polyklonaler und monoklonaler Antikörper gegen VE-PTP</b>	74
<b>4.7. Das Wildtyp VE-PTP Protein assoziiert mit VE-Cadherin in COS-7 Zellen</b>	76
<b>4.8. Nachweis von VE-PTP in murinen endothelialen Zelllinien</b>	78
<b>4.9. Koimmunpräzipitation von VE-Cadherin mit VE-PTP in Endothelzellen</b>	79
<b>4.10. VE-PTP induziert die Dephosphorylierung von VE-Cadherin <i>in vivo</i></b>	80
<b>4.11. <math>\beta</math>-Catenin wird von VE-PTP <i>in vivo</i> nicht dephosphoryliert</b>	82

<b>5. Diskussion</b>	84
5.1. VE-Cadherin assoziiert mit der Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatase VE-PTP	86
5.2. VE-PTP induziert die Dephosphorylierung von VE-Cadherin	89
5.3. Funktion von VE-PTP bei der Kontrolle der VE-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Kontakte von CHO Zellen	91
5.4. PECAM-1 - ein Bindungspartner von VE-PTP	94
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	96
<b>7. Anhang</b>	104
7.1. Anlage 1	104
7.2. Anlage 2	106
7.3. Abkürzungsverzeichnis	107
7.4. Lebenslauf	109
7.5. Danksagung	110

# 1. Zusammenfassung

Die Zell-Zell-Kontakte von Endothelzellen sind für die Aufrechterhaltung der Barriere zwischen Blutgefäßen und dem umliegenden Gewebe verantwortlich. Diese Kontakte werden von verschiedenen Zelloberflächenmolekülen mit adhäsiven Eigenschaften gebildet. Durch die Modulation der Funktion dieser Adhäsionsmoleküle wird der selektive Austausch von Molekülen und auch die Extravasation von Leukozyten aus dem Blutstrom in das Gewebe kontrolliert. Ein Proteinkomplex, der die Bildung der Zell-Zell-Kontakte maßgeblich reguliert, ist der Cadherin-Catenin-Komplex. In den vergangenen Jahren wurde nachgewiesen, daß Veränderungen der Zell-Zell-Adhäsion häufig mit der Tyrosin-Phosphorylierung der Proteine des Cadherin-Catenin-Komplexes einhergehen. Ziel dieser Arbeit war es, Phosphatasen zu identifizieren, die Interaktionen mit dem Cadherin-Catenin-Komplex von Endothelzellen eingehen und regulatorisch auf den Phosphorylierungs-Zustand der Proteine dieses Komplexes einwirken. Mit der Aktivität solcher Phosphatasen könnte die Bedeutung der Tyrosin-Phosphorylierung des Cadherin-Catenin-Komplexes für seine adhäsive Funktion aufgeklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit proteinbiochemischen und molekularbiologischen Methoden erstmals eine Interaktion zwischen VE-Cadherin und der endothelspezifisch exprimierten Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatase (RPTP) VE-PTP nachgewiesen. Diese Interaktion konnte sowohl in heterologen Expressionssystemen, als auch an den nativen Proteinen aus Endothelzellen mittels Koimmunpräzipitation gezeigt werden. An dieser Interaktion sind die beiden Catenine  $\beta$ -Catenin und p120<sup>ctn</sup> nicht beteiligt. VE-PTP interagiert nicht mit N-Cadherin, daß wie VE-Cadherin zu den "klassischen" Cadherinen gehört. Es konnte jedoch eine Interaktion zwischen VE-PTP und PECAM-1, einem Protein der Immunglobulinen-Familie, gezeigt werden.

Für die Assoziation von VE-PTP mit VE-Cadherin sind nur die membranproximalen, extrazellulären Domänen der beiden Proteine notwendig. Damit ist VE-PTP neben Fibrin erst der zweite beschriebene Bindungspartner der Ektodomäne von VE-Cadherin. Durch diese Bindung könnte sowohl die adhäsive Funktion, als auch die Funktion als Signalmolekül von VE-Cadherin moduliert werden. In funktionellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß



die Koexpression von VEGF-R2 und VE-Cadherin zu einer Phosphorylierung von VE-Cadherin in heterologen Expressionssystemen führt. Die VE-Cadherin Phosphorylierung konnte durch die Expression von VE-PTP reduziert werden, wobei VEGF-R2 nicht dephosphoryliert wird. Es wurde auch nachgewiesen, daß  $\beta$ -Catenin in Zellen, die auch VE-Cadherin exprimieren, durch Expression von VE-PTP dephosphoryliert werden kann. Basierend auf diesen Daten wurde in dieser Arbeitsgruppe zusätzlich gezeigt, daß die Integrität VE-Cadherin vermittelter Zell-Zell-Kontakte in CHO Zellen durch die Expression von katalytisch aktivem VE-PTP erhöht werden kann (Gregor Poell, persönliche Mitteilung). Die Dephosphorylierung von  $\beta$ -Catenin scheint jedoch keinen Einfluß auf die Zell-Zell-Kontakte in diesen Zellen zu haben. Diese Befunde deuten auf eine regulatorische Funktion von VE-PTP bei der Kontrolle VE-Cadherin vermittelter Zell-Zell-Kontakte hin. In weiteren Studien soll mit VE-PTP die Funktion der Phosphorylierung von VE-Cadherin bei der Regulation von Zell-Zell-Adhäsion untersucht werden.

Es ist denkbar, daß VE-PTP eine antagonistischen Funktion gegenüber möglichen Substraten von VEGF-R2 und damit bei der Angiogenese hat. Die Aktivität von Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatasen wird durch extrazelluläre Liganden moduliert. VE-PTP-Aktivität könnte daher durch die Interaktion mit seinen Liganden moduliert werden und dadurch Einfluß auf die Integrität von Zell-Zell-Kontakten nehmen. Bezogen auf die Regulation von Zell-Zell-Kontakten während der Transmigration von Leukozyten könnte das bedeuten, daß Leukozyten mit Hilfe von Liganden für VE-PTP eine Modulation der endothelialen Zell-Zell-Adhäsion beeinflussen könnten. In zukünftigen Studien wird daher die Identifikation von Liganden für VE-PTP von Interesse sein.

## 2. Einleitung

Das Blutgefäßsystem der Wirbeltiere dient der Verteilung von löslichen Substanzen und Blutzellen im Körper. Die Blutgefäße werden von einem Deckepithelium, dem Endothel ausgekleidet, das für die Aufrechterhaltung einer Barriere zwischen dem Blutstrom und dem umgebenden Gewebe verantwortlich ist. Die Integrität des Endothels wird über die lateralen Zell-Kontaktzonen der Endothelzellen gesteuert. Diese Zell-Zell-Kontakte werden von verschiedenen Adhäsionsmolekülen gebildet. Durch Veränderungen der Funktion oder Expression dieser Adhäsionsmoleküle wird der selektive Austausch von löslichen Stoffen, die Neubildung von Gefäßen (Angiogenese), aber auch das Auswandern (Extravasation) von Blutzellen des Immunsystems (Leukozyten) in das Gewebe gesteuert. So haben die Endothelzellen neben der Funktion als regulatorische Barriere des Stoffaustausches zwischen Blut und Gewebe eine wichtige Funktion bei der Immunüberwachung des Körpers.

### 2.1. Immunüberwachung und Entzündung

Das Immunsystem höherer Wirbeltiere bewirkt die Immunität des Organismus gegenüber Infektionen durch Bakterien, Pilzen, Parasiten und Viren. Eine weitere Funktion ist die Beseitigung körpereigener, entarteter Tumorzellen. Das Immunsystem setzt sich aus den primären (zentralen) und den sekundären (peripheren) Lymphorganen, sowie den Immunzellen zusammen. Zu den primären Lymphorganen gehören der Thymus und das rote Knochenmark. In diesen Organen findet die Bildung und Reifung von Immunzellen statt. In den sekundären Lymphorganen (Milz, Lymphknoten, Tonsillen, Appendix, Peyer Plaques) findet die Immunantwort nach einer Infektion statt. Immunantworten werden von den Zellen des Immunsystems, den Leukozyten, ausgeführt. Leukozyten patrouillieren ständig zwischen dem Blutgefäßsystem, dem Gewebe und dem lymphatischen System auf der Suche nach Antigenen.

Die Rekrutierung der verschiedenen Leukozyten des Immunsystems in infizierte Gewebe erfolgt über verschiedene Wege. Die Leukozyten der angeborenen (nicht-adaptiven) Immunantwort, zu denen die Gruppe der Phagozyten (Makrophagen, Granulozyten) gehört, wandern direkt in die infizierten Gewebe ein. Die Rekrutierung und Einwanderung dieser Zellen erfolgt über eine Vielzahl

löslicher Signalmoleküle, die eine Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen auslösen können [1].

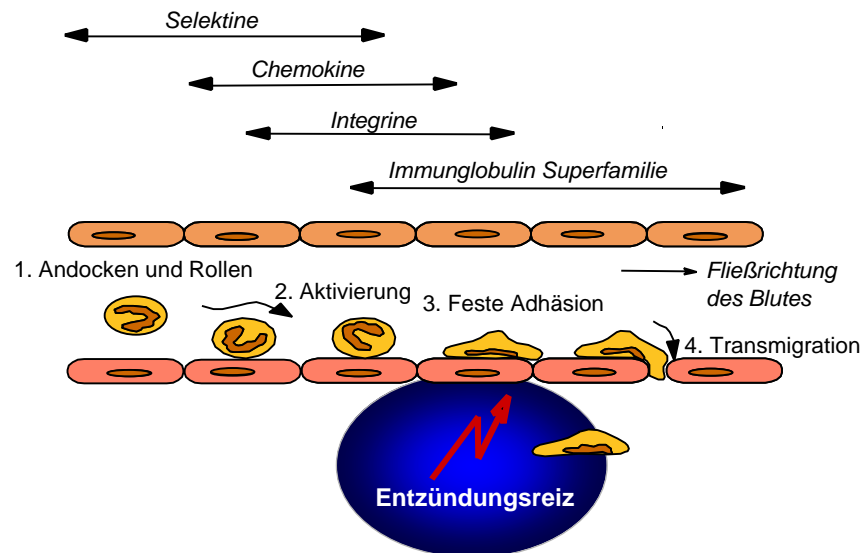
An der adaptiven Immunüberwachung sind die Lymphozyten (B-Zellen, T-Zellen) beteiligt. Lymphozyten die noch nie Kontakt mit einem Antigen hatten (naive Lymphozyten) rezirkulieren ständig zwischen dem Blutgefäßsystem und den sekundären lymphatischen Organen [2]. In diesen Organen treffen sie auf Antigenpräsentierende Zellen (APC). Diese Zellen sind gewebsständige Zellen des Immunsystems, die körperfremde Antigene erkennen und in die sekundären lymphatischen Organe transportieren. Dort werden diese Antigene den Lymphozyten präsentiert. Bei Antigenerkennung werden die Lymphozyten aktiviert, proliferieren und differenzieren zu Effektor- oder Gedächtniszellen aus, um dann über den Blutkreislauf in das von dem Antigen befallene Gewebe zu wandern. Hier sind sie an der Immunantwort gegen das Antigen beteiligt. Das massive Einwandern von Leukozyten in ein Gewebe und die damit einhergehende Freisetzung von löslichen Entzündungsmediatoren führt zu einer Entzündungsreaktion. Die Rezirkulation von Gedächtniszellen in ehemals befallene Gewebe und von Lymphozyten zwischen den Blutgefäßen und den sekundären lymphatischen Organen führt zu einer ständigen Immunüberwachung im Organismus.

Ein entscheidender Schritt bei der Immunüberwachung des Körpers ist die Extravasation der Leukozyten aus dem Blutkreislauf in das Gewebe. An diesem Vorgang sind Endothelzellen aktiv beteiligt, indem sie über Zelladhäsionsmoleküle mit Leukozyten interagieren und damit die Extravasation von Leukozyten kontrollieren.

## **2.2. Endothelzellen sind aktiv an der Überwachung des Immunsystems beteiligt**

Das Endothel ist bei der Regulation von Immunantworten von besonderer Bedeutung. Dieses Gewebe hat eine Funktion als Barriere gegenüber Makromolekülen und zirkulierenden Blutzellen. Trotzdem verlassen täglich etwa  $5 \times 10^{11}$  Leukozyten die Blutgefäße, migrieren in die Gewebe und kehren zurück in die Blutbahn [3]. Andere Leukozyten migrieren nur an den Entzündungsherden in das Gewebe. Darüber hinaus beobachtet man bei Effektor- und Gedächtniszellen ein gewebspezifisches Wanderungsverhalten

in jenes Gewebe, in dem der ursprüngliche Antigenkontakt stattfand [4]. Die molekularen Mechanismen, die dieser spezifischen Adressierung von Leukozyten zugrunde liegen, wurden in den vergangenen Jahren intensiv untersucht.



**Abbildung 2.1.: Modell der Adhäsionskaskade**

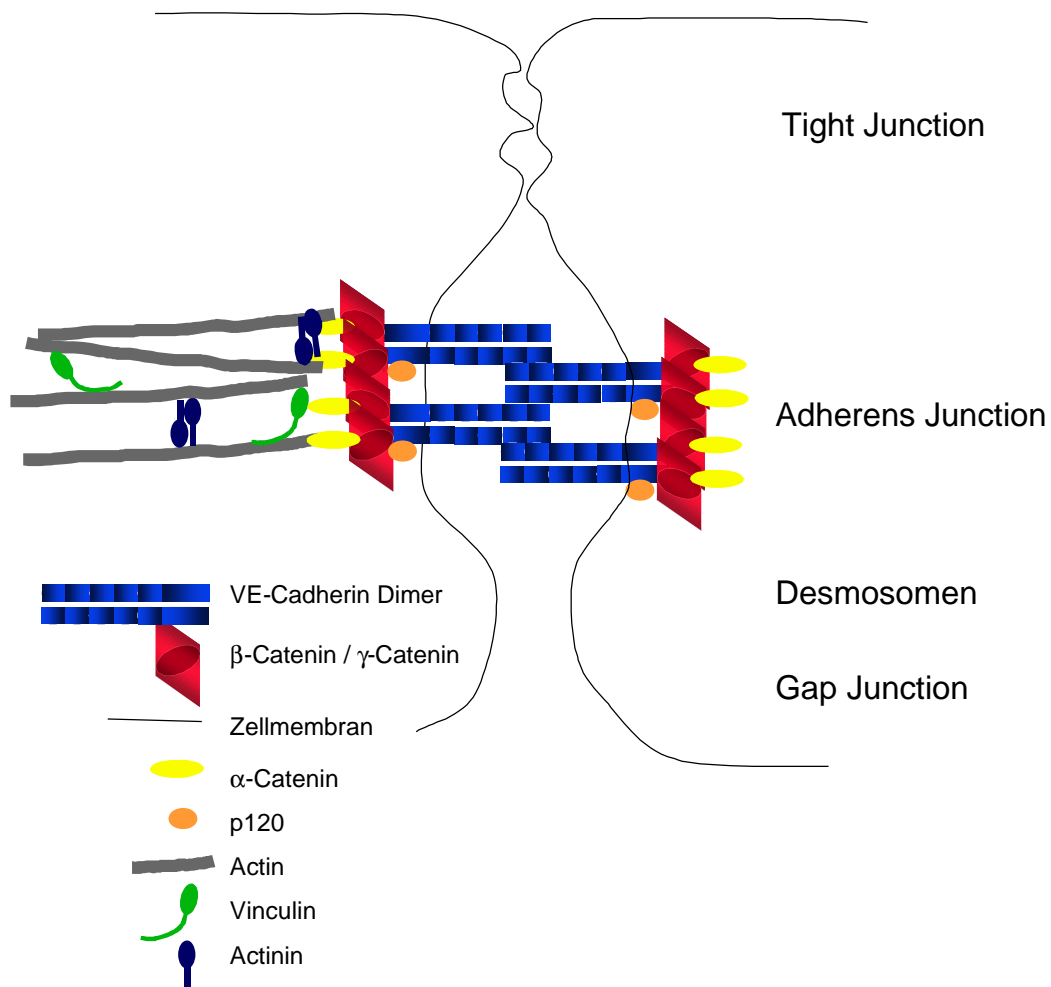
So konnten Oberflächenproteine auf Endothelzellen und Leukozyten identifiziert werden, über die in einem mehrstufigen Prozeß, der sog. Adhäsionskaskade, eine selektive Auswanderung von Leukozyten in entzündetes Gewebe oder in sekundäre lymphatischen Organe verläuft [5] [6]. Dieses Modell, ist schematisch in Abbildung 2.1. dargestellt.

Der erste Schritt dieser Kaskade ist durch eine reversible Interaktion zwischen Endothelzellen und Leukozyten ("Andocken und Rollen") charakterisiert. In diesem frühen Stadium der Interaktion werden die Leukozyten in räumliche Nähe zu den Endothelzellen gebracht. Durch die treibende Kraft des Blutstroms rollen die Leukozyten auf den Endothelzellen, wobei ihre Geschwindigkeit stark reduziert wird. Dieser erste Schritt ist primär durch die Molekülfamilie der Selektine und ihrer Liganden gekennzeichnet [7]. In dem zweiten Schritt der Adhäsionskaskade werden die  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ - Integrine auf den Leukozyten durch Chemokine aktiviert. Aktivierte Integrine können anschließend mit ihren Liganden auf den Endothelzellen eine Interaktion eingehen. Erst diese Bindung führt zu einer festen Adhäsion zwischen Leukozyten und Endothelzellen. Im letzten Schritt der Kaskade erfolgt die transendotheliale Migration der Leukozyten aus der Blutbahn in das infizierte Gewebe.

Die zellulären und molekularen Mechanismen, die der Transmigration zugrunde liegen, sind noch weitgehend unbekannt. In vielen Studien wurde gezeigt, daß Leukozyten parazellulär, also zwischen benachbarten Endothelzellen transmigrieren [8] [9]. Diesem Weg wurde allerdings über ultrastrukturellen Untersuchungen ein weiterer, transzytotischer Weg entgegengesetzt [10]. Obwohl die meisten Arbeiten den parazellulären Weg favorisieren, können wahrscheinlich mehrere Routen für das Verlassen des Blutgefäßsystems in Abhängigkeit des Stimulus, des Leukozytentyps und der Lokalisation innerhalb des Gefäßsystems genutzt werden [11]. Weitgehend unbekannt ist auch der Mechanismus, der einer parazellulären Transmigration zugrunde liegt. Zum einen gibt es Hinweise auf ein aktives Öffnen der Zell-Zell-Kontakte durch die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Zum anderen gibt es jedoch auch Hinweise auf die Involvierung von Leukozyteneigenen Proteasen, deren Inaktivierung tatsächlich zu einer reduzierten Transmigration führt [12] [13]. In dieser Arbeit wurde der Mechanismus einer aktiven Öffnung der Zell-Zell-Kontakte während der Transmigration von Leukozyten zugrunde gelegt. Hinweise auf diesen Mechanismus werden deshalb im weiteren näher erläutert.

### **2.2.1. Endothelzellen sind über hochentwickelte Kontaktbereiche miteinander verbunden**

Bei der parazellulären Extravasation von Leukozyten in das Gewebe kommt den Zell-Zell-Kontakten des Endothels eine besondere Funktion zu. Die Bildung und Aufrechterhaltung von endothelialen Zell-Zell-Kontakten benötigt ein komplexes Zusammenspiel zwischen Plasmamembranproteinen, zytoplasmatischen Proteinen und Komponenten des Zytoskeletts. Einige dieser Moleküle sind in speziellen Substrukturen organisiert. Diese Substrukturen werden in Tight-Junctions, Gap-Junctions, Adherens Junctions und Desmosomen unterteilt.



**Abbildung 2.2.: Schematisches Modell der Adherens Junctions in Zell-Zell Kontakten**

**Tight Junctions** bilden eine Barriere zwischen der apikalen und der basolateralen Plasmamembran-Domäne. Besonders gut ausgebildet sind diese Strukturen in der Blut-Hirn-Schranke und in den großen Arterien, dagegen weniger gut in den postkapillaren Venolen, den Orten, an denen Leukozyten aus dem Blut in das Gewebe migrieren [14]. Diese Zell-Kontaktzonen stellen jedoch nicht einfach impermeable Barrieren dar, sondern zeigen Selektivität gegenüber Molekülen verschiedener Größe und Ladung [15]. Tight Junctions setzen sich aus verschiedenen Proteinen wie den Transmembranmolekülen Occludin, Claudins und daran assoziierten Zytoplasmaproteinen wie ZO-1, ZO-2, ZO-3, Cingulin, AF-6 oder ASIP zusammen [16]. Ein weiteres Transmembranmolekül der Tight Junctions ist JAM (junctional adhesion molecule). Dieses Protein ist über seine zytoplasmatische Domäne ebenfalls mit den zytoplasmatischen Proteinen ZO-1, ASIP oder AF-6 verbunden und hat eine Funktion bei der Transmigration von Leukozyten [17, 18].

**Gap-Junctions** sind Strukturen in Kontaktzonen von Zellen, die von Kanalproteinen, den Connexonen gebildet werden. Über diese Kanalproteine kann ein metabolischer Austausch von Molekülen bis zu einer bestimmten relativen Molekülmasse erfolgen [19].

**Desmosomen** sind für feste Kontakte zwischen Zellen mit starker mechanischer Beanspruchung verantwortlich. Endothelzellen bilden keine klassischen Desmosomen aus. Allerdings exprimieren Endothelzellen mit Desmoplakin mindestens ein Protein, das als Komponente von Desmosomen beschrieben wurde. Desmoplakin könnte eine Desmosomen ähnliche Struktur mit VE-Cadherin in Endothelzellen bilden. Diese Struktur wird auch als *complexus adhaerentes* bezeichnet [20].

**Adherens Junctions** bilden die ersten lateralen Zell-Zell-Kontaktstellen bei der Proliferation von Zellen und sind mitverantwortlich für die Ausbildung von Zell-Polarität und der Bildung und Stabilisierung von Tight Junctions und Gap-Junctions [21, 22]. Ein Adhäsionsprotein der Adherens Junctions in Endothelzellen ist das Transmembran-Glykoprotein VE-Cadherin. VE-Cadherin ist durch die Catenine  $\beta$ -Catenin oder  $\gamma$ -Catenin (Plakoglobin) und  $\alpha$ -Catenin mit dem Zytoskelett verbunden (siehe Abbildung 2.2.) [23].

### 2.2.2. Proteine der Zell-Zell-Kontaktbereiche, die nicht in subzellulären Strukturen organisiert sind

Einige Adhäsionsmoleküle der Zell-Zell-Kontakte sind nicht in subzellulären Strukturen organisiert, sondern werden über die gesamten lateralen Kontaktbereiche exprimiert. Zu dieser Gruppe von Adhäsionsmolekülen gehört das Transmembranprotein PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1). PECAM-1 gehört zu der Immunglobulinen-Familie und ist an der Bildung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt [24]. PECAM-1 kann homophile Interaktionen in *trans* eingehen und intrazellulär an  $\beta$ -Catenin binden. Diese Bindung erfolgt jedoch nur nach der Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin [25]. Weitere Bindungspartner sind die Phosphatasen SHP-1, SHP-2, SHIP und Phospholipase C- $\gamma$  1 [26 - 28], sowie Kinasen aus der Src- und Csk-Familie [29]. Phosphorylierung von PECAM-1 wird nach verschiedenen Stimuli, wie Scherkräfte oder Wachstumsfaktoren, ausgelöst. Damit kommt PECAM-1 auch eine Funktion als Signalmolekül zu [30]. Blockierende Antikörper gegen die

beiden N-terminalen Ig Domänen von PECAM-1 führen zu einer Reduktion der Transmigration von Leukozyten *in vitro* und *in vivo*. Mit Antikörpern gegen die sechste Ig Domäne von PECAM-1 wurde die Migration von Leukozyten in die ECM (extrazelluläre Matrix) inhibiert [31 - 33]. In PECAM-1 defizienten Mäusen akkumulieren Granulozyten zwischen den Endothelzellen und der Basalmembran [34]. Trotz dieses Defekts wurde keine generelle Inhibierung der Transmigration von Leukozyten nachgewiesen. Daher müssen neben PECAM-1 noch weitere Moleküle an der Transmigration von Leukozyten beteiligt sein. Kürzlich wurde mit CD99 ein Protein beschrieben, das wie PECAM-1 in den Zell-Zell-Kontakten vorkommt und eine Funktion während der Transmigration von Leukozyten hat. Erste Daten deuten auf ein Zusammenwirken von PECAM-1 und CD99 bei der Transmigration von Leukozyten hin [35].

### **2.2.3. Regulation der Zell-Zell-Kontakte während der Extravasation von Leukozyten**

Die Integrität des Endothels wird während der Entzündungsvorgänge verändert. Dabei sind vor allem vasoaktive Substanzen, Zytokine oder auch Leukozyten-Endothel-Interaktionen Auslöser von Veränderungen in der Integrität und damit einhergehend der Permeabilität von Endothelzellen. VE-Cadherin hat als Adherens Junction Protein eine zentrale Funktion bei der Kontrolle dieser Vorgänge.

Permeabilitätsstudien *in vitro* belegen, daß adhärierende aber nicht transmigrierende Granulozyten eine Zunahme der Permeabilität von aktiviertem Endothel verursachen. Während der Transmigration von Granulozyten konnte eine Veränderung der Permeabilität jedoch nicht beobachtet werden. Diese Befunde werden dahingehend interpretiert, daß Leukozyten lokal und transient mit der Endothelzelle in Kontakt treten und ein reversibles Öffnen der Zell-Zell-Kontakte bewirken. Während der Transmigration von Leukozyten werden die induzierten Öffnungen im Endothel von den Zellkörpern der Leukozyten verschlossen, so daß keine Veränderung in der Permeabilität des Endothels zu messen ist [36].

In weiteren Studien wurde gezeigt, daß die Adhäsion von Granulozyten mit einem Anstieg an intrazellulärem Kalzium verbunden ist. Ein Anstieg an intrazellulärem Kalzium wird auch durch Stimulierung der Leukozytenliganden



E-Selektin und P-Selektin, sowie des Integrinliganden VCAM-1 hervorgerufen [11]. Dieses Signal verursacht die Phosphorylierung der leichten Kette von Myosin und damit eine Kontraktion der Zelle.

An der Öffnung der Zell-Zell-Kontakte während der Transmigration von Leukozyten ist VE-Cadherin beteiligt. Ein VE-Cadherin-GFP-Fusionsprotein (green fluorescent protein) ist während der transendothelialen Migration nicht mehr in den Zell-Zell-Kontakten zu detektieren. Nach der Transmigration wird diese Öffnung jedoch sofort wieder geschlossen und VE-Cadherin ist lückenlos an den Zellgrenzen zu detektieren. Die Autoren dieser Studie diskutieren die Möglichkeit, daß VE-Cadherin durch transmigrierende Leukozyten destabilisiert und lokal verdrängt wird [37]. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, das Granulozyten eine Tyrosin-Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und VE-Cadherin auf Rinderendothel hervorrufen [38]. Dieser Befund wird auch in einem System gefunden, in dem die Transmigration von Tumorzellen beschrieben wurde. Humane Adenokarzinoma Zellen (MCF-7 und MDA MB231) lösen nach der Adhäsion an Endothelzellen eine Neuverteilung von VE-Cadherin aus, die mit einem transienten Verlust der Zell-Zell-Kontakte verbunden ist. Diese Neuorganisation der Cadherine korreliert mit einer deutlichen Tyrosin-Phosphorylierung des Cadherin-Catenin Protein-komplexes [39, 40].

Leukozyten können nicht nur durch direkte Interaktion mit Endothelzellen eine Öffnung der Zell-Zell-Kontakte induzieren. Während einer Infektion ist es eine wichtige Aufgabe der gewebständigen Leukozyten weitere phagozytierende Zellen und Effektormoleküle an den Infektionsherd zu rekrutieren. Ein Mechanismus ist das Ausschütten vasoaktiver Substanzen wie Histamin oder Thrombin. Histamin führt zu einer transienten Herabsetzung der Endothelzellbarriere. Dies ist auf mehrere Effekte zurückzuführen. So führt Histamin zu einer Phosphorylierung der Myosin leichten Kette und damit zu einer Kontraktion der Endothelzellen, verbunden mit einem Öffnen der Zell-Zell-Kontakte. Damit einhergehend wurde jedoch auch die Tyrosin-Phosphorylierung der Proteine des Cadherin-Catenin-Komplexes nachgewiesen [41].

Ähnliche Mechanismen scheint Thrombin in Endothelzellen auszulösen. Nach Thrombin-Stimulation von Endothelzellen ist eine erhöhte Permeabilität und die Bildung von kleinen Öffnungen zwischen den Zellen zu beobachten. Diese Veränderung des Endothels wird von einer Dissoziation der Catenine  $\alpha$ -Catenin und  $\beta$ -Catenin und damit einem Verlust der Bindung von VE-Cadherin an das

Zytoskelett begleitet. Die Inhibition von Tyrosin Kinasen verhindert diese Reaktion [42].

Weitere vasoaktive Substanzen sind die Zytokine Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6), die zusammen mit TNF- $\alpha$  von aktivierten Makrophagen sekretiert werden. Beide Zytokine haben eine inhibitorische Wirkung auf die Phosphataseaktivität in Endothelzellen und bewirken eine erhöhte Permeabilität von Endothelzellen [43]. Kombinationen von Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , können zu einer Reduktion der Expression von Adhäsionsmolekülen wie VE-Cadherin [44], PECAM-1 und JAM-1 [45] führen. Monozyten adhäreren zwar an diesen Zellen aber ihre Fähigkeit zur Extravasation ist drastisch herabgesetzt [46].

Zusammenfassend konnte in den vergangenen Jahren nachgewiesen werden, daß die Transmigration von Leukozyten während Entzündungsprozessen zu einer Modulation von Zell-Zell-Kontakten führt. Diese Modulation wird von Veränderungen der Expression von Zelladhäsions-Molekülen, aber auch von der Tyrosin Phosphorylierung einiger Adhäsions-Moleküle begleitet. Ein zentraler Proteinkomplex während der Transmigration von Leukozyten ist der VE-Cadherin-Catenin-Komplex, der sowohl in seiner Expression, als auch in seiner Tyrosin-Phosphorylierung verändert wird.

#### **2.2.4. Struktur und Funktion des Cadherin-Catenin-Komplexes bei der Kontrolle der endothelialen Zell-Zell-Kontakte**

Die Cadherine gehören zu den wichtigsten Zell-Adhäsions Molekülen und haben Funktionen während der Bildung und Entwicklung von Geweben, der Gastrulation, Neurulation und der Organogenese [47]. Cadherine werden gewebsspezifisch exprimiert und gehen homophile, Kalzium abhängige Bindungen ein [48]. Viele Untersuchungen haben gezeigt, daß Veränderungen in der Cadherin Expression oder Funktion die Bildung von Zell-Zell-Kontakten, Zell-Migration, Zell-Differentierung und die Metastasierung von Zellen beeinflussen. Dabei erfüllen die Cadherine im Wesentlichen drei Aufgaben. Zum einen bewirken sie die Adhäsion von benachbarten Zellen, so daß weitere Transmembranproteine der Plasmamembran mit Liganden benachbarter Zellen interagieren können. Zum anderen induzieren die Cadherine den Aufbau von Zell-Polarität und sind durch die Kontrolle der Verteilung weiterer Membran-

Proteine als Signalproteine an dem Aufbau der Zelle beteiligt. Die Cadherine können jedoch auch selbst als Signalmoleküle agieren und sind daher direkt an der Differenzierung von Zellen beteiligt [49].

Cadherine sind in den Adherens Junctions lateraler Zell-Zell-Kontakte organisiert und sind ein wesentlicher Regulationsfaktor bei der Kontrolle und der Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten. Inhibition der Cadherin vermittelten Zell-Zell-Adhäsion reicht aus, die Funktion und Bildung von anderen Junctions, wie z.B. Tight Junctions, zu reduzieren oder ganz aufzuheben [22]. Im weiteren sollen deshalb Struktur und Regulationsmechanismen VE-Cadherin vermittelter Zell-Zell-Kontakte vorgestellt werden.

VE-Cadherin gehört zu den „klassischen“ Cadherinen, die auf der Basis kleiner Variationen in der Aminosäuresequenz in Typ I und Typ II Cadherine unterteilt sind und mehr als 15 Mitglieder umfassen [50]. Die klassischen Cadherine besitzen eine Ektodomäne, die sich in fünf Cadherin-Domänen gliedert, eine einzelne Transmembranregion und eine zytoplasmatische Domäne. Auf Endothelzellen wird neben VE-Cadherin auch N-Cadherin als Vertreter der klassischen Cadherine exprimiert. Im Gegensatz zu VE-Cadherin, daß in den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert ist, findet man N-Cadherin über die gesamte Zytoplasmamembran verteilt. Aufgrund dieser Verteilung wird angenommen, daß N-Cadherin Kontakte zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen bildet, und VE-Cadherin für die Inter-Endothelialen Zell-Kontakte verantwortlich ist [51].

VE-Cadherin wird in Maus-Embryonen ab Tag 7,5 exprimiert. VE-Cadherin defiziente Mäuse entwickeln kein Gefäßsystem, so daß die Embryonen am Tag 9,5 sterben. Dabei verläuft die initiale Bildung der Gefäße in diesen Mäusen völlig normal. Vielmehr scheint VE-Cadherin eine Funktion als Signalmolekül für die Entwicklung und korrekte Proliferation der Endothelzellen zu übernehmen [52].

Das Modell für den Adhäsionsmechanismus der Cadherine geht von einer initialen *cis*-Interaktion zweier Cadherin-Moleküle aus, die anschließend mit der N-terminalen Domäne eines in *trans* liegenden Cadherin Dimers eine weitere, Kalzium abhängige Bindung eingehen [49]. Im Modell sollen sich dabei die Cadherin-Dimere wie ein Reißverschluss verhalten, bei dem durch das Zusammenspiel vieler Einzeleinheiten eine feste Bindung resultiert [53].

Blockierende Antikörper gegen VE-Cadherin können die Integrität von endothelialen Zellkulturen *in vitro* und *in vivo* stören. *In vivo* wird nicht nur die

Permeabilität der Gefäße erhöht, sondern auch eine erhöhte Transmigration von Neutrophilen in entzündetes Gewebe beobachtet [54 - 56]. Auch eine Umverteilung in der zellulären Lokalisation, verbunden mit einer Neuorganisation des Actin Zytoskeletts konnte nach Antikörper Behandlung von Zellen festgestellt werden [57]. Bei diesen Studien wurden Antikörper eingesetzt, die gegen die ersten vier Cadherin Domänen gerichtet sind. Ein Antikörper gegen die fünfte Domäne von C-Cadherin, einem weiteren Vertreter der klassischen Cadherine aus *Xenopus*, verstärkt jedoch die Adhäsionsaktivität von C-Cadherin. Diese Aktivierung ist jedoch nur nach Inkubation von Zellen und nicht mit immobilisiertem C-Cadherin möglich. Daher ist es möglich, daß diese Aktivierung über andere zelluläre Komponenten erfolgen könnte [58].

#### **2.2.4.1. Regulation der Adhäsionsaktivität des Cadherin-Catenin-Komplexes über zytoplasmatische Faktoren**

Der VE-Cadherin-Catenin-Komplex kann sowohl über Signale, die von außerhalb der Zelle auf VE-Cadherin wirken, als auch durch Signale, die von innen auf die Verankerung der Cadherine am Zytoskelett wirken, in seiner Aktivität moduliert werden. So kann die Funktion von VE-Cadherin über verschiedene Signalwege reguliert werden.

VE-Cadherin ist über die Catenine indirekt mit dem Zytoskelett verbunden. Für die Funktion der Cadherine als Adhäsionsmoleküle ist diese Verbindung notwendig, um feste Zell-Zell-Kontakte aufbauen zu können.

VE-Cadherin kann mit  $\beta$ -Catenin oder  $\gamma$ -Catenin (Plakoglobin) zwei Komplexe bilden. Diese Catenine zeigen in ihrer Primärstruktur Homologien zu dem Drosophila Protein *armadillo*, das für die Ausbildung der Segment Polarität in Drosophila verantwortlich ist [23]. Beide Catenine werden über eine Interaktion mit  $\alpha$ -Catenin mit dem Zytoskelett verbunden.  $\alpha$ -Catenin ist ein Vinculin homologes Protein und bindet entweder direkt oder über  $\alpha$ -Actinin an das F-Actin Zytoskelett. Zusätzlich kann  $\alpha$ -Catenin auch Interaktionen mit ZO-1 oder ZO-2 eingehen [59 - 61].

In verschiedenen Signalübertragungswegen haben die Catenine  $\beta$ -Catenin und  $\gamma$ -Catenin eine Funktion. Beide Catenine können mit APC (adenomatous polyposis coli) und GSK-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ) eine Bindung eingehen. Über diese Bindung wird die Degradation der Catenine reguliert. Im

Zytoplasma angereichertes  $\beta$ -Catenin kann jedoch auch als Transkriptionsverstärker der HMG (high mobility group) Transkriptionsfaktoren, wie z. B. TCF/LEF-1, an Signalübertragungswegen der Zelle teilnehmen [47] [62] [63].

Die Deletion der  $\beta$ -Catenin /  $\gamma$ -Catenin Bindungsstelle in VE-Cadherin führt zwar immer noch zu einer VE-Cadherin vermittelten Zell-Aggregation, aber nicht mehr zu einer Verringerung der Permeabilität eines Zellrasens [64]. Die Catenine sind demnach nicht für die Zell-Zell-Aggregation und die ersten Schritte der Cadherin vermittelten Zell Kontakte notwendig, für den Aufbau der Endothelzellfunktion als Barriere zwischen Blutgefäßsystem und Gewebe jedoch essentiell von Bedeutung.

Neben  $\beta$ -Catenin und  $\alpha$ -Catenin bindet auch noch das Catenin p120<sup>ctn</sup> an den zytoplasmatischen, membranproximalen Teil der klassischen Cadherine [65]. p120<sup>ctn</sup> hat wahrscheinlich eine Funktion bei der Kontrolle der Rekrutierung und Adhäsionsaktivität der Cadherine in den Zell-Zell Junctions [66]. In Endothelzellen scheint p120<sup>ctn</sup> auch bei der Bildung des VE-Cadherin-Catenin-Komplexes erforderlich zu sein [67]. So setzt sich der Cadherin-Catenin-Komplex in Zell-Zell-Kontakten subkonfluenter Zellen aus VE-Cadherin und p120<sup>ctn</sup> zusammen, während in gereiften Zell-Zell-Kontakten p120<sup>ctn</sup> von dem Komplex dissoziiert [68] [65].

Nach Inhibition von VE-Cadherin vermittelter Adhäsion kann eine Veränderung des Zytoskeletts beobachtet werden. Auch die Neuformierung des Zytoskeletts hat Auswirkungen auf die Zusammensetzung des Cadherin-Catenin-Komplexes. Während der Neubildung von Gefäßen wird über Sphingosin-1-Phosphat (SPP-1) EDG-1 (endothelial differentiation gene 1) aktiviert und Tiam-1, ein Guanin Austausch Faktor, in Zell-Zell-Kontaktstellen rekrutiert. Tiam-1 gehört zu einer Familie von Proteinen, die eine Aktivität von GTPasen kontrollieren. GTPasen haben unter anderem direkten Einfluß auf die Bildung des Actin Zytoskeletts. Die Anwesenheit von SPP-1 führt zu einer erhöhten Bildung eines funktionellen Cadherin-Catenin-Komplexes. Dieser Effekt kann mit Inhibitoren gegen GTPasen aufgehoben werden. Der Cadherin-Catenin-Komplex kann demnach auch durch Veränderungen im Aufbau des Zytoskeletts reguliert werden [69].

### **2.2.4.2. Der Cadherin-Catenin-Komplex wird über Tyrosin-Phosphorylierung in seiner Aktivität reguliert**

Über Phosphorylierung von Tyrosinresten an Proteinen werden Permeabilität und Migrationsverhalten von Zellen beeinflusst [70] [71]. Neubildung oder Modulation von Zell-Zell-Kontakten und Veränderungen des Zytoskeletts korrelieren in den meisten Fällen mit einer Tyrosin-Phosphorylierung des Cadherin-Catenin-Komplexes. Da über diesen Proteinkomplex die Integrität von Zell-Zell-Kontakten reguliert wird, könnte die Tyrosin-Phosphorylierung des Cadherin-Catenin-Komplexes eine regulatorische Komponente bei der Öffnung von Zell-Zell-Kontakten darstellen. Tyrosin-Phosphorylierung des Cadherin-Catenin-Komplexes könnte auch ein möglicher Auslöser bei der Migration von Zellen und Metastasierungsprozessen sein [72] [73].

Während der Proliferation von Endothelzellen wird der Cadherin-Catenin-Komplex in seiner Zusammensetzung moduliert. In subkonfluenten Zellen liegen die Proteine des Komplexes in einer phosphorylierten Form vor. Diese Phosphorylierung ist verantwortlich für eine verstärkte Assoziation von  $\beta$ -Catenin und p120<sup>ctn</sup> mit VE-Cadherin. In konfluenten Zellen ist diese Phosphorylierung hingegen aufgehoben und  $\beta$ -Catenin wird weitgehend durch Plakoglobin ersetzt. In dephosphoryliertem Zustand dissoziiert p120<sup>ctn</sup> von VE-Cadherin [65] [74].

Verschiedene Mitglieder aus der Familie der Src Kinasen können den Cadherin-Catenin-Komplex effektiv an seinen Tyrosin-Resten phosphorylieren [71] [75] [76]. Diese Phosphorylierung führt zu einer reduzierten Adhäsionsaktivität, die wahrscheinlich auf eine verminderte Assoziation zwischen den Cateninen und dem Zytoskelett beruht [77] [78] [79]. Das Hauptsubstrat für Src Kinasen in dem Cadherin-Catenin-Komplex ist  $\beta$ -Catenin. Tyrosin-Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin korreliert mit einer Dissoziation von N-Cadherin [80]. Allerdings ist die genaue Funktion der Tyrosin-Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin noch nicht aufgeklärt. In Epithelzellen scheint die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin keine Funktion auf den E-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Kontakt zu haben. Mit einem E-Cadherin- $\alpha$ -Catenin Konstrukt konnte gezeigt werden, daß die Integrität der Kontakte zwischen den Zellen nach Tyrosin-Phosphorylierung trotzdem reduziert wird [81]. Vielmehr könnten weitere Proteine, wie die ERM Proteine

Ezrin, Radixin und Moesin, die auch durch die Kinase Src phosphoryliert werden, an der Modulation der Cadherin vermittelten Adhäsion beteiligt sein [82].

Modulation der Zell-Zell-Kontakte durch die Aktivierung von Kinasen konnte auch nach Stimulation von Zellen mit Wachstumsfaktoren wie EGF, TGF $\alpha$ , PDGF, CSF-1, HGF und FGF gezeigt werden. Für zwei der entsprechenden Rezeptoren, dem EGF Rezeptor und dem FGF Rezeptor konnte eine Assoziation mit dem Cadherin-Catenin-Komplex nachgewiesen werden. Stimulation verschiedener Zelllinien mit EGF führt zu einer Phosphorylierung des Cadherin-Catenin-Komplexes. Diese Phosphorylierung korreliert mit dem Verlust des Kontaktes zwischen dem Zytoskelett und dem Cadherin-Catenin-Komplex, verbunden mit einer erhöhten Migration der Zellen [83] [84] [85] [83] [77, 86].

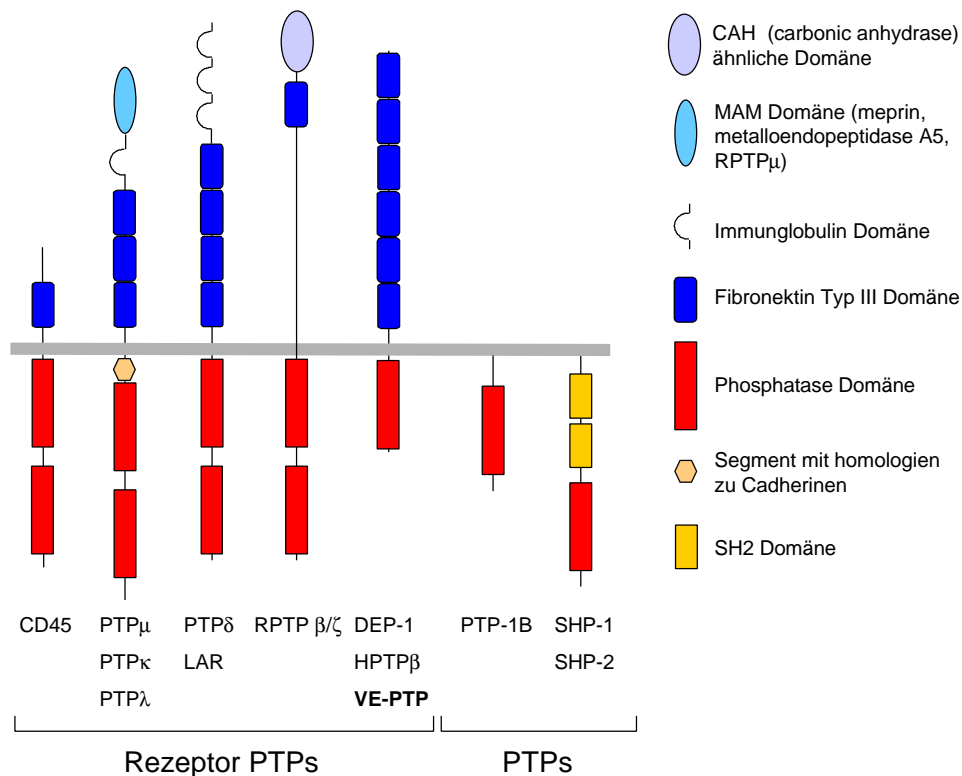
Die Stimulation von Endothelzellen mit VEGF (vascular endothelial growth factor) führt zu einer Modulation der Zell-Zell-Adhäsion, die zu einer verstärkten Migration der Zellen führt. Auch diese physiologischen Veränderungen werden von einer deutlichen Tyrosin-Phosphorylierung des Cadherin-Catenin-Komplexes und PECAM-1 begleitet [87].

### **2.3. Über Protein-Tyrosinphosphorylierung werden Signalübertragungswege in Zellen reguliert**

Die Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen ist ein genereller Mechanismus der Signalübertragung in Zellen. Relativ gut charakterisiert ist die Proteinfamilie der Kinasen, die für die Phosphorylierung von Proteinen verantwortlich ist. Diese Proteinfamilie wird in zwei Hauptgruppen, die Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTK) und die zytoplasmatischen Tyrosin Kinasen eingeteilt. Eine herausragende Rolle bei der Vaskulogenese und Angiogenese spielen die RTKs. Die membranständigen RTKs werden durch die Bindung extrazellulärer löslicher oder membrangebundener Liganden aktiviert. Sie übertragen Signale in das Innere der Zelle, indem sie intrazelluläre Signalmoleküle an Tyrosinresten phosphorylieren [88]. Durch die Bindung an ihre Liganden werden die zuvor monomeren Rezeptoren in räumliche Nähe gebracht. Als Dimere autophosphorylieren sich die RTKs wechselseitig an ihren intrazellulären Tyrosinresten, wodurch die Kinaseaktivität erhöht wird und Bindungsstellen für intrazelluläre Signalmoleküle geschaffen werden [89]. Um eine Regulation

dieser Signalwege zu erreichen, kommt den Phosphatasen als Antagonisten der Kinasen eine besondere Rolle zu.

Ähnlich den Kinasen werden die klassischen Phosphatasen in zwei Unterfamilien aufgeteilt, die Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatasen (RPTPs), die als Transmembranproteine einen extrazellulären Teil tragen und die zyttoplasmatischen Protein-Tyrosinphosphatasen (PTPs) (siehe Abbildung 2.3.).



**Abbildung 2.3.: Schematische Darstellung der strukturellen Organisation der klassischen Protein-Tyrosinphosphatasen**

Die meisten RPTPs enthalten intrazellulär zwei katalytische Phosphatase Domänen (PTP Domänen), wobei die membranproximale Domäne die höhere enzymatische Aktivität zeigt. Eine Ausnahme bilden die Typ III RPTPs, die nur eine einzelne katalytische Domäne besitzen. Zu dieser Unterfamilie der RPTPs gehören unter anderem die Proteine DEP-1, HPTP $\beta$  und VE-PTP. Die Extrazellulärdomänen der RPTPs setzen sich aus Strukturelementen zusammen, die auch auf klassischen Zelladhäsionsmolekülen vorkommen [90]. Zu diesen Domänen zählen zum Beispiel Fibronectin III Domänen oder Immunglobulin Domänen. Die zyttoplasmatischen PTPs besitzen eine einzelne katalytische Domäne und meist zusätzliche Strukturdomänen, wie SH2 Domänen. SH2 Domänen sind Adapterelemente, die mit ihren phosphorylierten Interaktionspartnern eine Assoziation eingehen können [91]. Typische Vertreter dieser Gruppe der Phosphatasen sind SHP-1 und SHP-2 [92].



Einige Phosphatasen sind verantwortlich für die Regulation der Aktivität von Kinasen. So werden Proteine aus der Familie der Src Kinasen, die in viele Zell-Differenzierungsschritte involviert ist [93], von der Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatase  $\alpha$  in ihrer Aktivität reguliert [94]. Kürzlich wurde die neue Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatase VE-PTP (Vascular Endothelial PTP) beschrieben, die endothelspezifisch exprimiert wird. Für diese Phosphatase wurde eine Interaktion mit dem Angiopoetin-Rezeptor Tie-2 beschrieben. Interaktion von VE-PTP mit Tie-2 führt zu einer Dephosphorylierung und damit Inaktivierung dieser Kinase [95].

### 2.3.1. Regulation der Signalübertragung durch Protein-Tyrosinphosphatasen

Für die RPTPs konnte bisher noch kein genereller Mechanismus gezeigt werden, über den diese Moleküle in ihrer Aktivität reguliert werden. Im Gegensatz zu den RPTPs wurde für die RTKs ein Modell entwickelt, in dem Dimerisierung zu einer Aktivierung führt. Die Dimerisierung wird über die Bindung von Liganden induziert [96]. Obwohl versucht wurde für die RPTPs ein ähnliches Modell zu entwickeln, scheint die Dimerisierung der Phosphatasen kein generelles Prinzip der Aktivierung von Phosphatasen darzustellen [97]. Ein Problem bei der funktionellen Untersuchung von Phosphatasen ist die Eigenschaft sich *in vitro* häufig völlig unspezifisch gegenüber Substraten zu verhalten. Für einige RPTPs konnten jedoch selektive Funktionen *in vivo* nachgewiesen werden. Die Interaktion der Rezeptordomäne dieser Phosphatasen mit heterophilen Liganden führt zu einer enzymatischen Inaktivierung.

Für CD45 wurde als Ligand Galectin-1 beschrieben und eine Bindung führt zur Inhibierung der Phosphatase [98]. Weitere heterophile Liganden wurden für LAR (Laminin, Nidogen) [99], RPTP $\beta/\xi$  (Pleiotrophin, Contactin) [100] und RPTP $\alpha$  (Contactin) [101] beschrieben. Sowohl Pleiotrophin als auch Contactin wirken als Liganden inhibitorisch auf die assoziierten Phosphatasen. Die RPTPs vom Typ II RPTP $\mu$ , RPTP $\kappa$  und PTP $\delta$  können homophile Interaktionen in *trans*-Orientierung miteinander eingehen [102] [103]. Ob diese homophile Interaktion eine funktionelle Bedeutung hinsichtlich der Enzymaktivität hat konnte jedoch bis jetzt noch nicht gezeigt werden [104] [105] [106].

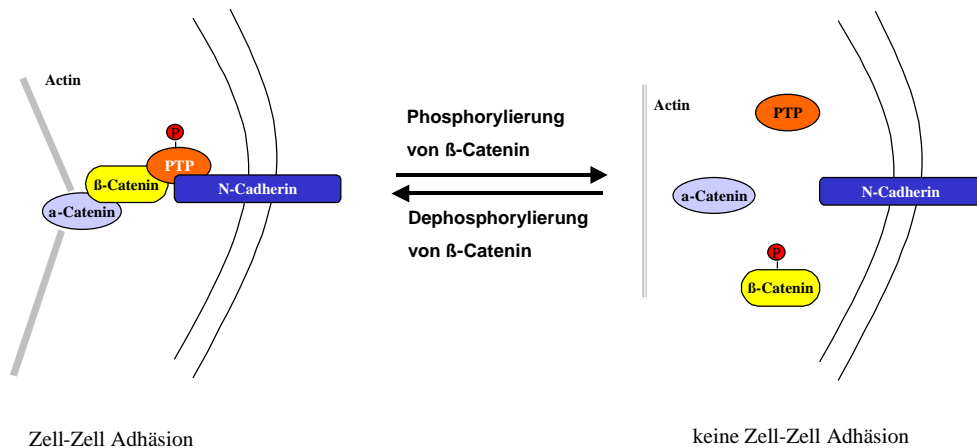
### 2.3.2. Verschiedene Phosphatasen assoziieren mit dem Cadherin-Catenin-Komplex

Die Tyrosin-Phosphorylierung des Cadherin-Catenin-Komplexes könnte einen Mechanismus darstellen, die Integrität von Zell-Zell-Kontakten zu verändern. Daher ist in der Vergangenheit intensiv nach Phosphatasen gesucht worden, die mit diesem Protein-Komplex interagieren. So konnten verschiedene Phosphatasen identifiziert werden, die an den Cadherin-Catenin-Komplex binden. Regulatorische Mechanismen konnten jedoch bislang nur indirekt oder gar nicht beschrieben werden.

SHP-2 gehört zu den zytoplasmatischen PTPs und bindet an  $\beta$ -Catenin. Nach Thrombin Behandlung von Zellen dissoziiert diese Phosphatase von  $\beta$ -Catenin. Diese Dissoziation ist mit einer Tyrosin-Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin verbunden. SHP-2 scheint ebenfalls eine Funktion bei der Phosphorylierung des Cadherin-Catenin-Komplexes nach der Stimulation von Endothelzellen durch Scherkräfte zu haben. Auch nach diesem mechanischen Reiz wird  $\beta$ -Catenin phosphoryliert und sowohl  $\alpha$ -Catenin, als auch SHP-2 dissoziieren von  $\beta$ -Catenin [107] [108].

In Retina Zellen von Hühnern assoziiert die zytoplasmatische Phosphatase PTP-1B in phosphoryliertem Zustand mit dem intrazellulären Teil von N-Cadherin. Diese Interaktion konnte nicht für E-Cadherin gezeigt werden, so daß die PTP-1B - N-Cadherin Interaktion selektiv mit N-Cadherin erfolgen könnte [80] [109]. Nach Dephosphorylierung von PTP-1B dissoziiert die Phosphatase von N-Cadherin. Diese Dissoziation ist verbunden mit einer Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin, die verantwortlich für den Verlust der Bindung zwischen N-Cadherin und dem Zytoskelett ist. Damit einhergehend wurde eine reduzierte Adhäsionsfähigkeit der Zellen nachgewiesen (Figur 2.4.) [110]. Die Dissoziation phosphorylierter Catenine von Cadherinen konnte für andere Cadherin-Catenin-Komplexe, wie dem VE-Cadherin-Catenin-Komplex jedoch nicht gezeigt werden [87] [111].

Einige Mitglieder der RPTPs sind ebenfalls mit dem Cadherin-Catenin-Komplex assoziiert. Für die RPTP LAR ist eine Interaktion mit  $\beta$ -Catenin gezeigt worden. Überexpression von LAR führt zu einer reduzierten Migration von Epithelzellen nach EGF Stimulation, sowie einer Reduktion der Tumorbildung in Mäusen [112] [113].



**Abbildung 2.3.: Regulation der Cadherin vermittelten Adhäsion durch PTP-1B (nach Balsamo et al., 1996)**

Aus der Untergruppe IIB der RPTPs binden zwei Phosphatasen an den Cadherin-Catenin-Komplex. RPTP $\kappa$  interagiert direkt mit  $\beta$ -Catenin und dephosphoryliert dieses Protein auch *in vitro* [114]. RPTP $\mu$  wird in endothelialen Zellen, jedoch auch in Bronchial- und Gallenepithelien, sowie Kardiozyten exprimiert [115]. Diese Phosphatase bindet an den zytoplasmatischen Teil von E- und N-Cadherin, sowie Cadherin-4. Einige Daten sprechen dafür, daß die Regulation der Aktivität von RPTP $\mu$  gegenüber E-Cadherin über eine Dissoziation von RPTP $\mu$  reguliert werden könnte [109]. Neuere Daten implizieren eine Funktion für RPTP $\mu$  bei der Stabilisierung des E-Cadherin-Catenin-Komplexes, die allerdings unabhängig von der enzymatischen Aktivität des Proteins vermittelt wird [116]. In Neuronen sorgt die Inhibition dieser Phosphatase für ein stark verlangsamtes Wachstum auf einem N-Cadherin Substrat [117]. RPTP $\mu$  kann eine weitere, Cadherin unabhängige Bindung mit p120<sup>ctn</sup> eingehen. *In vivo* Studien an Zellkulturen zeigen das RPTP $\mu$  eventuell bei der EGF Stimulation ein Funktion als Antagonist des EGF-Rezeptor gegenüber p120<sup>ctn</sup> übernehmen kann [118].

## 2.4. Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit basiert auf der Annahme, daß Leukozyten nach der Interaktion mit dem Endothel die molekularen Charakteristika und die Integrität der Zell-Zell-Kontakte von Endothelzellen beeinflussen können. Für die Bildung und Aufrechterhaltung endothelialer Zell-Zell-Kontakte ist die VE-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Adhäsion von elementarer Bedeutung. Der Verlust dieser Adhäsion geht in vielen Fällen mit der Tyrosin-Phosphorylierung verschiedener Komponenten des Cadherin-Catenin-Komplexes einher. Die Adhäsionsaktivität von VE-Cadherin könnte demnach durch Tyrosin-Phosphorylierung moduliert werden. An der Regulation der Phosphorylierung von Proteinen sind Kinasen und Phosphatasen beteiligt. Die Inaktivierung zellulärer Phosphatasen führt direkt zu einer Phosphorylierung des Cadherin-Catenin-Komplexes, die mit dem Verlust der Zell-Zell-Adhäsion einhergeht. Leukozyten könnten während der Transmigration die Aktivität von Cadherin-assoziierten Phosphatasen beeinflussen. Dadurch wäre eine Phosphorylierung der Komponenten des Cadherin-Catenin-Komplexes möglich, die zu einer Inaktivierung VE-Cadherin vermittelter Zell-Zell-Adhäsion führen und damit die Transmigration von Leukozyten ermöglichen könnte. Obwohl bislang verschiedene Phosphatasen identifiziert wurden, die mit Komponenten des Cadherin-Catenin-Komplexes interagieren, wurde jedoch noch keine endothelspezifische Phosphatase identifiziert, die einen Einfluß auf die Phosphorylierung und damit der Funktion von VE-Cadherin hat. In dieser Arbeit sollten endotheliale Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatasen (RPTPs) hinsichtlich einer Interaktion mit dem VE-Cadherin-Catenin-Komplex analysiert werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten diese Interaktionen näher charakterisiert werden. Dies beinhaltet vor allem die Analyse der für die Bindung notwendigen Proteindomänen. Ausserdem sollte gezeigt werden, daß diese Phosphatasen an der Regulation der VE-Cadherin Modulation beteiligt sind.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Material

#### 3.1.1. spezielle Geräte

- Zentrifugen:** Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg)  
Megafuge 1.0 (Heraeus Instruments, Hanau)  
Varifuge 3.0R (Heraeus Instruments, Hanau)  
Sorval RC5C plus (Sorval DuPont, Newtown, USA)  
Optima™ L-70K Ultrazentrifuge (Beckmann Coulter, München)
- Photometer:** UV-Spektrometer Gene Quant II (Pharmacia Biotech, Freiburg)  
Vis-Spektrometer UV-1202 (Shimadzu, Duisburg)
- Mikroskop:** Axiovert 25 (Zeiss, Göttingen)
- Sonstige:** ABI Prism 377 Sequenator (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)  
Bio-Imaging-Analyzer Fujix BAS1000 (Fuji Photo Film CO., LTD, Japan)  
Entwickler Curix 60 (Agfa, Köln)  
French Pressure Cell Press (SLM Instruments, Rochester, NY, USA)  
Fuji Imaging Plate Type BASIII (Fuji Photo Film CO., LTD, Japan)  
Gel Dryer, Model 583 (BioRad, München)  
Gene Pulser II & Pulse Controller II (Bio-Rad, München)  
Microcomputer Electrophoresis Power Supply, Phero-Stab 550 (Biotec-Fischer, Reiskirchen)  
Millipore Q-Plus PF (Millipore, Bedford, MA, USA)  
Mini-Protean II Gelelektrophoresesystem (Bio-Rad, München)  
PCR-Cycler T-Gradient (Biometra, Göttingen)  
PCR-Cycler UNOII (Biometra, Göttingen)  
Power PAC1000 (Bio-Rad, München)  
Semi-Dry Blotapparatur TransBlot SD (Bio-Rad, München)  
Spannungsgeräte  
SpeedVac AES 1000 (Savant Instruments, Farmingdale, NY, USA)

### 3.1.2. verwendete Verbrauchsmaterialien

Centricon YM-10 (Millipore, Bedford, MA, USA)  
Econo-Säulen (Bio-Rad, München)  
Elektroporationsküvette (0,2 cm; Bio-Rad, München)  
Röntgenfilm X-OMAT™AR (Kodak, Cedex, Frankreich)  
BIO-MAX MR Film (Kodak, Cedex, Frankreich)  
ECL Hyperfilm (Amersham Biosciences, Freiburg)  
Nitrozellulose (Amersham Biosciences, Freiburg)  
Whatman-Papier (Schleicher & Schnell, Dassel)  
Reaktionsgefäße, 0,2-2,0 ml (Eppendorf, Hamburg)  
Zellkulturplatten 24 well (Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg)  
Zellkulturschalen 30 mm (Nalge Nunc, Wiesbaden)  
Zellkulturschalen 90 mm (Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg)

### 3.1.3. Chemikalien

Chemikalien wurden, sofern nicht gesondert angegeben von folgenden Firmen im Reinheitsgrad p.A. bezogen:

Becton-Dickinson, Heidelberg  
Biochrom, Berlin  
Biochrom, Berlin  
Bio-Rad, München  
Boehringer-Mannheim, Mannheim  
Calbiochem, Bad Soden  
Difco Laboratories, Detroit, USA  
Gibco Life Technologies, Karlsruhe  
J.T. Baker, Deventer, Niederlande  
Merck, Darmstadt  
Merck, Darmstadt, Stratagene  
Nestlé, Frankfurt  
PAA, Cölbe  
Pharmacia, Freiburg  
Roth, Karlsruhe  
Serva, Heidelberg  
Sigma-Aldrich, Deisenhofen  
Stratagene, Amsterdam, Niederlande

### 3.1.4. Enzyme

Restriktionsendonukleasen und andere Enzyme wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Gibco BRL (Karlsruhe) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

### 3.1.5. Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' - 3')
VE-PTP 1s	CGGAATTTCGAGGTACCTGGTGTCCATC
VE-PTP 2s	GAAGATCTGGTGTGAGTGCTGGCCTG
VE-PTP 3s	GAAGATCTCAGAAAGCTAGCCACAGC
VE-PTP 4s	ATGACGACCCTTGCTCTG
VE-PTP 5s	ATCCGTCACCTTCACTAC
VE-PTP 1as	CCGGTACCATCTTCAGGTGAATTCTTAA
VE-PTP 2as	CTAGATCTTTCAATAACTCCAAACAA
VE-PTP 3as	AAATTGGATCAGGGACTG
VE-PTP 4as	ATCTTCCAGAAGTCATCC
JAM 7s	CTCTAAGCTTCAAGGCAAGGGTTCGGTG
JAM 9s	GAAGATCTGTGGGGGGGCATCGTGCCA
JAM 2as	GCAGTGTGCGACTCACACCAGGAACGACGAGGT
JAM R1 as	CTAGATCTATAGGCAAACCAGACGAA
JAM R2 as	GAAGATCTATTCAGCTCCACAGCATC
VECP30	CGTCTAGACTACAGGATGATCAGCAAGG
VECP32	CGTCTAGACTATCCGTGCAGTCCAGGCG
VECP33	CGTCTAGACTAGGACTCTGCGATGGACTCTGCG
VE-PTP fl 1 s	GTGAGGTGGTTGAAGATAGC
OLIGOT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT(V)
CMV6 s	GTGTCTGTA CTCCAGGTAG
VE-PTP fl 2	GCAGAGCTCGTTTAGTGAACC
V-FN16 REV1	TACTTACCTCGAGTGA ACTCTTTCAAGTCCTCGTC
V-FN16 REV2	TACTTACCTAGGGGCTCTGACTCTGTGGTGATGGGC
V-FN16 REV3	TACTTACCTTCAATAACTCCAAACAAGGGCTC
V-FN16 REV4	TACTTACCTGGATCCGACTCTGTGGTGATGGGCATAGAG
CMV-E1	AGGCGTGTACGGTGGGAGGTC
CMV-E2	GGGAGGTCTATATAAGCAGAGC
<b>Oligonukleotide für die Sequenzierung von VE-PTP</b>	
mVEP-S1	TCTCTGGATGGAGAAGAGAGC
mVEP-A1	ACTGGTCATGCCGGCCGACTG
mVEP-S7	AGTGATACCAGCAGATACAGCTTC
mVEP-A7	ATTGGCTCTTGACCAAGTCACATG
mVEP-S1	TCTCTGGATGGAGAAGAGAGC
VEP-S2	GAAACTCAATTTAAGGACTTAG
mVEP-A1	ACTGGTCATGCCGGCCGACTG
VEP-A2	CTCCAGCTGAACCACAGGC
VEP-S3	CAGTGATACCAGCAGATACAGC
VEP-S4	GTGTCTGCATTCAGACAGGACG
VEP-S5	CTGTATGTGGTGACTCACAGTG
VEP-A3	CTTGGGAATGGTCTGAGAGTC
VEP-A4	ATCTCCAGTGCCTTTGTCCAG
VEP-A5	ACCTTCAGATTTGAGACTTCCATG

mVEP-S7	AGTGATACCAGCAGATACAGCTTC
mVEP-A7	ATTGGCTCTTGACCAAGTCACATG
mVEP-S8	GCGATGTCCAGCAGTCAGC
mVEP-S9	GATGGTGATTGTCACTCACAGTG
mVEP-S10	ACTACACGGTGTGGCCAGAC

### 3.1.6. Vektoren und rekombinante Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pFLAG-CMV1	Derivat des pCMV5 Vektors für die Expression und Sekretion von N-terminalen FLAG Fusionsproteinen in eukaryotischen Zellen	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
pcDNA3	Expressionsvektor für eukaryotische Zellen	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pcDNA3.1(-)Myc-His	Expressionsvektor für eukaryotische Zellen mit einem optionalen C-terminalen Myc-His-tag	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pSwitch	Expressionsvektor für eukaryotische Zellen	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pGene/V5-His	Expression wird durch Mifepriston induziert	Groningen, Niederlande
pEF6/myc-His A	Expressionsvektor für eukaryotische Zellen	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pCR2.1-TOPO TA	Klonierungsvektor mit lacZ, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , ColE1 origin, T7 und SP6 promotor	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pSecTag2 A	Expressionsvektor für eukaryotische Zellen	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pEE14	Expressionsvektor für amplifizierte Expression in CHO cells	[119] [120]
pCMV6-XL4	Klonierungsvektor und Expressionsvektor für eukaryotische Zellen	Origene Technologies Inc., Rockville, USA
pGEX-3T	Expressionsvektoren für Glutathion-S-Transferase Fusionsproteine	Amersham Biosciences, Freiburg
pGEX-4T1		
pGEX-6P		



pRK5	Expressionsvektor für eukaryotische Zellen	Millauer et al., 1993 [121]
------	--	-----------------------------

## rekombinante Plasmide

pFLAG-VE-PTP	Die C-terminalen 1743 bp cDNA von VE-PTP in pCMV1-FLAG	Dr. Gregor Fachinger [95]
pFLAG-VE-PTP C/S	Wie pFLAG-VE-PTP, mit einer Substratbindungsmutation C/S	Dr. Gregor Fachinger [95]
pFLAG-VE-PTP R/A	Wie pFLAG-VE-PTP, mit einer Substratbindungsmutation R/S	Dr. Gregor Fachinger [95]
GST-VE-PTP	C-Terminales 1058 bp cDNA Fragment in pGEX-3T	Dr. Gregor Fachinger [95]
GST-VE-PTP R/A	Wie pGEX3T-VE-PTP mit Substratbindungsmutation R/A	Dr. Gregor Fachinger [95]
GST-SHP-2	N-terminale Hälfte mit SH2 Domäne von murinem SHP-2 in pGEX-4T-1	Dr. Klaus Ebnet
VE-PTP (MG 37)	Die gesamte cDNA von VE-PTP wurde von der Firma OriGene Technologies, inc. kloniert, wobei eine cDNA-Bibliothek aus Maus Leber benutzt wurde. Die cDNA Fragmente wurden in eine EcoRI/Sall Schnittstelle des Vektors pCMV6-XL4 kloniert.	Dave Shima, ICRF London
hlgG:pcDNA3	humanes IgG, ausgehend von der Sequenz J00228 aa 553-1803 über EcoRI/XbaI in pcDNA3	Dr. Ulrike Samulowitz
VE-PTP FNIII 1-16	Mit einem Oligonukleotidgemisch aus den Oligonukleotiden CMV-E1, CMV-E2 und V-FN16REV 1-4 wurde aus dem pCMV6-XL4-VE-PTP f.l. ein Fragment amplifiziert, das mit NotI und SmaI in den pBS-KSII <sup>+</sup> kloniert wurde.	Dr. Urban Deutsch
VE-PTP FNIII 1-17 Fc - pCMV6-XL4	Der 3' Bereich von VE-PTP wurde mit Accl/XbaI aus dem pCMV6-XL4::VE-PTP f.l. Konstrukt entfernt und ein Accl/EcoRI Fragment aus pBS KSII <sup>+</sup> VE-PTP FNIII 1-16 zusammen mit einem EcoRI/XbaI Fragment aus hlgG:pcDNA3, das den Fc-Teil von humanem IgG kodiert, zurück in den pCMV6-XL4 kloniert.	Dr. Urban Deutsch
VE-PTP-FNIII 1-17-Fc - pEE14	Der Vektor pEE14 wurde mit HindIII geschnitten und aufgefüllt, anschließend mit XbaI nachgeschnitten. In den so linearisierten Vektor wurde zwei Fragmente aus dem pCMV6-XL4 VE-PTP 1-17 Fc kloniert: ein Accl/XbaI Fragment, zusammen mit einem NotI (wurde aufgefüllt)/Accl Fragment.	Dr. Urban Deutsch
JAM-VE-1	Die Ektodomäne mit der Transmembrandomäne von JAM wurde über die Oligonukleotide JAM7s und JAM R2as aus pFLAG-JAM amplifiziert. Die zytoplasmatische Domäne von VE-PTP wurde mit den Oligonukleotiden VE-PTP3s und VE-PTP 1as aus pFLAG-VE-PTP amplifiziert. Beide Fragmente wurden über eine eingeführte BamHI Erkennungssequenz miteinander verbunden und über die Schnittstellen HindIII und KpnI in den Vektor pFLAG-CMV1 kloniert.	Diese Arbeit

JAM-VE-2	Die Ektodomäne von JAM wurde über die Oligonukleotide JAM7s und JAM R2as aus pFLAG-JAM amplifiziert. Die zytoplasmatische Domäne von VE-PTP wurde mit den Oligonukleotiden VE-PTP2s und VE-PTP 1as aus pFLAG-VE-PTP amplifiziert. Beide Fragmente wurden über eine eingeführte BamHI Erkennungssequenz miteinander verbunden und über die Schnittstellen HindIII und KpnI in den Vektor pFLAG-CMV1 kloniert.	Diese Arbeit
VE-JAM	Amplifikation von der 17. FNIII Domäne von VE-PTP über die Oligonukleotide VE-PTP 1s und VE-PTP 2as aus pFLAG-CMV1-VE-PTP. Anschließend Amplifikation der Transmembrandomäne und des zytoplasmatischen Teil von JAM mit den Oligonukleotiden JAM 9s und JAM 2as. Beide Fragmente wurden über eine eingeführte, innere BglII Erkennungssequenz verbunden und über die äußeren Endonuklease Erkennungssequenzen EcoRI und Sall in den Vektor pFLAG-CMV1 kloniert.	Diese Arbeit
VE-Cadherin-42	Ausgehend von dem pcDNA3-VE-Cadherin wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden T7 und VECP 33 durchgeführt. Das entstandene Amplifikat umfasst die Aminosäuren 1-741 und wurde über die Endonuklease Erkennungssequenzen EcoRI / XbaI in den Vektor pcDNA3 kloniert.	Diese Arbeit
VE-Cadherin-83	Mit den Oligonukleotiden T7 und VECP 32 wurde ein Fragment mittels PCR aus dem pcDNA3-VE-Cadherin amplifiziert, das die cDNA von murinem VE-Cadherin bis auf die C-terminalen 83 Aminosäuren umfasst (Aminosäuren 1-700). Das Fragment wurde über die Endonuklease Erkennungssequenzen EcoRI / XbaI in den Vektor pcDNA3 kloniert.	Diese Arbeit
VE Cad EC	Amplifikat der Extrazellulärdomäne von murinem VE-Cadherin, mit den Oligonukleotiden VECP-30 und T7 aus pcDNA3-VE-Cadherin. In dem Fragment ist der gesamte zytoplasmatische Teil von VE-Cadherin deletiert. Das Amplifikat wurde über die Endonuklease-Erkennungssequenzen EcoRI / XbaI in den Vektor pcDNA3 kloniert.	Diese Arbeit
VE 2-5	VE-Cadherin Domäne 2-5 mit Transmembran-Domäne und 5 Membranproximalen zytoplasmatischen Aminosäuren in pSecTag2 A über die Endonuklease Erkennungssequenzen KpnI / ApaI kloniert (Aminosäuren 148-624)	Dr. Ulrike Samulowitz
VE 3-5	Wie VE 2-5, Aminosäuren 255-624	Dr. Ulrike Samulowitz
VE 4-5	Wie VE 2-5 , Aminosäuren 370-624	Dr. Ulrike Samulowitz
VE 5	Wie VE-2-5, Aminosäuren 477-624	Dr. Ulrike Samulowitz
VE-Cadherin	cDNA von murinem VE-Cadherin, kloniert in den Vektor pcDNA3	Dr. Eric Borges
β-Catenin	cDNA von humanem β-Catenin in pcDNA3	Dr. Klaus Ebnet
GST-β-Catenin	cDNA Fragment von murinem β-Catenin (Gene Bank Accession Nr. M 90364) in pGEX-4T1	Dr. Otmar Huber
pFLAG-JAM	JAM-1 cDNA in pFlag-CMV1	Dr. Klaus Ebnet
Flk-1	Flk-1 cDNA in pRK5	[121]
PECAM-1	cDNA von murinem PECAM-1 in pcDNA3	[122]
PECAM-1 CP	Fusionsprotein aus LexA und PECAM-1 zytoplasmatischer Domäne in pcDNA3.1 mycHis A	Dr. Klaus Ebnet

### 3.1.7. Antikörper

#### Primäre Antikörper:

Antigen	Klon	Spezies und Isotyp	Konj.	Referenz / Bezugsquelle
<b>monoklonale Antikörper:</b>				
m VE-Cadherin (CD144)	11D4.1	Ratte IgG <sub>2A</sub>		[54]
p120 <sup>ctn</sup>		Maus IgG <sub>1</sub>		Transduction Laboratories- Pharmingen, Heidelberg
β-Catenin	Clone 14	Maus IgG <sub>1</sub>		Transduction Laboratories- Pharmingen, Heidelberg
VEGF-R2	12α1	Ratte IgG <sub>2A</sub>		BD Biosciences, BD PharMingen, Heidelberg
JAM	BV-11	Ratte IgG		[123]
Phosphotyrosin	RC20H	Rekombinant hergestellter Antikörper	PO	Transduction Laboratories- Pharmingen, Heidelberg
FLAG	M2	Maus IgG <sub>1</sub>		Sigma-Aldrich, Deisenhofen
VE-PTP	VE-PTP 85.1			Dr. Ulrike Samulowitz, diese Arbeit
VE-PTP	VE-PTP 88.1			Dr. Ulrike Samulowitz, diese Arbeit
VE-PTP	VE-PTP 89.1			Dr. Ulrike Samulowitz, diese Arbeit
VE-PTP	VE-PTP 91.1			Dr. Ulrike Samulowitz, diese Arbeit

#### **polyklonale Antikörper:**

Pan-Cadherin		Kaninchen		Sigma-Aldrich, Deisenhofen
N-Cadherin	604	Kaninchen		Dr. Martin Lenter [124]
VE-Cadherin	C5	Kaninchen		dieses Labor
β-Catenin	β Cat C β-Cat N	Kaninchen Kaninchen		dieses Labor
VE-PTP	VE-PTP-C VE-PTP-N	Kaninchen Kaninchen		diese Arbeit
m PECAM-1	M-20	Ziege		Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, USA

## Sekundäre Antikörper

Spezifität	Konjugiert	Referenz / Bezugsquelle
Ziege anti Maus	Peroxidase	Jackson ImmunoResearch, Dianova, Hamburg
Esel anti Maus	Peroxidase	Jackson ImmunoResearch, Dianova, Hamburg
Ziege Anti Kaninchen	Peroxidase	Jackson ImmunoResearch, Dianova, Hamburg
Esel F(ab`2-Fragment anti Kaninchen	Peroxidase	Jackson ImmunoResearch, Dianova, Hamburg
Ziege F(ab`2 Fragment anti Ratte IgG + IgM (H+L)	Peroxidase	Jackson ImmunoResearch, Dianova, Hamburg
Esel F(ab`2-Fragment anti Ratte	Peroxidase	Jackson ImmunoResearch, Dianova, Hamburg

### 3.1.8. Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stämme	Genotype	Reference
<b><u>XL1-blue</u></b>	supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lacF', [proAB <sup>+</sup> , laqI <sup>q</sup> , lacZΔM15 Tn10 (Tc <sup>r</sup> )]	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
<b><u>BL21</u></b>	B F <sup>-</sup> , ompT, hsdS (r <sub>B-</sub> , m <sub>B-</sub> ), gal, dcm	Amersham Biosciences, Freiburg
<b><u>TOP 10</u></b>	F <sup>-</sup> , mrcA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), φ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, deoR, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, (Str <sup>R</sup> ), endA1, nupG	Invitrogen, Groningen, Niederlande
<b><u>DH5a</u></b>	F <sup>-</sup> φ80dlacZΔM15, endA1, hsdR17 (rk <sup>-</sup> , mk <sup>+</sup> ), supE44, thi-l d <sup>-</sup> , gyrA96Δ(lacZYA-argF), U196	Promega, Mannheim

### 3.1.9. verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Referenz
293T	Humane embryonale Nierenzelllinie	Graham et al., 1977 [125]
bEnd.3	Murines mikrovaskuläres Gehirndothel	Prof. Dr. Werner Risau, MPI Bad Nauheim
MyEnd	Mikrovaskuläre Zelllinie aus dem Myokard von Mäusen	Prof. Dr. Detlev Drenkhahn, Institut für Anatomie, Universität Würzburg [126]
COS-7	SV 40 transfizierte Affen-Nieren-Epithelzellen	Gluzman et al., 1981[127]
CHO (dhfr <sup>-</sup> )	Ovarzellen des chinesischen Hamsters	Stanley et al., 1975 [128]
11D4.1	Hybridomlinie	Gotsch et al., 1997 [54]

### 3.1.10. Versuchstiere

Kaninchen (Neuseeland-weiß)  
Ratten (Lewis Ratten)

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Aufzucht und Lagerung von Bakterienkulturen

Bakterien wurden im Wärmeschrank bei 37°C auf LB-Agar-Medien oder im Schüttelinkubator in LB-Medium angezogen. Eine Selektion von Bakterien erfolgte je nach Vektor über Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin oder 20 µg/ml Tetracyclin.

Für Dauerkulturen wurden die Bakterien ü.N. im Schüttelinkubator angezogen und in Gefriermedium bei –80°C gelagert.

spezielle Materialien:

LB-Medium: 10 g Trypton-Pepton  
5 g Hefe-Extrakt  
10 g NaCl  
auf 1 L mit H<sub>2</sub>O auffüllen und sterilisieren

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

Gefriermedium: 7 % DMSO in LB-Medium (v/v)

### 3.2.2. Zellkultur

#### 3.2.2.1. Kulturbedingungen

Zellen wurden in Gewebe-Kulturschalen der Firma Falcon kultiviert. Die Kulturbedingungen sind in der Tabelle zusammengefasst. Für das Passagieren wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und kurzzeitig (1-5 min) mit 0,05% Trypsin / 0,02% EDTA Lösung (Biochrom KG, Berlin) bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann durch pipettieren mit Kulturmedium von der Platte abgelöst und in geeigneten Verdünnungen in neue Kulturschalen gegeben. Endothelzellen wurden alle 3-4 Tage 1:3, COS-7 und 293T Zellen alle drei Tage 1:5 und CHO Zellen alle vier Tage 1:10 passagiert. Hybridomzelllinien wurden

passagiert, indem die Zellen bei 150 g für 5 min zentrifugiert wurden und 1:5 verdünnt in neue Kulturschalen überführt wurden.

---

## Zelllinie/Referenz

## Medium/CO<sub>2</sub>-Gehalt

### bEnd.3

<b>DMEM</b> , Dulbecco's modified Eagle's Medium	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
<b>10% CO<sub>2</sub></b>	Biochrom KG, Berlin
20% fötales Kälberserum (1 h bei 56°C im Wasserbad hitzeinaktiviert)	Gibco Life Technologies
2 mM Glutamin	Gibco Life Technologies
1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	

### MyEnd

<b>DMEM</b> , Dulbecco's modified Eagle's Medium	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
<b>10% CO<sub>2</sub></b>	Biochrom KG, Berlin
10% fötales Kälberserum	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
2 mM Glutamin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	

### CHO-Zellen

(Ovarzellen des chinesischen Hamsters, ATCC CCL-61 [128])

<b>α-MEM</b> , Minimum essential Medium	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
<b>10% CO<sub>2</sub></b>	Biochrom KG, Berlin
10% fötales Kälberserum	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
2 mM Glutamin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	

### 293T-Zellen

(Humane embryonale Nierenzelllinie [125])

<b>DMEM</b> , Dulbecco's modified Eagle's Medium	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
<b>10% CO<sub>2</sub></b>	Biochrom KG, Berlin
10% fötales Kälberserum	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
2 mM Glutamin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	

### COS-7-Zellen

SV 40 transfizierte Affen-Nieren-Epithelzellen, ATCC [127]

<b>DMEM</b> , Dulbecco's modified Eagle's Medium	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
<b>10% CO<sub>2</sub></b>	Biochrom KG, Berlin
10% fötales Kälberserum	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
2 mM Glutamin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	

### **11D4.1-Hybridom**

Ratten IgG<sub>2A</sub> gegen VE-Cadherin, Ursula Gotsch [54]

<b>DMEM</b> , Dulbecco's modified Eagle's Medium	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
<b>10% CO<sub>2</sub></b>	Biochrom KG, Berlin
10% fetales Kälberserum	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
2 mM Glutamin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	

## **3.2.2.2. Metabolische Markierung von Zellen**

Für die metabolische Markierung mit [<sup>35</sup>S] Methionin und Cystein wurden die Zellkulturen mit PBS gewaschen und in Labeling Medium aufgenommen. Nach 1 h wurden dem Medium etwa 300 µCi pro 1 x 10<sup>7</sup> Zellen Pro-MIX zugegeben und die Zellen über Nacht inkubiert.

spezielle Materialien:

Labeling-Medium:

<b>MEM</b> , ohne Methionin und Cystein dialysiertes fetales Kälberserum	Gibco Life Technologies, Karlsruhe Biochrom KG, Berlin
1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
2 mM Glutamin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
1% L-Arginin, L-Leucin, L-Inositol, Glucose (100 x)	Gibco Life Technologies, Karlsruhe

Pro-MIX [<sup>35</sup>S], Amersham Biosciences, Freiburg

## **3.2.2.3. Kryokonservierung von Zellen**

Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen im flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Die Zellen wurden bei 200 g für 5 Minuten bei Raumtemperatur sedimentiert und in einer Konzentration von 2 x 10<sup>6</sup> Zellen / ml Einfriermedium (50% Medium, 40% fetales Kälberserum (FCS, Biochrom KG, Berlin), 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Hohenbrunn) aufgenommen. DMSO diffundiert in die Zellen und kann innerhalb und außerhalb der Zelle die Kristallbildung verhindern. 1 ml Aliquots wurden in Kryoröhrchen (Nunc, Roskilde, Dänemark) überführt und direkt auf Trockeneis gestellt. Für 24 Stunden wurden die Zellen bei - 80°C aufbewahrt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, schnell in einem großen Volumen Medium aufgenommen, sedimentiert und in Kultur genommen.

### **3.2.3. Molekularbiologische Methoden**

#### **3.2.3.1. Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren**

In dieser Arbeit wurden DNA-Isolierungen ausschliesslich nach dem Prinzip der alkalischen Lyse durchgeführt. Die Plasmid-DNA kann aus sehr geringen Mengen Bakterienkultur gewonnen werden und hat einen hohen Reinheitsgrad, so daß die meisten Molekularbiologischen Reaktionen mit dieser DNA durchgeführt werden können. Bei der Alkalischen Lyse erfolgt die Bakterienlyse durch das Detergenz SDS und NaOH. Dadurch werden bakterielle Proteine, sowie Chromosomale und Plasmid-DNA denaturiert. Durch Natriumacetat wird die Lösung neutralisiert, wobei sich die kovalent geschlossene Plasmid-DNA wieder zusammenlagert, die Chromosomale DNA jedoch ausfällt. Proteine fallen mit dem SDS, das als unlöslicher Komplex mit Natrium eine Verbindung eingeht ebenfalls aus. Sowohl chromosomale DNA, als auch Proteine können in einem Zentrifugationsschritt entfernt werden und die verbleibende Plasmid DNA aus dem Überstand anschließend mittels eines Anionenaustauschers und anschließender Alkoholpräzipitation aufgereinigt werden.

##### **3.2.3.1.1. Isolierung von Plasmid DNA**

Für die Isolierung von Nukleinsäuren wurden je nach erforderlicher Menge mit einem DNA-Miniprep Kit oder einem DNA-Maxiprep Kit nach den Angaben der Hersteller gearbeitet. Die DNA wurde in TE-Puffer bei –20°C gelagert.

##### spezielle Materialien:

DNA-Miniprep Kit: "Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit" (Bio-Rad, München)

DNA-Maxiprep Kit: "Qiafilter Plasmid Maxi Kit" (Qiagen, Hilden)

TE-Puffer                    1 M Tris Base, pH 8,0  
(100x):                      100 mM EDTA



### 3.2.3.1.2. Aufreinigung von Nukleinsäuren

Für die Aufreinigung von Nukleinsäuren wurde die DNA über eine Gelelektrophorese in einem Agarosegel nach Fragmentgröße aufgetrennt (siehe 3.2.3.4.). Die DNA wird unter einem Tranilluminator ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ) sichtbar gemacht und das entsprechende DNA Fragment mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Um die DNA von dem Agarosegel zu trennen, wurde ein Gelextraktions-Kit benutzt und die aufgereinigte DNA in  $30 \mu\text{l H}_2\text{O}$  eluiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

spezielle Materialien:

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)

### 3.2.3.2. Präzipitation von Nukleinsäuren

Für die Präzipitation von Nukleinsäuren wurde ein monovalentes Salz (Natriumacetat, pH 4,8-5,2) auf eine Endkonzentration von 0,3 M zu der Nukleinsäure gegeben. Anschließend wurden entweder 2,5 Volumen Ethanol oder 0,8 Volumen Isopropanol zugesetzt. Die Nukleinsäure fällt sofort aus und wurde durch Zentrifugation bei  $20.000 \text{ g}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ,  $15 \text{ min.}$ , präzipitiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und in TE-Puffer aufgenommen.

### 3.2.3.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Nukleinsäuren absorbieren ultraviolettes Licht der Wellenlänge  $\lambda=260 \text{ nm}$  maximal. Die Konzentrationsbestimmung über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von  $260 \text{ nm}$  errechnet sich aus der  $\text{OD}_{260 \text{ nm}}$ , der Verdünnung und einem für DNA, RNA bzw. Oligonukleotiden spezifischem Multiplikationsfaktor.

$$c [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

wobei  $c$  = Konzentration der Ausgangslösung,  $\text{OD}_{260}$  = optische Dichte bei  $260 \text{ nm}$  Wellenlänge,  $V$  = Verdünnungsfaktor und  $F$  = Multiplikationsfaktor (50 für

doppelsträngige DNA, 40 für RNA, 37 für einzelsträngige DNA, 20 für einzelsträngige Oligonucleotide) ist. Diese Art der Nukleinsäurebestimmung eignet sich nur für Lösungen mit einer Mindestmenge von 2,5 µg Nukleinsäuremenge / ml und sehr gut gereinigte Präparation. Aus dem Verhältnis der OD<sub>260 nm</sub> und der OD<sub>280 nm</sub> erhält man außerdem eine Aussage über Proteinkontaminationen in der Lösung. Eine proteinfreie Nukleinsäurelösung weist ein Verhältnis von 1,8-2,0 auf. Für eine weitere Konzentrationsbestimmung bei Nukleinsäuren wurde eine Gelelektrophorese mit einem Konzentrationsstandard durchgeführt.

### 3.2.3.4. Gelelektrophorese in Agarosegelen

In Agarosegelen können DNA-Fragmente von 0,2 – 25 kb voneinander getrennt und identifiziert werden. Um DNA unter einem Transilluminator bei einer Wellenlänge von 366 nm zu visualisieren gibt man der Agarose Ethidiumbromid zu, das mit der DNA interkaliert und bei entsprechender Wellenlänge leuchtet. Mit dieser Methode können Proteinfragmente mit einer Konzentration von 5 ng nachgewiesen werden. Es wurden Gele mit 0,8 – 1,5% Agarose (w/v) benutzt, wobei die Agarose in 1 x TBE-Puffer durch kurzes Aufkochen gelöst wurde. Zu dem Agarosegel wurden nach Abkühlen auf 60°C 0,2 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben und das Gel in eine horizontale Gelapparatur gegossen. Nach Aushärten des Gels wurde der Taschenformer entfernt und das Gel mit 1 x TBE-Puffer überschichtet. Die DNA-Lösungen wurden mit 0,2 Vol. 5 x DNA Probenpuffer versetzt und in die Taschen der erstarrten Agarose gegeben. Um die Größen der DNA Fragmente zuordnen zu können wurde ein DNA-Standard benutzt. Die gelektrophoretische Trennung erfolgte bei 100 V. Für die Analyse des Gels wurde das in der DNA interkalierende Ethidiumbromid auf einem Tranilluminator ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ) visualisiert und mit Hilfe einer Videokamera dokumentiert.

#### spezielle Materialien:

DNA Standard: SMART Ladder (Eurogentec, Heidelberg)

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

TBE (10 X), pH 8,45:   108 g/L Tris  
                              54 g/L Borsäure  
                              40 ml 0,5 M EDTA

### 3.2.3.5. Polymerase-Ketten-Reaktion

Das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR: polymerase chain reaction) ist die enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnitts zwischen zwei Oligonukleotiden, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Das klassische PCR-Programm besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem Anlagerungsschritt (Annealing) und einem Elongationsschritt. Denaturiert wird bei 94°C, dabei trennen sich die beiden Stränge der zu amplifizierenden DNA (Template). Anschließend wird die Temperatur auf die Annealingtemperatur, die meist bei 55°C liegt und abhängig von der Oligonukleotidsequenz ist gesenkt, so daß es zur Hybridisierung der im massiven Überschuß vorhandenen Oligonukleotide kommt. Für die Berechnung der Annealingtemperatur wird näherungsweise die Schmelztemperatur  $T_m$  des Oligonukleotids aus dem GC-Gehalt errechnet:

$$T_m = 4 \times \text{Anzahl G bzw. C} + 2 \times \text{Anzahl A bzw. T}$$

Diese Formel ist nur für kurze Oligonukleotide mit einer Länge um 20 Basen, wie sie in dieser Arbeit benutzt wurden, brauchbar. Für die Elongation wurden DNA-Polymerasen benutzt deren Temperaturoptimum bei 72°C liegt. In dieser Arbeit wurde mit verschiedenen Polymerasen gearbeitet. Für Klonanalysen wurde eine *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* von Life Technologies oder Super *Taq*-DNA-Polymerase von HT Biotechnologies benutzt.

Für Klonierungen wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* von Stratagene benutzt. Diese Polymerase besitzt eine höhere Temperaturstabilität als die *Taq* DNA Polymerase und zusätzlich eine 3'-5' Exonuklease-Aktivität, die Korrekturaktivität (proofreading) erlaubt.

Reaktionsansatz:	10 ng	Template DNA
	5 µl	10 x PCR Puffer
	5 µl	dNTP's (Konzentration: 2,5 mM/dNTP)
	5 µl	5'-Oligonukleotid (Konzentration: 10 µM)
	5 µl	3'-Oligonukleotid (Konzentration: 10 µM)
	1 µl	0,1 M DTT
	2 unit	DNA Polymerase

---

---

H<sub>2</sub>O auf Endvolumen von 25 µl

Methode (Standardbedingungen):

Initiale Denaturierung:	3 min	94 °C
zyklische Programmschritte (30 mal wiederholt):		
Denaturierung:	0,5 min	94°C
Annealing:	0,5 min	55°C
Elongation:	2 min	72°C
Abschluss:	10 min	72°C

spezielle Materialien:

*Pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)

*Taq*-DNA-Polymerase (Life Technologies, Heidelberg)

Super *Taq*-DNA-Polymerase (HT Biotechnologies LTD., Cambridge, England)

10 x *Taq* Puffer: 100 mM Tris-HCl (pH 9.0 bei Raumtemperatur)  
15 mM MgCl<sub>2</sub>  
500 mM KCl

10 x *Pfu* Puffer: 100 mM KCl  
100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
200 mM Tris Cl (pH 8,75)  
20 mM MgSO<sub>4</sub>  
1% Triton®X-100  
1 mg/ml BSA

### 3.2.3.6. Klonierung von Nukleinsäuren in Plasmid-Vektoren

Um DNA Fragmente miteinander zu verknüpfen und in einen Vektor einzuführen, müssen kompatible Enden erzeugt, bzw. Plasmide linearisiert werden. Für die Klonierungen wurden entweder PCR-Fragmente mit Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen, oder vorhandene Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen in Vektorkonstrukten genutzt.

#### 3.2.3.6.1. Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen und hydrolysieren kurze, definierte Nukleotidsequenzen der DNA. Die Restriktionsenzyme wurden in den jeweils mitgelieferten Reaktionspuffern inkubiert. Die Reaktion wurde bei den empfohlenen Temperaturen (meist 37°C) für 1 h durchgeführt und durch Hitzeinaktivierung der Enzyme (10 min 65°C) beendet.

### 3.2.3.6.2. Modifikationen von linearisierten DNA-Fragmenten

#### Klenow-Reaktion

Die Erzeugung glatter Enden ermöglicht die Verknüpfung von DNA Molekülen mit nicht kompatiblen Enden. 5'-Überhänge können aufgefüllt werden, indem eine normale Polymerasereaktion durchgeführt wird. Man gibt dazu DNA, Klenow Fragment, Nucleotide (100 µM Endkonzentration je dNTP) und Puffer zusammen und inkubiert für 20 min bei RT. Anschließend wird die Polymerase durch 10 minütiges Erhitzen auf 75°C inaktiviert.

spezielle Materialien:

Large Fragment of Polymerase I (Klenow-Fragment), (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe)

#### Dephosphorylierung / Kinasierung

Bei der Ligation von Vektor- und Insert-DNA über eine einzige Restriktionsschnittstelle stellt sich das Problem der Selbstligation der Vektorenden. Dieses wird durch die Dephosphorylierung der 5'-Vektorenden und Phosphorylierung der 3'-Insertenden verhindert. Die Phosphorylierung der Insertenden wurde durch Inkubation von 20 pmol Insert-DNA mit 20 nmol rATP und 10 Units der T4 Polynucleotide Kinase (PNK) nach Angaben des Herstellers erreicht. Die Dephosphorylierung der Vektorenden wurde durch Inkubation von 1 pmol Vektor DNA / Unit Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) für 10 min bei 37°C erreicht. Die so behandelte DNA wurde jeweils bei 65°C für 15 min Hitzeinaktiviert oder über eine Gelelektrophorese gereinigt.

spezielle Materialien:

T4 Polynucleotide Kinase, (Boehringer-Mannheim, Mannheim)

Shrimp Alkaline Phosphatase, (Boehringer-Mannheim, Mannheim)

### 3.2.3.6.3. PCR-Klonierung

Zur Klonierung von PCR-DNA-Fragmenten wurden die erhaltenen DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschten Fragmente aus dem Gel eluiert (3.2.3.1.2.). Wenn die Oligonukleotide endständige

Erkennungssequenzen für definierte Endonukleasen hatten, wurde über diese Restriktionsschnittstellen in den gewünschten Vektor kloniert. Andernfalls wurden die PCR-Fragmente mit Hilfe des TOPO-TA Cloning<sup>®</sup> Kit in den Vektor pCR2.1 TOPO kloniert (s. 3.2.3.6.5.).

#### **3.2.3.6.4. Ligation**

Als Enzym für die Ligation wurde die T4 DNA Ligase benutzt. Für die Ligation wurden immer etwa fünfmal mehr DNA-Fragment als Vektor eingesetzt und zwar in Anzahl Molekülen. Bei überstehenden Enden wurde zwischen 2 h RT – ü.N. bei 16°C Inkubation variiert. Für Ligationen mit glatten Enden wurde grundsätzlich ü.N. bei 16°C inkubiert.

spezielle Materialien:

T4 DNA Ligase (Gibco, Karlsruhe)

#### **3.2.3.6.5. Klonierung mit dem TOPO TA System**

Das TOPO TA System der Firma Invitrogen basiert auf der enzymatischen Bildung von Phosphodiester Bindungen linearer DNA Fragmente durch Topoisomerasen. Die Topoisomerase I ist kovalent an einen linearisierten Vektor mit einem 3' T Überhang gebunden. An diesen „aktivierten“ Vektor kann ein DNA-Fragment mit einem 3' A Überhang unter Abspaltung der Topoisomerase gebunden werden.

Als Vektor wurde der Klonierungsvektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> verwendet

##### **3.2.3.6.5.1. Anfügen von 3' A-Überhängen an PCR-Produkte**

*Taq*-DNA-Polymerasen besitzen eine Template unabhängige terminale Transferase-Aktivität, die ein einzelnes Deoxyadenosin an das 3'-Ende eines PCR-Produkts hängt. Da die *Pfu*-DNA-Polymerase, wie auch andere Proof-Reading DNA-Polymerasen keine freien 3'-A Überhänge produziert, wurden diese nachträglich an die DNA-Fragmente angefügt. Dazu wurden 7,5 µl der isolierten DNA mit 1 µl 10 x *Taq*-Polymerase-Puffer, 1µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,3 µl 10 mM dATP und 0,3 µl *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl) versetzt und 15 min bei 72 °C inkubiert.

spezielle Materialien:

Taq-DNA-Polymerase ( Life Technologies, Heidelberg)

### 3.2.3.6.5.2. TOPO<sup>®</sup> Klonierungs-Reaktion und Transformation

Wie vom Hersteller empfohlen, wurde diese Reaktion immer direkt nach der Aufreinigung der PCR-Fragmente nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

spezielle Materialien:

TOPO TA Cloning<sup>®</sup> (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

One Shot TOP10 Chemically Competent *E.coli* (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

## 3.2.3.7. Transformation von Bakterien

### 3.2.3.7.1. Elektrotransformation von E.coli

Erzeugung kompetenter Zellen

Das folgende Protokoll ist für eine 500 ml Kultur und ergibt 20 Aliquots zu je 50 µl kompetenten Zellen. Wichtig: alle Schritte auf Eis, Zentrifugen auf 4°C vorkühlen

Aus einer 5 ml ü.N. Bakterienkultur werden 200 µl in 200 ml frischem LB Medium überimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,7 im Schüttelkolben inkubiert. Die Bakterienkultur wird auf 4°C herabgekühlt und 10 min bei 4000 g pelletiert. Das Bakterienpellet wird mit 200 ml HEPES/NaOH resuspendiert, erneut pelletiert und in 100 ml HEPES/NaOH resuspendiert. Anschließend erfolgt ein Waschschrift mit 50 ml HEPES/NaOH + 10% Glycerin. Nach diesem Schritt werden die Zellen in 1 ml HEPES/NaOH + 10% Glycerin aufgenommen und in 50 µl Aliquots in einem Ethanol/Trockeneisbad gefroren und bei -80°C gelagert.

Elektrotransformation

Einstellungen am BioRad Gene Pulser : für 0,2 cm Küvetten: 2,5kV (=25kV/cm)

für 0,1 cm Küvetten: 1,8kV (=18kV/cm), 25 uF und 200 Ohm

Alle Schritte auf Eis:

- Plasmid DNA in 50 µl H<sub>2</sub>O aufnehmen
- Kompetente *E. coli* vorsichtig auf Eis auftauen
- add 50 µl elektrokompente *E. coli* zu der Plasmid-DNA (Gesamtansatz 100 µl), mischen, in vorgekühlte Mikroküvette überführen und pulsen

- Anschließend 1 ml auf 37°C vorgewärmtes LB Medium hinzufügen und bei 37°C entsprechend dem Antibiotikum inkubieren
- anschließend 10% und 90% des Ansatzes auf Selektionsmedium ausplattieren

### Analyse der Transformationseffizienz

Von Plasmid DNA bekannter Konzentration eine Verdünnungsreihe herstellen

DNA Konzentration:

- 10 ng
- 1 ng
- 100 pg
- 10 pg
- 1 pg

Elektrotransformation durchführen und 1:20 des Volumens unter Selektionsdruck ausplattieren. Gute elektrokompetente Bakterien sollten eine Transfektionseffizienz von  $1 \times 10^9 - 1 \times 10^{10}$  Kolonien/ $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA haben.

### **3.2.3.7.2. Transformation von chemisch kompetenten Bakterien**

25 ml LB Medium werden mit 200  $\mu\text{l}$  einer ü.N. Bakterienkultur angeimpft und bis zu einer Dichte von  $\text{OD}_{600}$  0,3-0,5 inkubiert. Die Bakterien werden anschließend auf 4°C gekühlt und bei 4000 g für 10 min pelletiert. Das Bakterienpellet wird in 2 ml TSS Puffer resuspendiert wodurch die Bakterien sofort kompetent sind. Für einen Reaktionsansatz werden etwa 100  $\mu\text{l}$  kompetente Bakterien mit 1-50  $\mu\text{l}$  DNA-Lösung gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Reaktionsansatz 5 min bei 37°C inkubiert und das Volumen des Ansatzes mit LB Medium verdoppelt. Um die spezifische Selektionsresistenz ausbilden zu können, werden die Bakterien anschließend bei 37°C 30-90 min inkubieren (Inkubationsdauer ist abhängig von dem Selektionsmarker). Die Bakterien werden anschließend auf Ampicillin-haltigen LB-Agar Platten ausplattiert und bei 37°C im Brutschrank ü.N. inkubiert.

#### spezielle Materialien:

TSS Puffer: 9 ml LB (s. 3.2.1.)  
0,5 ml DMSO  
1 g PEG 6000  
0,5 ml 1 M  $\text{MgCl}_2$   
Die Lösung wird Filter sterilisiert und bei 4°C lichtgeschützt gelagert



### 3.2.3.8. Transfektion von Eukaryotischen Zellen

#### 3.2.3.8.1. Transfektion mit Polykationen (DEAE-Dextran)

Das Prinzip der Transfektion mit DEAE-Dextran basiert auf der Bindung von DNA an Polykationen. Diese Dextran-DNA-Komplexe werden auf die Zellen pipettiert, von denen sie per Endozytose aufgenommen wird. In dieser Arbeit wurden für transiente Transfektionen mit dieser Methode die Zelllinie COS-7 verwendet. Die verwendete Lösungen wurden alle auf 37°C temperiert.

Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion auf 90 mm Zellkulturschalen so ausgesät, daß sie am Tag der Transfektion eine Dichte von etwa 50-70 % hatten. Diese Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen und 4 ml Transfektionslösung zugegeben. Nach Inkubation der Zellen für 4 h bei 37°C im Inkubator, wurde die Transfektionslösung abgesaugt. Anschließend wurden 3 ml 10% DMSO in PBS (V/V) zugegeben und für 2 min inkubiert. Diese DMSO-Lösung wurde verworfen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Zellkulturmedium für 36-48 h inkubiert.

##### spezielle Materialien:

Puffer A:	80g/Liter NaCl 3,8 g/Liter KCl 2 g/Liter Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 30 g/Liter Tris Base, pH 7,5 Sterilisation der Lösung durch Filtration mit einem Filter der Porengröße 0,22 µm
Puffer B:	15 g/Liter CaCl <sub>2</sub> 10 g/Liter MgCl <sub>2</sub> Sterilisation der Lösung durch Filtration mit einem Filter der Porengröße 0,22 µm
TBS:	8,9 ml H <sub>2</sub> O 1 ml Puffer A mischen 0,1 ml Puffer B Zugabe von 4 mg DEAE-Dextran
RFC:	8,7 ml DMEM (Gibco) 1 ml BMS (Biochrom/Seromed), 0,1 ml Penicillin/ Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin) 0,1 ml Glutamin (2 mM) 0,1 ml Chloroquin-Lösung (5,19 mg/ml in DMEM)
Transfektionslösung:	1/2 Volumen RFC 2 µg/ml Transfektionslösung DNA mischen 1/2 Volumen TBS

### 3.2.3.8.2. Tranfektion mit GeneJammer™ Transfection Reagent

Diese Methode ist weniger toxisch für die Zellen und hat eine bessere Transfektionseffizienz als die Methode der Transfektion mit Polykationen (DEAE-Dextran). Für die Dreifachtransfektion von COS-7 Zellen und die Transfektion von 293T Zellen wurden die Transfektionen deshalb mit dieser Methode durchgeführt.

Für die Transfektion von Zellen einer 90 mm Kulturschale wurde 1 ml serumfreies Opti-MEM-Medium in ein 6 ml Polystyrol-Rörchen vorgelegt und 24 µl GeneJammer Transfektionslösung langsam zugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurden je DNA Konstrukt 4 µg DNA zugegeben und weitere 10 min bei RT inkubiert. Es wurden Zellen mit einer Konfluenz von 70 % verwendet. Nach Verwerfen des Mediums, wurde 3 ml frisches DMEM-Vollmedium zu den Zellen gegeben. Zu dem Medium wurde dann vorsichtig das Medium-GeneJammer/DNA-Gemisch zugetropft. Anschließend wurden die Zellen 3 h bei 37°C im Inkubator kultiviert. Nach Zugabe von weiteren 6 ml DMEM-Vollmedium wurden die Zellen 24-48 h im Inkubator kultiviert. Nach diesem Zeitraum wurde die Detektion der exprimierten Proteine vorgenommen.

#### spezielle Materialien:

Opti-MEM (Gibco Life Technologies, Heidelberg)

DMEM Vollmedium (Gibco Life Technologies, Heidelberg)

GeneJammer™ Transfection Reagent (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)

Polystyrol-Rörchen, 6 ml (Becton-Dickinson, Heidelberg)

### 3.2.3.9. Klonanalyse mittels PCR-colony-screen

Pro Transfektionsansatz wurden mindestens 10 Klone analysiert. Für den PCR-colony-screen wurden in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen ein 20 µl PCR Reaktionsansatz (3.2.3.5.) vorgelegt. Nach dem Anlegen einer Masterplatte wurde Material einer Kolonie in jedes Gefäß überführt.

Die PCR wurde bei folgenden Bedingungen durchgeführt:

5 min 94°C	
30 sec 94°C, 30 sec 55°C, 1 min 72°C	35 Zyklen
10 min 72°C	

Die Proben wurden anschließend gelelektrophoretisch in einem Agarosegel analysiert (s. 3.2.3.4.).

#### spezielle Materialien:

Taq-DNA-Polymerase (Gibco Life Technologies, Heidelberg)

### 3.2.3.10. Sequenzierung

Die Sequenzierung dient der Analyse der genauen Basenfolge klonierter PCR-Fragmente. Dazu wurden 0,7 µg Plasmid-DNA gemeinsam mit 4 pmol Oligonukleotid, 2 µl ABI Premix mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 5 µl eingestellt und im PCR-Cycler unter folgenden Bedingungen amplifiziert: 2 min 96°C, 25 x (10 sec 96°C, 10 sec 45-60°C (Temperatur ist Oligonukleotid spezifisch), 4 min 60°C), 10 min 60°C. Mit dem PCR-Ansatz wurde anschließend eine Ethanol Fällung durchgeführt, indem 2 µl 3 M Na-acetat, pH 5,2 und 2,5 Volumen Ethanol bei RT zugegeben wurde. Dieses Gemisch wurde 15 min bei 20.000 g, RT zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen und das getrocknete Pellet in 2 µl ABI Loading Buffer aufgenommen, 2 min bei 96°C denaturiert und direkt auf das Sequenziergel aufgetragen.

Für das Sequenziergel wurden 25 ml der Sequenziergel-Lösung mit 175 µl 10% APS und 7,5 µl TEMED versetzt und das Sequenziergel gegossen. Nach der Polymerisation des Gels wurde die Sequenzierung im ABI Prism Sequenator nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### spezielle Materialien:

ABI Loading Buffer (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)

ABI Premix (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)

30 % Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung (Rotiphoresegel 30, Roth, Karlsruhe)

Sequenziergel-Lösung :	180 g Harnstoff
(4,5 % PAA, 6 M Harnstoff)	75 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid Lösung
	60 ml 10 x TBE Puffer
	230 ml H <sub>2</sub> O

## 3.2.4. Proteinbiochemische und Immunbio-chemische Methoden

### 3.2.4.1. Gewinnung von Kaninchen-Antiseren

#### 3.2.4.1.1. Antigen

Antikörper gegen murines VE-PTP wurden gegen synthetische Peptide hergestellt, deren Sequenz aus der Primärstruktur des Proteins entnommen wurde. Für die Peptidsequenzen wurden die C-terminalen 13 Aminosäuren und

die Aminosäuren 35-21 vom C-Terminus, beginnend mit einem zusätzlichen Cystein synthetisiert.

spezielle Materialien:

Peptide:	<u>VE-PTP-1:</u> NH <sub>2</sub> - CLRAKLRNEQENPL - COOH (MPI für Physiologische und Klinische Forschung, Bad Nauheim)
	<u>VE-PTP-C:</u> NH <sub>2</sub> - CNPEYHRDAIYSRH - COOH (BioScience, Göttingen)

### 3.2.4.1.2. Peptid-Ovalbumin-Konjugat

Substanzen von einem Molekulargewicht kleiner 5 kDa können in der Regel auf Grund ihrer Größe nicht als Antigene fungieren. Um die Bildung von Antikörpern auszulösen, müssen Peptide oder andere Moleküle deshalb an einen Träger gekoppelt oder zu hochmolekularen Addukten vernetzt werden. Als Träger dienen Ovalbumin (OVA, 20 mg/ml in PBS) oder das Glykoprotein KLH (keyhole limpet hemocyanin). Um das Peptid an Ovalbumin zu koppeln wurde 1 ml Ovalbumin/PBS in ein 50 ml Falcon Gefäß gegeben und unter Rühren 50 µl einer MBS (Maleindobenzoyl-N-Hydroxysuccinimidester) Lösung (25 mg/ml in DMSO) in Aliquots zu 10 µl in 3 Minuten Abständen zugegeben. Nach weiteren 20 min rühren wurden 55 µl 1M Tris-NaOH, pH 8,0 (pH-Wert ist Peptidabhängig) zugegeben und weitere 30 min gerührt, um die Reaktion abzublocken. Anschließend wurde diese Lösung über eine Sephadex G10 Säule gegeben, die vorher mit TBS äquilibriert wurde. Die Säulen wurden 2 min bei 300 g zentrifugiert und der Durchlauf aufgefangen. Das Peptid wurde in 50 µl DMSO gelöst und unter rühren zu dem Ovalbumin/MBP Gemisch in kleinen Portionen gegeben. Nach weiteren 30 min rühren wurde das gekoppelte Peptid gegen 5 Liter Kopplungspuffer dialysiert. Von jedem Arbeitsschritt wurde eine Probe aufbewahrt und über SDS-PAGE analysiert.

### 3.2.4.1.3. Immunisierung

Das gekoppelte Peptid wurde mit Freund`s Adjuvant sowohl intradermal, als auch subkutan über die gesamte Rückenpartie des Kaninchens verabreicht. Die Immunisierungen wurden in 3-wöchigen Abständen aufgefrischt, wobei jeweils 10 Tage nach Verabreichung des Antigens zum Test auf spezifische Antikörperaktivität eine Blutentnahme (max. 50 ml) erfolgte. Um eine vollständige Blutgerinnung zu ermöglichen wurden die Proben für 30 min bei 37°C inkubiert, danach über Nacht bei 4°C aufbewahrt und anschließend durch

dreimalige Zentrifugation (3000 g, 10 min, 4°C) vom Blutkuchen getrennt und in 2 ml Portionen aliquotiert. Das Serum wurde bei -20°C gelagert.

#### **3.2.4.1.4. Affinitätsreinigung von polyklonalen Antikörpern**

Der Peptidantikörper gegen VE-PTP wurde affinitätsgereinigt. Hierzu wurde das Peptid, das als Antigen eingesetzt wurde über BSA an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt. CNBr aktivierte Sepharose bindet NH<sub>2</sub> Gruppen kovalent, daher dürfen keine Tris- oder Protein-haltigen Puffer verwendet werden.

Für die Kopplung an BSA wurden zuerst MBS an BSA gekoppelt und anschließend das Peptid über das Cystein an MBS gekoppelt. Zu 1 ml BSA in PBS (20 mg/ml) wurden bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren 50 µl MBS (25 mg/ml in DMSO) in 10 µl Fraktionen zugegeben und anschließend weitere 20 min gerührt. Zu dieser Lösung wurden 55 µl 1 M Tris (pH 8,0) gegeben und weitere 30 min gerührt. Diese Lösung wurde über eine Sephadex G10 Säule gegeben und abzentrifugiert (2000 g, 2 min). 4 mg Peptid wurden in 50 µl DMSO gelöst und unter ständigem Rühren zu der Lösung in 10 µl Portionen gegeben. Nach weiteren 30 min rühren wurde das gekoppelte Peptid gegen 5 Liter Kopplungspuffer dialysiert.

Für die Kopplung an CNBr Sepharose wurde 1 g CNBr Sepharose in 1 mM HCl für 10 min bei Raumtemperatur quellen gelassen. Anschließend wurde mit 200 ml 1 mM HCl gewaschen. Die Sepharose ist sofort aktiv und wurde in eine Econo Säule überführt und dort zusammen mit dem BSA-Peptid für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde mit 10 ml Puffer A gewaschen und mit 5 ml 1 M Ethanolamin für weitere 2 Stunden inkubiert, um freie aktive Gruppen zu blockieren. Abschließend wurde mit 50 ml Puffer A und 10 ml Puffer B gewaschen. Die fertige Säule wurde in Bead-Puffer bei 4°C gelagert.

Für die Affinitätsreinigung wurden 2 ml Serum mit der Säule über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Durchlauf wurde aufgefangen und für eine weitere Aufreinigung benutzt. Anschließend wurde mit 100 ml Bead-Puffer gewaschen. Der Antikörper wurde mit 10 ml Elutionspuffer (0,1 M Glycin, pH 2,8, 0,02% Na-Azid) eluiert und in vorbereiteten Eppendorf Reaktionsgefäßen, in denen 50 µl 1 M Tris-HCL pH 9,5 vorgelegt waren, aufgefangen. Über Messung der OD<sub>280</sub> und SDS-PAGE wurde der aufgereinigte Antikörper analysiert und quantifiziert.

spezielle Materialien:

MBS, (m-Malimidobenzoyl-N-Hydroxysuccimidester) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)  
 micro collodion bags (Sartorius, Göttingen)

Puffer A, pH 8,3:	0,1 M NaHCO <sub>3</sub> 0,5 M NaCl
Bead-Puffer, pH 8,4:	20 mM Tris-HCl 130 mM NaCl 0,04% Natrium-Azid

### 3.2.4.2. Herstellung und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Das Glutathione-S-Transferase (GST) Fusionsprotein System ist ein integriertes System für die Expression, Aufreinigung und Detektion von Fusionsproteinen, die in *E.coli* produziert werden. Die Fusionsproteine können zu Interaktionsstudien mit Proteinen *in vitro* oder Präzipitations-Experimenten aus Zellysaten verwendet werden. In dem verwendeten System wird die Expression der Fusionsproteine durch IPTG Induktion erreicht. Um diese Proteine quantitativ aufzureinigen zu können, sollten sie im Zytoplasma der Zelle als lösliche Proteine angereichert werden. Probleme bei dieser Methode können jedoch entstehen, falls stark unpolare Anteil in dem Fusionsprotein vorhanden sind. In diesem Fall können diese Proteine in sogenannten „inclusion bodies“ abgelagert werden, was die Ausbeute der anschließenden Aufreinigung deutlich verringert. Die Aufreinigung der Fusionsproteine erfolgt über Affinitätschromatographie an Glutathion (GSH)-Sepharose.

Verschiedene cDNA Fragmente wurden in Plasmide des pGEX-Vektorsystems kloniert. Diese Vektoren enthalten die kodierende DNA-Sequenz für Glutathion-S-Transferase (GST) unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors. Als Bakterienstamm für die Expression dieser Proteine wurde *E.coli* BL21 benutzt, da dieser Stamm Protease defizient ist und daher die Gefahr proteolytischer Degradation des GST-Fusionsproteins während der Aufreinigung minimiert wird.

Bakterienklone wurden in 20 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin ü.N. angezogen. Von dieser Kultur wurden 100 µl in 100 ml frischem LB Medium und 2% Glucose bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 im Schüttelinkubator bei 30°C inkubiert. Zu dieser Bakterienkultur wurde anschließend durch Zugabe von IPTG in einer

Endkonzentration von 1 mM die Proteinbiosynthese des Fusionsproteins induziert und für 1 Stunde bei 30°C inkubiert. Die Bakterienkultur wurde auf 4°C abgekühlt und bei 4000 g, 15 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml 4°C kaltem Lysispuffer aufgenommen und in einer French Pressure Cell Press lysiert. Das Lysat wurde anschließend für 15 min bei 10.000 g und danach für 30 min bei 47.000 g zentrifugiert und dann durch einen 0,45 µm Sterilfilter gegeben. Von der Glutathion-Sepharose wurden 400 µl Beads 2 x mit Wasch-PBS gewaschen und anschließend in eine Econo-Säule gegeben und mit Wasch-PBS, 1% Triton X-100 equilibriert. Das Bakterienlysate wurde über diese Säule gegeben und mit 50 ml Wasch-PBS gewaschen. Anschließend wurden die gebundenen GST-Fusionsproteine mit 10 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert und die Fraktionen mit einer OD<sub>280</sub> >0,1 in eine Dialysekassette überführt und gegen 50 mM HEPES-NaOH, pH 7,4 ü.N. dialysiert. Die Proteinlösung wurde über eine Centricon Membran konzentriert. Die Konzentration der aufgereinigten Fusionsproteine wurde über Messung der OD<sub>280</sub> und SDS-PAGE (s. 3.2.4.5.) durch Vergleich mit einer BSA-Verdünnungsreihe nach Coomassie-Blau Färbung (s. 3.2.4.10.2.) quantifiziert und analysiert. Die Proteine wurden in 50 % Glycerin bei -20°C gelagert.

#### spezielle Materialien:

LB-Medium: (s. 3.2.1.)

Lysis buffer : PBS, 1% Triton X-100, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1 Tablette "Complete" Protease inhibitor Cocktail tablets (ohne EDTA), Boehringer-Mannheim, Mannheim

Wasch-PBS: 140 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
ad 1 l H<sub>2</sub>O

Elutionspuffer: 100 mM Tris-HCl, pH 8,0  
10 mM Glutathione  
10 µg/ml Leupeptin

Dialysekassette: Slide-A-Lyzer<sup>®</sup> Cassette (Pierce, Rockford, USA)

Centricon YM-30 (Millipore, Bedford, USA)

### **3.2.4.2.1. Präzipitation mit GST- Fusionsproteinen**

Mit dieser Methode können Protein-Protein Interaktionen biochemisch analysiert werden. Dazu werden die gereinigten GST-Fusionsproteine an Glutathione Sepharose Beads durch Inkubation bei 4°C für 2 h gebunden. Dieser Protein-

Bead Komplex wird dann mit einem metabolisch markierten Zellysat oder aufgereinigten und Radioaktiv markierten Proteinen inkubiert und präzipitierte Proteinkomplexe mittels SDS-PAGE und nachfolgend Fluographie nachgewiesen werden.

Für diese Methode wurden Proteine, die *in vitro* über das TNT<sup>®</sup> Quick coupled transcription / translation System exprimiert wurden eingesetzt (s. 3.2.4.3.).

Je Probe wurden 20 µl Glutathion-Sepharose Beads in Eppendorf-Reaktionsgefäßen 3 x mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend in 1 ml Lysepuffer Puffer aufgenommen. Zu diesen Proben wurden 10-100 µg Fusionsprotein / Probe gegeben und 1 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die Beads wurden anschließend 3 x mit Lysepuffer gewaschen und in 1 ml Lysepuffer aufgenommen.

Die immobilisierten Fusionsproteine wurden anschließend mit 20-50 µl der Proben aus der „In Vitro Transcription / Translation“ bei 4°C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden sie 5 x mit jeweils 1 ml Lysepuffer gewaschen, durch SDS-PAGE aufgetrennt (s. 3.2.4.10.1.) und mittels Fluographie nachgewiesen (s. 3.2.4.10.3.).

#### spezielle Materialien:

Lysepuffer, pH 7,2: 150 mM NaCl,  
50 mM Tris-HCl  
1 mM CaCl<sub>2</sub>  
1% Triton X-100  
0,04% Natrium-Azid  
frisch:  
0,5 mM DTT  
1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)  
10 µg/ml Aprotinin  
2 µg/ml Pepstatin A  
10 µg/ml Leupeptin

### **3.2.4.3. *In vitro* Transkription / Translation in Retikulozytenlysaten**

Zur Herstellung von nicht post-translational modifizierten Proteinen wurde das TNT<sup>®</sup> Quick Coupled Transcription/Translation System von Promega benutzt. Basierend auf den Angaben des Herstellers wurde die DNA einer Plasmid Isolierung (s. 3.2.3.1.1.) präzipitiert und unter RNase freien Bedingungen



aufgereinigt. Als Versuchsansatz wurden 40 µl TNT Retikulozytenlysat mit 1 µg Plasmid und 2 µl <sup>35</sup>S-Methionin auf ein Endvolumen von 50 µl eingestellt und für 2 h bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Von dem Lysat wurden 2 µl in einem SDS-PAGE und anschließender Fluographie (s3.2.4.10.1. und 3.2.4.10.3.) analysiert. Das restliche Lysat wurde in die Reaktion eingesetzt.

spezielle Materialien:

Redivue L-[<sup>35</sup>S] Methionine (Amersham Biosciences, Braunschweig)  
TNT<sup>®</sup> Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega, Mannheim)

### 3.2.4.3.1. *in vitro* Phosphorylierung der TNT Lysate mit der Src Kinase

Um Proteine aus der *in vitro* Transkription / Translation an ihren Tyrosin-Gruppen zu phosphorylieren, wurde 45 µl des Reaktionsansatzes mit 30 µl Kinase Puffer, 3 µl 10 mM rATP und 2,5 µl aufgereinigter p60c-src Kinase (3 U/µl) aufgenommen und mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 300 µl eingestellt. Es erfolgte eine weitere Inkubation bei 30°C für 20 Minuten.

spezielle Materialien:

10 x Kinase	200 mM Hepes, pH 7,4
Puffer:	100 mM MgCl <sub>2</sub>
	20 mM MnCl <sub>2</sub>
Src (p60c-Src) (Upstate, Lake Placid, NY, USA)	

### 3.2.4.4. Aufreinigung von Fc-Fusionsproteinen

Für die Aufreinigung der Ektodomäne von VE-PTP wurden COS-7 Zellen transient mit dem Konstrukt VE-PTP FNIII 1-17 Fc transfiziert. Die Zellen wurden dann mit DMEM Vollmedium kultiviert, wobei IgG depletiertes fötales Kälberserum zugesetzt wurde. Nach zwei Tagen Inkubation der Zellen wurde der Überstand 500 µg Protein-A-Sepharose für 4 h unter Rotation bei 4°C inkubiert. Das Überstand-Bead Gemisch wurde dann auf eine Säule gegeben und mit 100 ml PBS, 500 mM NaCl gewaschen. Anschließend wurde mit 10 ml Elutionspuffer (0,1 M Glycin pH 2,8, 0,04% NA-Azid) eluiert. Das Eluat wurde in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße aufgenommen, in denen 50 µl 1 M Tris-HCL

Puffer, pH 9,5 vorgelegt waren. Die Protein-Lösungen wurden anschließend ü.N. gegen PBS dialysiert.

spezielle Materialien:

Dialysekassette: Slide-A-Lyzer® Cassette (Pierce, Rockford, USA)

### 3.2.4.5. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Proteinkonzentrationen wurden photometrisch bei einer o.D. von 280 nm bestimmt, wobei die o.D. 1 etwa 1 mg/ml Protein entspricht. Zusätzlich wurden die Proteine und ein BSA-Standard über SDS-PAGE aufgetrennt und über Coomassie Färbung die relative Konzentration ermittelt. Für genaue Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden die Proteine photometrisch bei 562 nm mit dem BCA Reagenz (Bicinchoninic acid) bestimmt. Das Reagenz wurde nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Standardisierung wurde BSA eingesetzt. Konzentrationen wurden in einem Bereich von 25-250 µg Protein/ml gemessen.

spezielle Materialien:

BCA-Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, USA)

### 3.2.4.6. Herstellung von Zellysaten für Immunopräzipitationen

Für eine Immunpräzipitation mit transient transfizierten COS-7 Zellen wurden etwa  $1 \times 10^6$  Zellen pro Immunpräzipitation eingesetzt. Für die Immunpräzipitationen von VE-PTP aus bEnd.3 wurden zwischen  $1 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^7$  Zellen und für Immunpräzipitationen mit metabolisch markierten Zellen etwa  $3 \times 10^5$  Zellen eingesetzt.

Zur Herstellung des Lysats wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Lysepuffer versehen. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Platte gelöst für 10 min bei 4°C lysiert. Wenn phosphorylierte Proteine analysiert werden sollten, wurde noch 1 % einer Pervanadatlösung in den Lysepuffer gegeben (50 mM Orthovanadate mit 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Inkubation von 15 Minuten bei RT). Für die Koimmunpräzipitation von VE-Cadherin durch VE-PTP in bEnd.3 Zellen wurden die Zellen in 10 ml

PBS, 1 mM DTT, 2 mM PMSF, 2 µg/ml Pepstatin mit einem Zellschaber geerntet, bei 200g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml Lysepuffer aufgenommen und 1 h bei 4°C unter Rotation extrahiert.

Die Detergenz-unlösliche Zytoskelett- und Kernfraktion wurde durch Zentrifugation (20.000 g, 15 min, 4°C) abgetrennt und der Überstand der Immunpräzipitation zugeführt. Für Immunpräzipitationen an bEnd.3 Zellen gegen VE-PTP wurde das Lysat zusätzlich bei 100.000 g für weitere 60 min zentrifugiert.

#### spezielle Materialien:

Lysepuffer, pH	150 mM NaCl,
7,2:	50 mM Tris-HCl
	1 mM CaCl <sub>2</sub>
	1% Triton X-100
	0,04% Na-Azid
	frisch:
	0,5mM DTT
	1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)
	10 µg/ml Aprotinin
	2 µg/ml Pepstatin A
	10 µg/ml Leupeptin

### **3.2.4.7. Immunpräzipitation**

Immunpräzipitationen wurden bei 4°C durchgeführt. Die Antikörper wurden vor der Inkubation mit dem Lysat an 30 µl Protein A – Sepharose (PAS) oder Protein G – Sepharose (PGS) durch 2 h Inkubation unter ständiger Rotation gekoppelt. Affinitätsgereinigte Antikörper wurden in einer Größenordnung von 5-10 µg eingesetzt, von Hybridomüberständen wurden 5-10 ml Überstand eingesetzt. Der Antikörper-Bead Komplex wurde 2 x mit Lysis Puffer gewaschen und mit den Lysaten für 4 h oder über Nacht unter Rotation inkubiert. Bei sequentiellen Immunpräzipitationen, d.h. bei mehreren aufeinanderfolgenden Immun-präzipitationen mit verschiedenen Antikörpern am gleichen Lysat wurden Inkubationen mit Protein A- oder Protein G-Sepharose eingeschoben, um Reste zurückgebliebenen Antikörpers der vorhergehenden Präzipitation zu entfernen. Die Sepharose mit den gebundenen Antikörper-Antigen-Komplexen wurde fünfmal mit 1 ml Lysepuffer gewaschen und Präzipitate mittels SDS-PAGE aufgetrennt (s. 3.2.4.10.1.) und bei der Immunpräzipitation an radioaktiv

markierten Zellen durch Fluorographie (s. 3.2.4.10.3.), bei Immunpräzipitationen an unmarkierten Zellen durch Immunblotanalysen (s. 3.2.4.10.4.) analysiert.

spezielle Materialien:

SDS-PAGE	200 mM Tris-HCl, pH 6,8
Probenpuffer	6 % SDS
	30 % Glycerin
	frisch:
	30 mM DTT

Protein A Sepharose (Amersham Biosciences, Freiburg)  
Protein G Sepharose (Amersham Biosciences, Freiburg)

### **3.2.4.8. *in vitro* Dephosphorylierung von Proteinen**

Für die *in vitro* Dephosphorylierung von präzipitierten Proteinen aus bEnd.3 Lysaten wurden bEnd.3 Zellen 5 Minuten mit 5 % einer Pervanadatlösung (50 mM Orthovanadate mit 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Inkubation von 15 Minuten bei RT) behandelt. Nach einer Immunpräzipitation gegen VE-Cadherin mit dem C5 Antikörper wurden die Präzipitate in 0,5 ml Dephosphorylierungspuffer aufgenommen. Zu diesem Reaktionsansatz wurden GST-VE-PTP Fusionsproteine zugegeben und bei 25 °C im Brutschrank inkubiert. Nach der Reaktion wurde drei Mal mit Lysepuffer gewaschen und die Präzipitate in SDS-PAGE Probenpuffer (s. 3.2.4.10.1.) aufgenommen

spezielle Materialien:

Dephosphorylierungspuffer:	50 mM HEPES, pH 7,5
	1 mg/ml BSA
	5 mM EDTA
	10 mM DTT

### **3.2.4.9. Nachweis von Proteinen**

#### **3.2.4.9.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)**

Um Proteine gelelektrophoretische aufzutrennen, wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele (SDS-PAA-Gele) nach Laemmli (1970) verwendet. Es wurden 1,5 mm dicke Flachbett-Gele des Formats 6 x 9 cm (Länge x Breite)

eingesetzt. Die Zusammensetzung der Gellösungen ist in der folgenden Tabelle angegeben.

Sammel und Trenngellösungen		
Ausgangslösung	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid/N,N'-Methylen-bis-acrylamid (30%/0,8% (w/v))	4% (w/v)	6-12 % (w/v)
0,5 M Tris-HCL, pH 6,8	125 mM	
1,5 M Tris-HCL, pH 8,8		375 mM
APS (10% w/v)	0,1% (w/v)	0,1% (w/v)
TEMED	0,1% (w/v)	0,1% (w/v)

Für die Gelelektrophorese wurden die Proteingemische mit einem 1-4 fach konzentrierten Probenpuffer versetzt, 4 min im kochenden Wasserbad inkubiert und mit 90-150 V aufgetrennt. Die Weiterbehandlung des Gels richtet sich nach der beabsichtigten Detektionsmethode der aufgetrennten Proteine (Fluorographie, Immunoblot, Coomassiefärbung) und ist in den entsprechenden Kapiteln beschrieben.

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurden folgende Standard-Proteine verwendet:

Markerprotein-Gemisch von 6.5 – 200 kDa

Aprotinin	MG 6,5 kDa
Lysozym	MG 14 kDa
Soybean trypsin inhibitor	MG 21 kDa
Kohlensäureanhydrase	MG 31 kDa
Ovalbumin	MG 45 kDa
Rinderserumalbumin	MG 66 kDa
Phosphorylase B	MG 97,4 kDa
$\beta$ -Galaktosidase	MG 116 kDa
Myosin	MG 200 kDa

Radioaktiv markierte Markerproteine, markiert mit  $^{14}\text{C}$ -Methylgruppen

Kohlensäureanhydrase	MG 30 kDa
Ovalbumin	MG 46 kDa
Rinderserumalbumin	MG 69 kDa
Phosphorylase B	MG 97,4 kDa
Myosin	MG 200 kDa

spezielle Materialien:

Probenpuffer (1 fach): 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8  
2% (w/v) SDS  
10% (v/v) Glycerin  
0,01% (w/v) Bromphenolblau  
50 mM DTT

Elektrophoresepuffer 25 mM Tris, pH 8,3  
192 mM Glycin  
0,1% (w/v) SDS

Molecular Weight Standard broad range (Bio-Rad, München)  
[<sup>14</sup>C] Protein Molecular Weight Marker (Amersham Biosciences, Freiburg)

### **3.2.4.9.2. Färben von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blau**

Zur Detektion von Proteinen im µg Bereich wurden Polyakrylamid-Gele für 30 min in Färbelösung (46% (v/v) Methanol, 8% (v/v) Essigsäure, 0,2% (w/v) Coomassie Blau R250 inkubiert und mit 50% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure unter mehrmaligem Badwechsel entfärbt.

### **3.2.4.9.3. Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen durch Fluorographie**

Gele mit radioaktiv markierten Proteinen wurden für 30 min in 10% (v/v) Essigsäure fixiert und anschließend für weitere 30 min in Amplify<sup>TM</sup> inkubiert und dann auf Wasser benetztem Gel-Blotpapier mit Haushaltsfolie überspannt und auf einem Geltrockner im Membranpumpenvakuum bei 80°C getrocknet. Die getrockneten Gele wurden bei -80°C in Gegenwart einer Verstärkerfolie für 1-4 Tage auf Kodak Xomat Röntgenfilm exponiert.

spezielle Materialien

Amplify<sup>TM</sup>, NAMP 100 (Amersham Biosciences, Freiburg)

### **3.2.4.9.4. Immunblot**

Die Immunblot-Technik dient zur Identifizierung von Proteinen in komplexen Gemischen. Dafür benutzt man Antikörper als spezifische Sonde. Mit der Methode des Elektrotransfers können Proteingemische nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf Nitrozellulosemembranen übertragen

werden. Für den Elektrotransfer wurde ein Semi-Trockenblotgerät der Firma Biometra, Göttingen verwendet. Der Transfer erfolgte in einem diskontinuierlichen Puffersystem über einen Zeitraum von 30-60 min mit 5 mA/cm<sup>2</sup> auf Nitrozellulose in Transferpuffer. Zur Detektion von Markerproteinen wurde der Filter mit Ponceau S (0,2% (w/v) Ponceau S, Serva, Heidelberg in 3% (v/v) TCA angefärbt. Freie Bindungsstellen auf dem Filter wurden mit blocking-Puffer (TBST-Puffer, 8% (w/v) Magermilchpulver) abgesättigt. Für die Detektion im anschließenden Immunblot gegen Phosphotyrosine wurde statt Magermilchpulver 1% (w/v) Rinderserumalbumin zum Absättigen freier Bindungsstellen benutzt. Anschließend wurde die Membran mit dem gewünschten Antikörper für 1 h bei RT in blocking-Puffer inkubiert. Affinitätsgereinigte Antikörper wurden in einer Konzentration von 1-2 µg/ml verwendet, Hybridomüberstände wurden 1:2 in blocking-Puffer eingesetzt. Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit blocking-Puffer entfernt. Anschließend wurde mit einem Peroxidase konjugierten Zweitantikörper (Konzentration 1µg / 10 ml), der gegen den Erstantikörper gerichtet war, weitere 30 min inkubiert und 3 x mit TBST gewaschen. Anschließend wurde eine ECL Reaktion nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

spezielle Materialien:

10 x Transferpuffer	48 mM Tris-HCl, 39 mM Glycin, 0,037 % SDS, 10% Methanol
TBST	140 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 7,4, 2 mM KCl, 0,01% Tween <sup>®</sup> 20,

ECL<sup>™</sup> western blotting detection reagent (Amersham Biosciences, Freiburg)

## 4. Ergebnisse

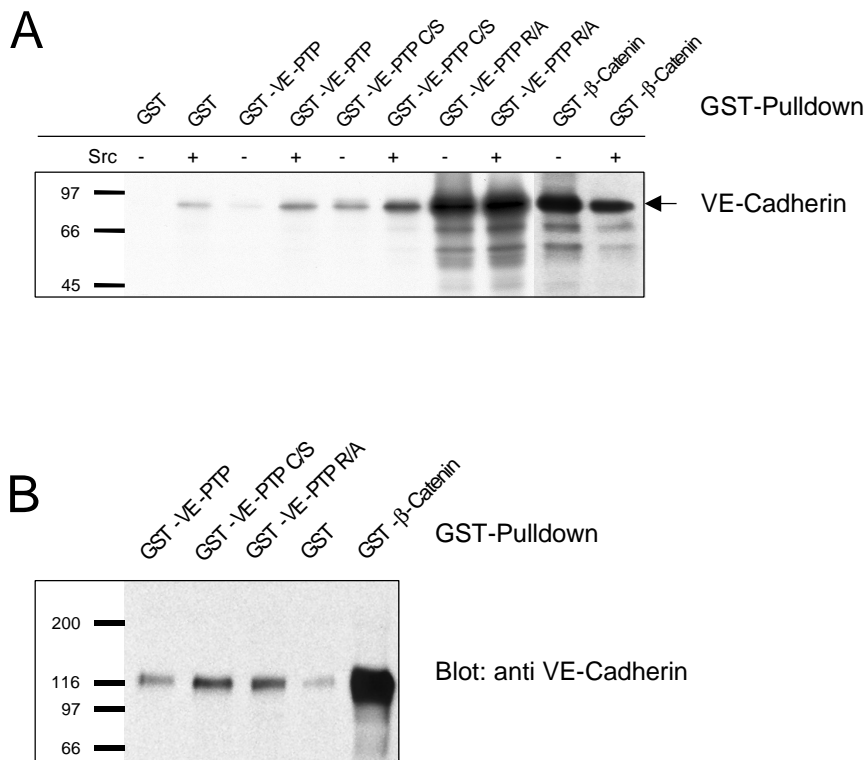
### 4.1. Identifizierung von VE-Cadherin assoziierten Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatasen

Zielsetzung dieser Arbeit war die Identifikation von Proteinen, die regulatorisch auf die Aktivität von VE-Cadherin bei der Bildung und Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten wirken. Es gibt viele indirekte Hinweise, daß Tyrosin Phosphorylierung von Proteinen des Cadherin-Catenin-Komplexes eine Möglichkeit der Modulation Cadherin vermittelter Adhäsion von Zellen darstellt. Der Phosphorylierungsgrad von Proteinen wird durch ein komplexes Zusammenspiel von Kinasen und Phosphatasen bestimmt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach Phosphatasen gesucht, die biochemisch nachweisbar mit Proteinen des VE-Cadherin-Catenin-Komplexes interagieren und regulatorisch auf den Phosphorylierungs-Zustand dieses Protein-Komplexes einwirken können. Ein möglicher Kandidat ist die Rezeptor-Protein-Tyrosin-phosphatase VE-PTP (Vascular Endothelial - Protein Tyrosine Phosphatase) [95]. Für diese Phosphatase ist gezeigt worden, daß sie endothelspezifisch exprimiert wird. Bislang ist erst eine Interaktion dieser Phosphatase mit Tie-2, einem Rezeptor für Angiopoetin beschrieben. Aufgrund der Endothelspezifität wurde VE-PTP in dieser Arbeit auf mögliche Interaktionen mit Proteinen des Cadherin-Catenin-Komplexes und weiteren Adhäsionsmolekülen der lateralen Zell-Zell-Kontakte untersucht.

### 4.2. Die Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatase VE-PTP bindet an VE-Cadherin

Um die mögliche Interaktion zwischen VE-Cadherin und VE-PTP zu untersuchen, wurden Präzipitationen von VE-Cadherin mit Fusionsproteinen der Glutathion-S-Transferase (GST) und VE-PTP durchgeführt. In diesen Experimenten wurden GST-VE-PTP Fusionsproteine eingesetzt, die den zytoplasmatischen Bereich von VE-PTP umfassen [95].





**Abbildung 4.1.: Präzipitation von VE-Cadherin mit GST-VE-PTP**

A: *In vitro* Translation von VE-Cadherin und Präzipitation mit den GST-Fusionsproteinen GST-VE-PTP, GST-VE-PTP C/S und GST-VE-PTP R/A, oder der Negativkontrolle GST. Als Positivkontrolle wurde GST- $\beta$ -Catenin eingesetzt. Nach der Translation wurde VE-Cadherin mit der Kinase p60-c-Src inkubiert (Src +). GST-Fusionsproteine und gebundene Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die präzipitierten Proteine wurden anschließend in einer Fluorographie analysiert. B: Präzipitation von VE-Cadherin mit GST-VE-PTP Fusionsproteinen aus Triton X-100 Lysaten von jeweils  $1 \times 10^7$  bEnd.3 Zellen. Die Präzipitate wurden nach Gelelektrophorese auf Nitrozellulose transferiert und im Immunblot mit einem anti VE-Cadherin Antikörper analysiert. Die Positionen der Molekulargewichtsmarker sind auf der linken Seite in kDa angegeben.

Zusätzlich zu dem Wildtyp GST-VE-PTP Fusionsprotein wurden Konstrukte verwendet, in denen die katalytische Aktivität durch Einführung von Punktmutationen inaktiviert war. Die Mutation der Aminosäuren Cystein zu Serin (GST-VE-PTP C/S), bzw. Arginin zu Alanin (GST-VE-PTP R/A) führt zu einer Inaktivierung der katalytischen Aktivität von Phosphatasen. Darüber hinaus stabilisieren diese Mutationen die ansonsten transienten Übergangskomplexe von PTPs während der Interaktion mit ihren Substraten [129]. Als Positivkontrolle wurde ein GST- $\beta$ -Catenin Fusionsprotein und als Negativkontrolle GST eingesetzt. VE-Cadherin wurde in Retikulozytenlysat *in vitro* exprimiert, wobei nach der Translationsreaktion die Hälfte des Lysates mit der Kinase p60-c-Src inkubiert wurde, um eine Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin zu erreichen. Diese Phosphorylierung wurde vorgenommen, um auch phosphorylierungsabhängige Bindungen, wie sie für SHP-2 und PECAM-1 beschrieben sind, zu erkennen [26]. Mit 10  $\mu$ g der verschiedenen GST-

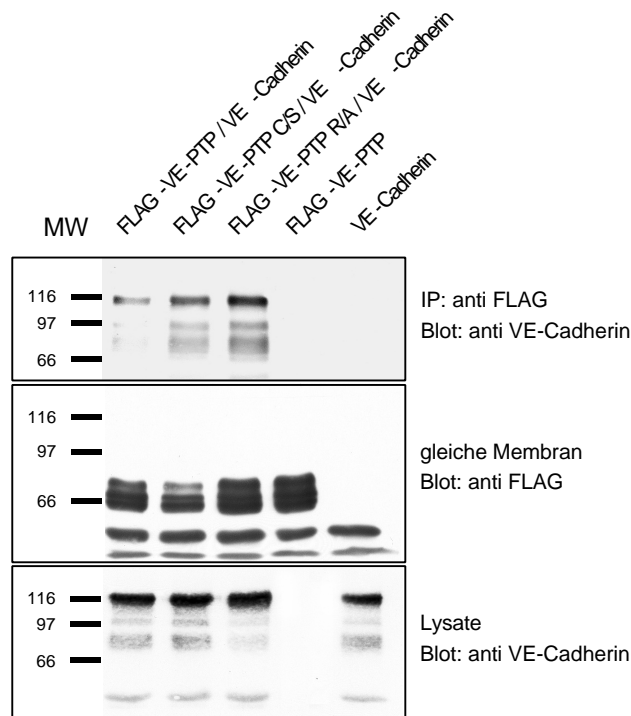
Fusionsproteine wurde anschließend eine Präzipitation durchgeführt und die Präzipitate nach Gelelektrophorese in einer Fluorographie analysiert.

In diesen Versuchen wurde eine Bindung zwischen VE-Cadherin und den katalytisch inaktiven GST-VE-PTP Fusionsproteinen gezeigt. Diese Bindung konnte in verschiedenen unabhängigen Experimenten nachgewiesen werden (Abb. 4.1. A). Das Wildtyp GST-VE-PTP Fusionsprotein zeigt jedoch verglichen mit der Negativkontrolle (GST) keine selektive Bindung zu VE-PTP. Nach der Inkubation von VE-Cadherin mit der Kinase p60-c-Src konnte eine verbesserte Interaktion der GST-Fusionsproteine mit VE-Cadherin nachgewiesen werden. Diese Bindung ist jedoch eher auf ein unspezifisches Bindungsverhalten von phosphoryliertem VE-Cadherin zurückzuführen, da auch eine bessere Interaktion zwischen der Negativkontrolle GST und phosphoryliertem VE-Cadherin gezeigt wurde. Um diese Befunde weiter zu untersuchen, wurden Präzipitationen mit GST-VE-PTP Fusionsproteinen in Triton X-100 Extrakten von bEnd.3 Zellen durchgeführt. Die Lysate von  $1 \times 10^7$  Zellen wurden mit 100 µg der verschiedenen GST-Fusionsproteine inkubiert. Anschließend erfolgte eine Auftrennung der präzipitierten Proteine mittels SDS-PAGE. Die Präzipitate wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und im Immunblot mit einem Antikörper gegen VE-Cadherin analysiert (Abb. 4.1. B). In diesem System konnte eine sehr schwache Bindung zwischen dem GST-VE-PTP Fusionsprotein und VE-Cadherin detektiert werden. Die katalytisch inaktivierten GST-VE-PTP Fusionsproteine zeigten wieder eine bessere Bindung an VE-Cadherin, verglichen mit dem Wildtyp GST-VE-PTP Fusionsprotein. Diese Ergebnisse deuten auf eine schwache Interaktion zwischen VE-PTP und VE-Cadherin hin.

#### **4.2.1. Assoziation von VE-Cadherin mit VE-PTP in heterologen Expressionssystemen**

Für eine weitere Charakterisierung der Assoziation von VE-PTP und VE-Cadherin wurden Koimmunpräzipitationen beider Moleküle in einem heterologen Expressionssystem durchgeführt. Dafür wurden COS-7 Zellen transient mit VE-Cadherin und FLAG-VE-PTP transfiziert. Die FLAG-VE-PTP Konstrukte umfassen die zytoplasmatische Domäne, die Transmembrandomäne und einen Teil der extrazellulären Sequenz. Strukturell

zeigt dieser Bereich der Ektodomäne von VE-PTP Homologien zu Fibronectin III Domänen [95]. Diese Konstrukte tragen N-terminal ein Start-Codon, gefolgt von einem Signalpeptid und einem FLAG Epitop. Analog zu den GST-VE-PTP Fusionsproteinen wurden auch mit diesen Expressions-Konstrukten Mutationen eingeführt, die zu einer katalytischen Inaktivierung führen [95].



**Abbildung 4.2.: Koimmunpräzipitation von VE-Cadherin mit FLAG-VE-PTP in heterologen Expressionssystemen**

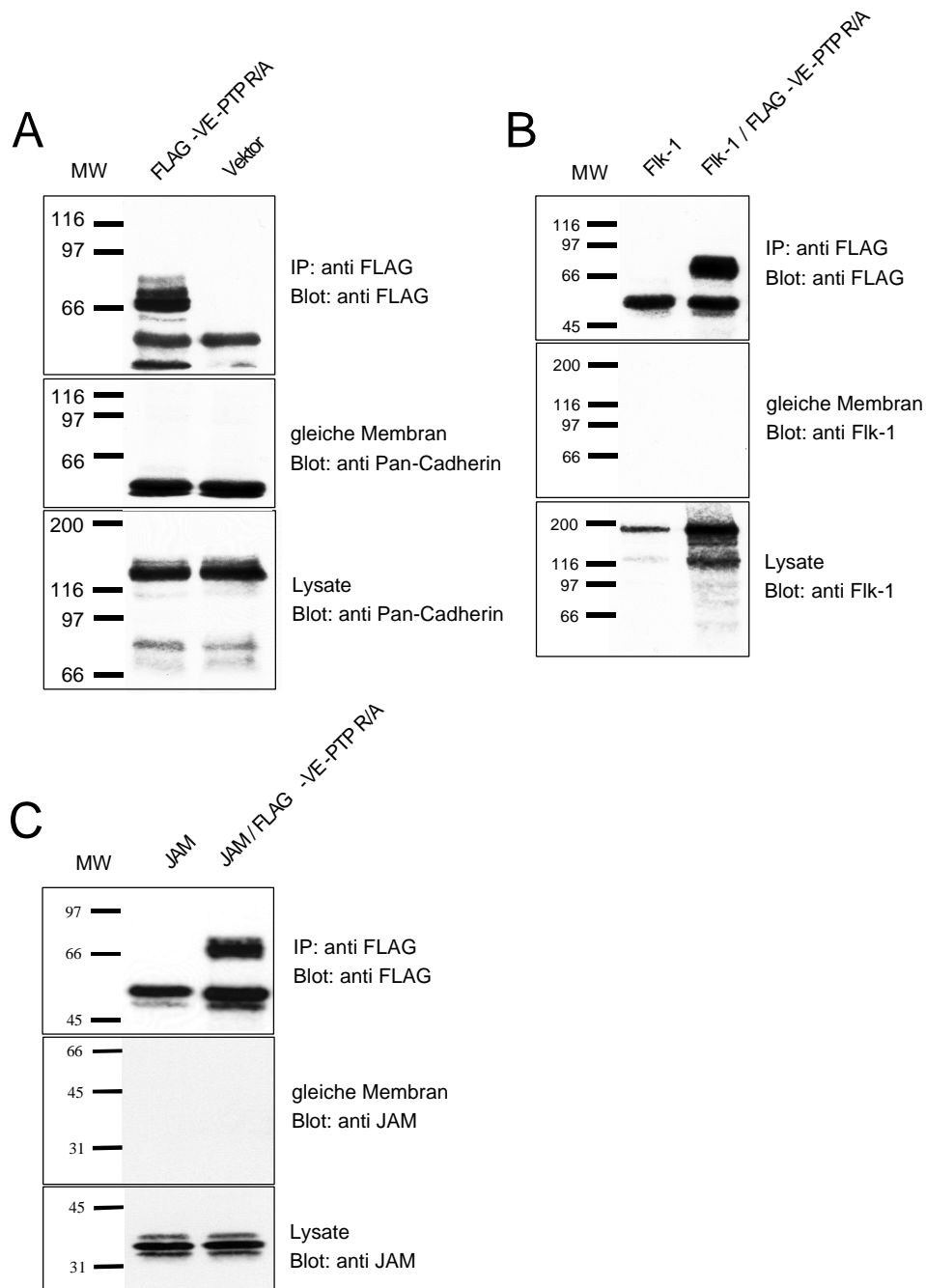
COS-7 Zellen wurden mit FLAG-VE-PTP / VE-Cadherin, FLAG-VE-PTP C/S / VE-Cadherin, FLAG-VE-PTP R/A / VE-Cadherin und VE-PTP oder VE-Cadherin transient transfiziert. Die Triton X-100 Lysate wurden anschließend mit einem Antikörper gegen das FLAG Epitop inkubiert. Präzipitierte Proteine wurden nach SDS-PAGE und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran im Immunblot mit Antikörpern gegen VE-Cadherin und anschließend mit einem Antikörper gegen das FLAG Epitop analysiert. (MW: Molekulargewichtsmarker in Kilodalton)

Transient transfizierte COS-7 Zellen mit FLAG-VE-PTP / VE-Cadherin, FLAG-VE-PTP C/S / VE-Cadherin, FLAG-VE-PTP R/A / VE-Cadherin oder VE-PTP R/A, bzw. VE-Cadherin, wurden mit Triton X-100-haltigem Lysepuffer lysiert. An diesen Lysaten wurde eine Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen das FLAG Epitop durchgeführt. Die präzipitierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Mit Antikörpern gegen VE-Cadherin und das FLAG Epitop wurde anschließend ein Immunblot durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, daß mit allen drei VE-PTP Konstrukten eine Präzipitation von VE-Cadherin möglich ist (Abb. 4.2.). Die katalytisch inaktiven FLAG-VE-PTP Konstrukte zeigen in der Abbildung

gegenüber der Wildtyp-Form eine leicht verbesserte Bindung zu VE-Cadherin. Dieser Effekt variierte jedoch in verschiedenen unabhängigen Experimenten, so daß insgesamt nicht von einem Unterschied im Bindungsverhalten der verschiedenen Konstrukte in diesem System ausgegangen werden kann. In der Negativkontrolle wurde gezeigt, daß der anti FLAG Antikörper nicht mit VE-Cadherin kreuzreagieren kann (Abb. 4.2., Spur 5). Die Immunpräzipitation von VE-Cadherin ist demnach nur in Gegenwart von VE-PTP möglich und somit als Koimmunpräzipitation anzusehen. Mit diesen Experimenten konnte eine Komplexierung zwischen VE-PTP und VE-Cadherin biochemisch nachgewiesen werden.

#### **4.2.2. VE-PTP interagiert nicht mit N-Cadherin, JAM-1 oder Flk-1**

In einer weiteren Untersuchung sollte überprüft werden, ob die Interaktion von VE-PTP selektiv mit VE-Cadherin verläuft. Die klassischen Cadherine sind in ihrer Struktur hochkonserviert. Die Phosphatase RPTP $\mu$  kann mit verschiedenen Mitgliedern der Cadherin-Familie über den zytoplasmatischen Bereich eine Interaktion eingehen. Um Aufschlüsse über die Selektivität der Bindung von VE-PTP zu VE-Cadherin zu erhalten, wurde die Interaktion zwischen VE-PTP und endogen exprimierten Cadherinen in 293T Zellen untersucht. In Lysaten dieser Zelllinie konnte mit einem anti Pan-Cadherin Antikörper im Immunblot ein Signal von etwa 130 kDa detektiert werden. Dieses Signal wurde auch von einem Serum gegen N-Cadherin (#604, [124]) detektiert, so daß es sich bei diesem Cadherin wahrscheinlich um N-Cadherin handelt. 293T Zellen wurden transient mit FLAG-VE-PTP R/A oder leerem Vektor transfiziert. Nach Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop wurden die Präzipitate über SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunblot mit einem anti Pan-Cadherin Antikörper und einem anti FLAG Antikörper analysiert. Obwohl in den Zellysaten die Expression des Cadherins und auch FLAG-VE-PTP detektiert wurde, konnte keine Interaktion mit dem endogenen Cadherin und VE-PTP über Koimmunpräzipitation gezeigt werden (Abb. 5 A).



#### Abbildung 4.5.: Interaktion verschiedener Transmembranproteine und VE-PTP in heterologen Expressionssystemen

293T Zellen wurden mit FLAG-VE-PTP R/A oder leerem Vektor transient transfiziert (A). Parallel wurden COS-7 Zellen mit FLK-1 oder FLK-1 / VE-PTP R/A (B) und JAM-1 oder JAM-1 / VE-PTP R/A (C) transient transfiziert. Die Triton X-100 Lysate dieser Zellen wurden mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop inkubiert. Die Präzipitate wurden in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und im Immunblot mit Antikörpern gegen Pan-Cadherin (A), Flk-1 (B) oder JAM-1 (C) analysiert. (MW, Molekulargewichtsmarker in Kilodalton)

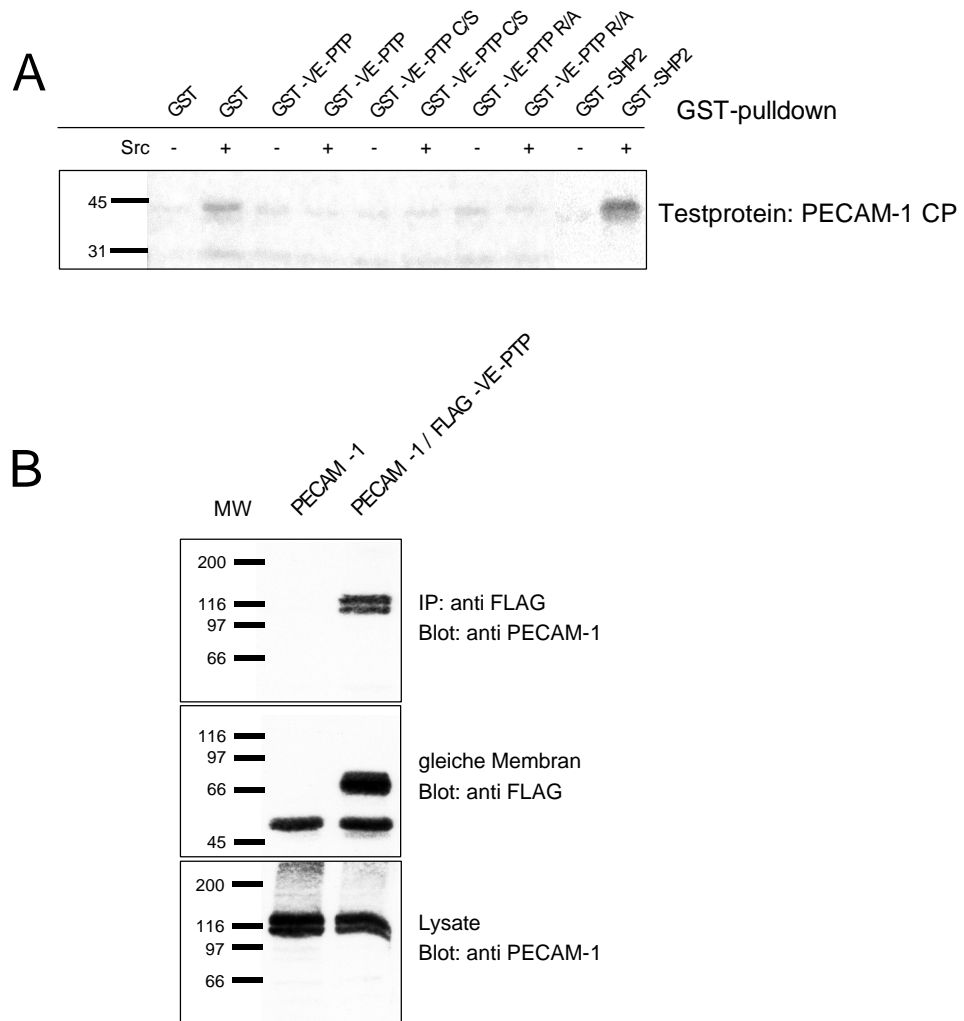
Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß VE-PTP selektiv mit VE-Cadherin und nicht mit N-Cadherin interagiert. In weiteren Koimmunpräzipitations-Experimenten wurden Interaktionen zwischen VE-PTP und dem Tight Junction Protein JAM-1 und dem Rezeptor für VEGF, VEGF-R2 (Flk-1) untersucht. Diese Versuche wurden in heterologen Expressionssystemen durchgeführt. Bislang

wurde beschrieben, daß VE-PTP nicht mit VEGF-R2 interagieren kann [95]. Dieser Versuch wurde in COS-7 Zellen, die transient mit VEGF-R2 (Flk-1) oder VEGF-R2 (Flk-1) / FLAG-VE-PTP R/A transfiziert wurden wiederholt. Nach Immunpräzipitation gegen das FLAG Epitop und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der Präzipitate wurden Immunblots mit Antikörpern gegen VEGF-R2 (Flk-1) und das FLAG Epitop durchgeführt.

In diesem Experiment konnte keine Interaktion zwischen VE-PTP und VEGF-R2 (Flk-1) gezeigt werden (Abb. 4.5. B). Analog wurde eine Interaktion zwischen VE-PTP und JAM-1 untersucht und auch für diese beiden Proteinen wurde keine Interaktion gefunden (Abb. 4.5. C). Damit konnte gezeigt werden, daß VE-PTP selektiv mit VE-Cadherin interagiert.

#### 4.2.3. VE-PTP interagiert mit PECAM-1

Neben VE-Cadherin hat auch PECAM-1 eine Funktion bei der Bildung von Zell-Zell-Kontakten [24]. Zudem ist dieses Protein an Transmigrationsvorgängen und an der Integrinaktivierung von Leukozyten beteiligt [130] [33]. PECAM-1 ist auch Substrat verschiedener Kinasen der Src und Csk Familie. Diese Phosphorylierung führt zu einer Interaktion mit verschiedenen Phosphatasen. Die Phosphorylierung von PECAM-1 führt auch zu der Aktivierung von ERK, was einen weiteren Hinweis auf die Funktion als Signalprotein gibt [30]. Eine Interaktion zwischen VE-PTP und PECAM-1 wurde anhand der Präzipitation von PECAM-1 mit GST-VE-PTP Fusionsproteinen untersucht. Als GST-Fusionsproteine wurden wieder die beschriebenen VE-PTP Konstrukte eingesetzt. Die zytoplasmatische Domäne von PECAM-1 wurde über eine *in vitro* Transkriptions / Translationsreaktion in Retikulozytenlysaten exprimiert. Für die Bindung von SHP-2 an PECAM-1 ist eine Tyrosin Phosphorylierung von PECAM-1 essentiell [26]. Daher wurde nach der *in vitro* Translation von PECAM-1 die Hälfte des Retikulozytenlysats mit der p60-c-Src Kinase inkubiert. Präzipitierte Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Fluorographie analysiert. In diesen Experimenten konnte keine Bindung zwischen GST-VE-PTP und der zytoplasmatischen Domäne von PECAM-1 gezeigt werden. Als Positivkontrolle wurde eine Präzipitation von PECAM-1 mit dem Fusionsprotein GST-SHP-2 durchgeführt, in dem eine phosphorylierungsabhängige Bindung nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.4. A).



**Abbildung 4.4.: VE-PTP interagiert mit der extrazellulären Domäne von PECAM-1**

**A:** Über Präzipitations-Experimente mit GST-VE-PTP Fusionsproteinen wurde die Interaktion von VE-PTP und PECAM-1 überprüft. In Retikulozytenlysaten wurde über *in vitro* Transkription / Translation die zytoplasmatische Domäne von PECAM-1 (PECAM-1 CP) exprimiert und anschließend die Hälfte des Lysats mit p60-c-Src inkubiert. Diese Lysate wurden mit den Fusionsproteinen GST-VE-PTP, GST-SHP2 und GST inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden nach SDS-PAGE über Fluorographie analysiert. Die Positionen der Molekulargewichtsmarker sind auf der linken Seite in Kilodalton angegeben. **B:** Koimmunpräzipitation von PECAM-1 und VE-PTP. COS-7 Zellen wurden transient mit PECAM-1 oder PECAM-1 / FLAG-VE-PTP R/A transfiziert. An den Triton X-100 Lysaten dieser Zellen wurden anschließend Immunpräzipitationen gegen VE-PTP durchgeführt und die präzipitierten Proteine nach SDS-PAGE und Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran im Immunblot mit Antikörpern gegen PECAM-1 oder FLAG-VE-PTP analysiert. (MW: Molekulargewichtsmarker in Kilodalton)

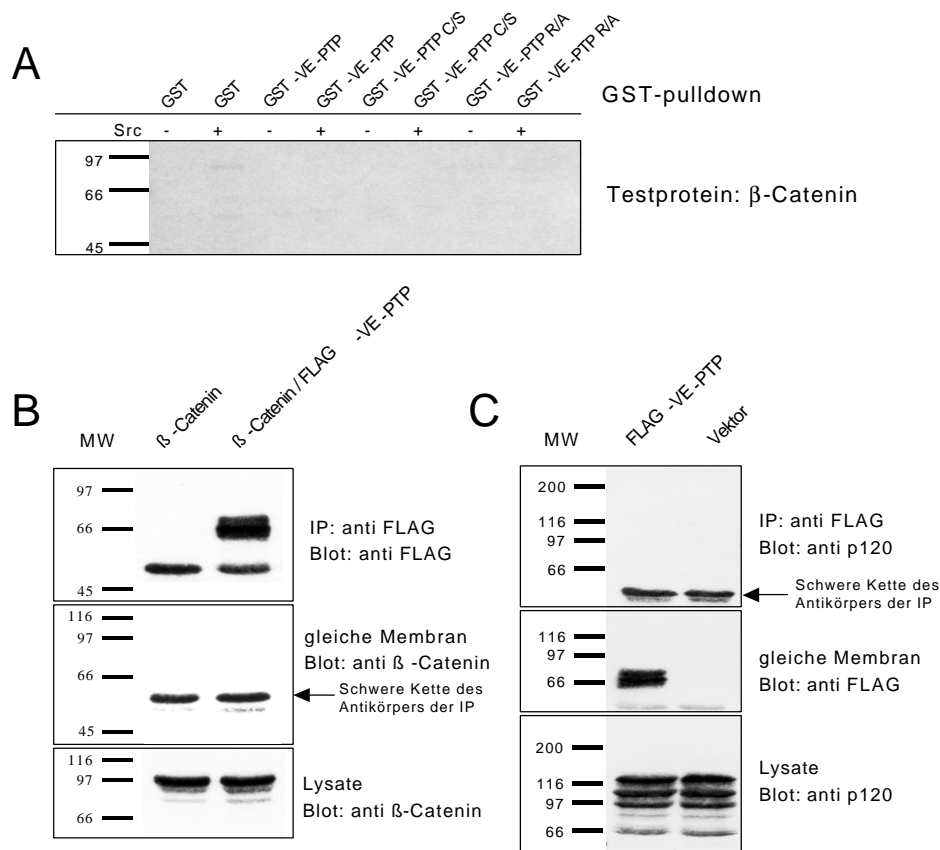
Anschließend wurde über Koimmunpräzipitation eine Interaktion von PECAM-1 und VE-PTP untersucht. COS-7 Zellen wurden mit PECAM-1 und FLAG-VE-PTP R/A oder PECAM-1 transient transfiziert und nach Immunpräzipitation gegen FLAG-VE-PTP im Immunblot mit Antikörpern gegen PECAM-1 und FLAG hinsichtlich einer Assoziation analysiert. Die verwendeten VE-PTP Expressionskonstrukte enthalten gegenüber den GST-VE-PTP Proteinen noch

die Transmembran-Domäne und dem membranproximalen Bereich der Ektodomäne. Zusätzlich umfaßt das Expressionskonstrukt von PECAM-1 das gesamte Protein. Entgegen der Ergebnisse aus den Präzipitationen mit GST-VE-PTP Fusionsproteinen, konnte in diesem Versuch eine Bindung zwischen PECAM-1 und VE-PTP gezeigt werden (Abb. 4.4. B). Daher ist es wahrscheinlich, daß diese Interaktion ausschließlich über den extrazellulären Teil von PECAM-1 und VE-PTP vermittelt wird.

### **4.3. VE-PTP interagiert mit VE-Cadherin, aber nicht mit anderen Komponenten des Cadherin-Catenin Komplexes**

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen VE-Cadherin und VE-PTP näher charakterisiert. Assoziationen von PTPs und RPTPs mit dem Cadherin-Catenin Komplex wurden bereits beschrieben. Die Phosphatasen RPTP LAR, RPTP $\kappa$ , RPTP $\beta/\xi$  und SHP-2 binden an  $\beta$ -Catenin [112] [114] [107] [100]. Nur RPTP $\mu$  (N-, E-Cadherin, Cadherin-4), und die Phosphatase PTP1B (N-Cadherin) binden über den zytoplasmatischen Teil der Cadherine an den Cadherin-Catenin Komplex [110] [131]. RPTP $\mu$  assoziiert jedoch auch mit dem Catenin p120<sup>ctn</sup> und dieses Protein auch *in vivo* [118]. Die Präzipitations-Experimente mit GST-VE-PTP Fusionsproteinen und VE-Cadherin *in vitro* deuten auf eine direkte Interaktion von VE-Cadherin und VE-PTP hin. In weiteren Versuchen sollte gezeigt werden, ob VE-PTP tatsächlich über VE-Cadherin oder auch mit weiteren Proteinen des Cadherin-Catenin-Komplexes interagieren kann. In diesen Versuchen wurden Präzipitationen mit GST-VE-PTP Fusionsproteinen und  $\beta$ -Catenin durchgeführt, in denen  $\beta$ -Catenin als potentieller Bindungspartner in Retikulozytenlysaten exprimiert wurde. Die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin könnte Grundvoraussetzung für eine Bindung darstellen. Daher wurde die Hälfte der *in vitro* translatierten Proteine vor der Inkubation mit GST-VE-PTP Fusionsproteinen mit der Kinase p60-c-Src inkubiert, um eine Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin zu erreichen. Die präzipitierten Proteine wurden anschließend mittels Fluorographie analysiert. Unabhängig von der Inkubation mit der p60-c-Src Kinase konnte in diesen Experimenten keine Bindung zwischen VE-PTP und  $\beta$ -Catenin gezeigt werden (Abb. 4.3. A). In einem weiteren Versuchsansatz wurden  $\beta$ -Catenin und das Catenin p120<sup>ctn</sup> in heterologen Expressionssystemen hinsichtlich einer Interaktion mit VE-PTP überprüft.





#### Abbildung 4.3.: Die Catenine p120<sup>ctn</sup> und $\beta$ -Catenin binden nicht an VE-PTP

Über *in vitro* Transkription / Translation in Retikulozytenlysaten wurde  $\beta$ -Catenin exprimiert und ein Teil des Lysats mit p60-c-Src inkubiert. Die Lysate wurden mit GST-VE-PTP Fusionsproteinen inkubiert und die Präzipitate über Fluorographie nach SDS-PAGE analysiert (A). Als Positivkontrolle wurde eine Präzipitation von VE-Cadherin durchgeführt (siehe Abb. 4.1. A). In Koimmunpräzipitationen an Lysaten von COS-7 Zellen, die mit  $\beta$ -Catenin,  $\beta$ -Catenin / FLAG-VE-PTP R/A (B) und mit FLAG-VE-PTP oder dem leeren Vektor (C) transient transfiziert waren wurden Immunpräzipitationen gegen VE-PTP durchgeführt. Nach Auftrennung der Präzipitate mittels SDS-PAGE und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurden die Präzipitate im Immunblot mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Catenin (B) oder p120<sup>ctn</sup> (C) analysiert. (MW: Molekulargewichtsmarker in Kilodalton)

Nach transienter Transfektion von COS-7 Zellen mit  $\beta$ -Catenin / FLAG-VE-PTP R/A oder  $\beta$ -Catenin, wurde gegen das FLAG Epitop eine Immunpräzipitation durchgeführt. Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Anschließend wurde ein Immunblot mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Catenin und FLAG-VE-PTP durchgeführt. Die Interaktion zwischen VE-PTP und p120<sup>ctn</sup> wurde ebenfalls in COS-7 Zellen untersucht. COS-7 Zellen exprimieren endogenes p120<sup>ctn</sup>. Nach transienter Transfektion mit FLAG-VE-PTP wurde eine wie oben beschriebene Immunpräzipitation mit einem Immunblot gegen p120<sup>ctn</sup> und das FLAG-Epitop durchgeführt. Obwohl sowohl  $\beta$ -Catenin, als auch p120<sup>ctn</sup> in den Zellysaten mittels eines Immunblottes nachweisbar waren, konnte keine Interaktion zwischen VE-PTP und  $\beta$ -Catenin, bzw. p120<sup>ctn</sup> über Koimmunpräzipitationen

nachgewiesen werden (Abb. 4.3. B,C). Zusammenfassend kann aus diesen Experimenten geschlossen werden, daß die Assoziation von VE-PTP an den Cadherin-Catenin Komplex nicht über die beiden Catenine p120<sup>ctn</sup> und  $\beta$ -Catenin, sondern über VE-Cadherin vermittelt wird.

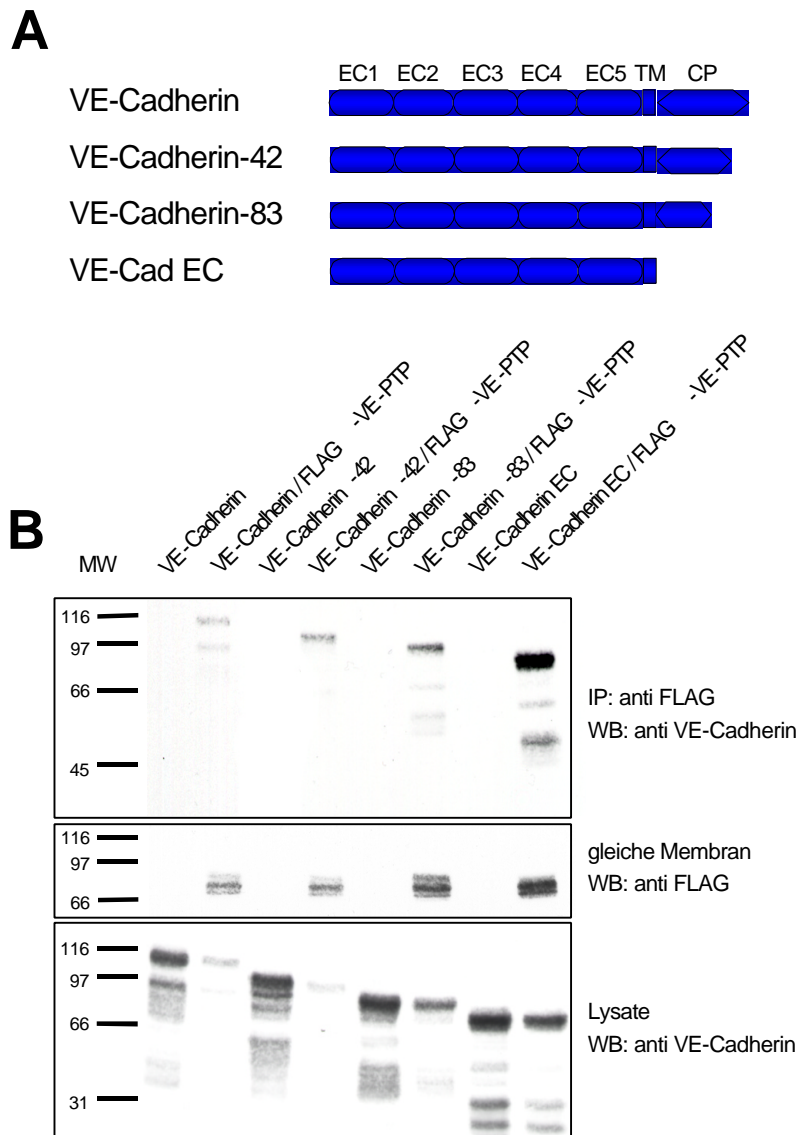
In den beschriebenen Untersuchungen konnte die Rezeptor Tyrosin Phosphatase VE-PTP als ein Interaktionspartner für VE-Cadherin identifiziert werden. Diese Interaktion wurde mittels GST-Fusionsproteinen, die den zytoplasmatischen Bereich von VE-PTP umfassen *in vitro* und *in vivo* gezeigt. Allerdings waren diese Präzipitationen nicht sehr effizient und nur mit katalytisch inaktiven Mutanten von VE-PTP zu zeigen. In einem heterologen Expressions-system wurde VE-Cadherin jedoch durch VE-PTP effizient kopräzipitiert. Dieses VE-PTP Konstrukt umfaßte neben der zytoplasmatischen Domäne noch zusätzlich die Transmembran-Domäne und einen Teil der extrazellulären Sequenz. Keine Bindung konnte zwischen den Cateninen  $\beta$ -Catenin oder p120<sup>ctn</sup> und VE-PTP gezeigt werden. Die Interaktion zwischen VE-PTP und PECAM-1 scheint ausschließlich über den extrazellulären Bereich von VE-PTP zu verlaufen, da keine Interaktion im GST-Pulldown mit den zytoplasmatischen Domänen der beiden Proteine nachgewiesen wurde. Keine Bindungen wurden zwischen VEGF-R2 (Flk-1), JAM-1 oder endogenen Cadherinen detektiert.

#### **4.4. Charakterisierung der Domänen von VE-Cadherin und VE-PTP, die für eine Interaktion von Bedeutung sind**

In weiteren Untersuchungen sollten die Protein-Domänen von VE-PTP und VE-Cadherin charakterisiert werden, die für eine Interaktion von Bedeutung sind. Bislang sind zwei Interaktionen von Cadherinen mit Phosphatasen dokumentiert. Die Phosphatase PTP1B ist eine zytoplasmatische Phosphatase und bindet an die zytoplasmatische Domäne von N-Cadherin. Eine zweite Phosphatase - Cadherin Interaktion ist für RPTP $\mu$  und den klassischen Cadherinen N- und E-Cadherin, sowie Cadherin-4 beschrieben worden. RPTP $\mu$  gehört zu den RPTPs und interagiert mit E-Cadherin über die zytoplasmatische Domäne. Diese Interaktion verläuft über die C-terminalen 80 Aminosäuren von E-Cadherin, die auch die Bindung von  $\beta$ -Catenin /  $\gamma$ -Catenin an E-Cadherin vermitteln.

#### 4.4.1. Die zytoplasmatische Domäne von VE-Cadherin ist für eine Interaktion mit VE-PTP nicht notwendig

Mit GST-VE-PTP Fusionsproteinen konnte VE-Cadherin präzipitiert werden. Diese Daten implizieren eine direkte Interaktion der zytoplasmatischen Domäne von VE-PTP mit VE-Cadherin.



**Abbildung 4.6.: Die VE-Cadherin - VE-PTP Interaktion wird unabhängig von dem zytoplasmatischen Teil von VE-Cadherin vermittelt**

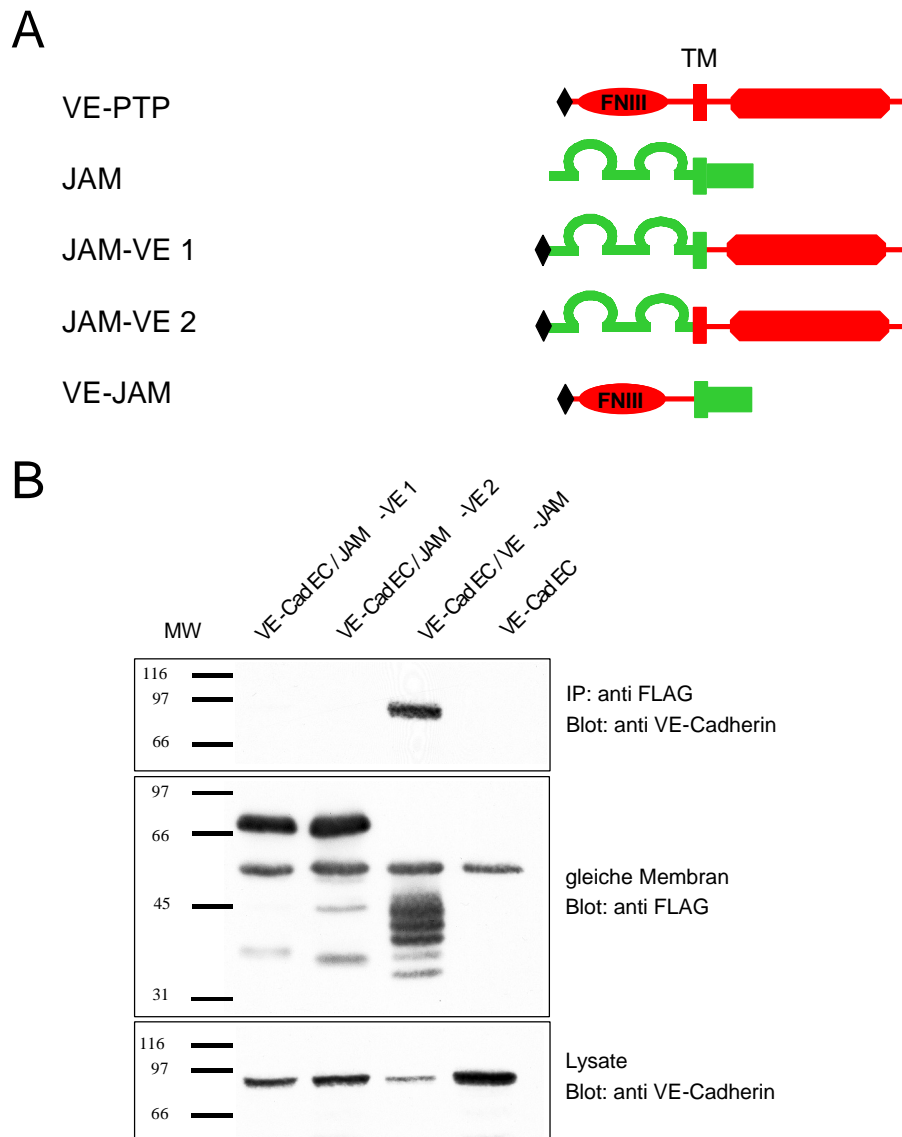
**A:** Schematische Darstellung der Deletionskonstrukte von VE-Cadherin. Diesen Konstrukten fehlen C-terminal entweder die letzten 42 Aminosäuren (VE-Cadherin-42), die letzten 83 Aminosäuren (VE-Cadherin-83) oder der gesamte zytoplasmatische Teil. **B:** COS-7 Zellen wurden mit jeweils FLAG-VE-PTP R/A und einem der VE-Cadherin Deletionskonstrukte oder jeweils mit einem der VE-Cadherin Deletionskonstrukte transient transfiziert. An Triton X-100 Lysaten dieser Zellen wurden Immunpräzipitationen gegen das FLAG Epitop durchgeführt. Die Präzipitate wurden nach SDS-PAGE und Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran im Immunblot mit einem Antikörper gegen VE-Cadherin und das FLAG Epitop analysiert. (MW: Molekulargewichtsmarker in Kilodalton (kDa), EC1-5: Cadherin Domäne, TM: Transmembrandomäne, CP: Zytoplasmatische-Domäne)

Deshalb sollte der Bereich der zytoplasmatischen Domäne von VE-Cadherin charakterisiert werden, der diese Interaktion vermittelt. Um diese Domäne von VE-Cadherin in ihren Bindungseigenschaften gegenüber VE-PTP näher charakterisieren zu können, wurden verschiedene VE-Cadherin Deletionsmutanten kloniert (Abb. 4.6. A). Bei diesen Mutanten fehlen entweder die C-terminalen 42 (VE-Cadherin-42) oder 83 Aminosäuren (VE-Cadherin-83) oder der gesamte zytoplasmatische Teil (VE-Cad EC). COS-7 Zellen wurden mit FLAG-VE-PTP R/A und jeweils einer dieser VE-Cadherin Deletionsmutanten kotransfiziert. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation gegen das FLAG-Epitop von VE-PTP durchgeführt und die Präzipitate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Mit VE-PTP kopräzipitierte VE-Cadherin Konstrukte wurden im Immunblot mit Antikörpern gegen VE-Cadherin nachgewiesen. Erstaunlicherweise konnte mit allen VE-Cadherin Deletionskonstrukten eine Bindung mit VE-PTP detektiert werden. In der Negativkontrolle zeigte der anti FLAG Antikörper keine Kreuzreaktionen mit den VE-Cadherin Konstrukten (Abb. 4.6. B). Diese Daten zeigen, daß die zytoplasmatische Domäne von VE-Cadherin nicht für die Interaktion mit VE-PTP benötigt wird.

#### **4.4.2. Die Membranproximale Fibronektin III Domäne von VE-PTP interagiert mit VE-Cadherin**

In dem vorhergehenden Experiment wurde gezeigt, daß VE-Cadherin über die Ektodomäne an VE-PTP binden kann. In einem weiteren Experiment sollte die Domäne von VE-PTP lokalisiert werden, die für diese Bindung notwendig ist. In dem FLAG-VE-PTP Konstrukt kommen für die Bindung an die Ektodomäne von VE-Cadherin drei Domänen in Frage: die Ektodomäne, die Transmembrandomäne oder die zytoplasmatische Domäne. Um zu klären, welche Domäne die entscheidende Rolle bei der Assoziation übernimmt, wurden chimäre Proteine, bestehend aus VE-PTP und JAM-1 kloniert. Diese Konstrukte enthalten entweder den extrazellulären Teil mit der Transmembrandomäne von JAM-1 und den zytoplasmatischen Teil von VE-PTP (JAM-VE 1), den extrazellulären Teil von JAM-1 und die Transmembrandomäne mit dem zytoplasmatischen Teil von VE-PTP (JAM-VE 2), oder die membranproximale Fibronektin III Domäne

von VE-PTP mit der Transmembrandomäne und dem zytoplasmatischen Teil von JAM-1 (VE-JAM) (s. Abb. 4.7. A).



**Abbildung 4.7.: VE-PTP bindet über die membranproximale Fibronectin III Domäne an die extrazelluläre Domäne von VE-Cadherin**

A: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von FLAG-VE-PTP (rot), JAM-1 (grün), und drei chimären Proteinen, die ein FLAG-Epitop tragen (schwarze Raute) und sich aus verschiedenen Domänen von VE-PTP und JAM-1 zusammensetzen. JAM-VE 1 besteht aus der zytoplasmatischen Domäne von VE-PTP und der Transmembrandomäne mit der Ektodomäne von JAM-1. JAM-VE 2 wurde durch Fusion des zytoplasmatischen Bereichs und der Transmembrandomäne von VE-PTP und der Ektodomäne von JAM-1 kloniert. VE-JAM besteht aus der membranproximalen extrazellulären Fibronectin III Domäne von VE-PTP und der Transmembrandomäne mit dem zytoplasmatischen Bereich von JAM-1. B: COS-7 Zellen wurden mit diesen Konstrukten und jeweils VE-Cadherin Deletionsklon VE-Cad EC transfiziert und die Präzipitate nach Immunpräzipitation und Gelelektrophorese im Immunblot mit Antikörpern gegen das FLAG Epitop und auf der gleichen Membran gegen VE-Cadherin analysiert. (Abkürzungen: TM, Transmembrandomäne; FNIII, Fibronectin III Domäne; MW, Molekulargewichtsmarker in Kilodalton)

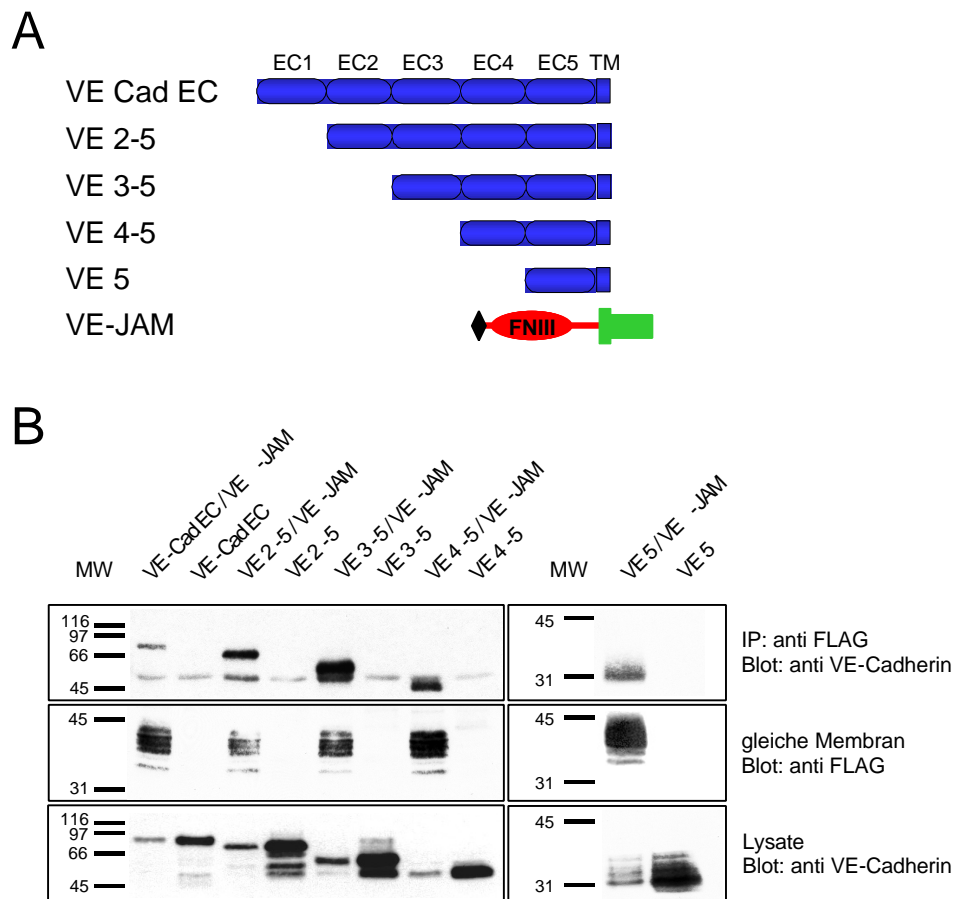
N-Terminal beginnen diese Konstrukte mit dem FLAG Epitop. Diese VE-PTP-JAM Chimären wurden jeweils mit dem VE-Cadherin Deletionsklon VE-Cad EC (siehe. Abb. 4.6. A) in COS-7 Zellen transfiziert. Die transfizierten COS-7 Zellen

wurden lysiert und die Lysate mit Antikörpern gegen FLAG inkubiert. Anschließend wurden die Präzipitate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Im Immunblot mit Antikörpern gegen VE-Cadherin wurden Interaktionen der Proteine analysiert. In dem Immunblot konnte gezeigt werden, daß nur VE-JAM mit VE-Cad EC interagieren kann. Die Interaktion wird damit von der membranproximalen Fibronectin III Domäne von VE-PTP und der Ektodomäne von VE-Cadherin vermittelt (s. Abb. 4.7. B). Diese Daten zeigen, daß VE-PTP und VE-Cadherin über ihre Ektodomänen miteinander interagieren können.

#### **4.4.3. Die Assoziation von VE-PTP und VE-Cadherin wird über die membranproximalen Proteindomänen beider Proteine vermittelt.**

Abschließend sollte geklärt werden, welcher Bereich der extrazellulären Domäne von VE-Cadherin an VE-PTP bindet. Für diesen Zweck wurden verschiedene VE-Cadherin Deletionskonstrukte kloniert. Diese Konstrukte tragen intrazellulär noch fünf membranproximale Aminosäuren. Extrazellulär wurden Deletionen der Cadherin Domänen 1 (VE 2-5), 1-2 (VE 3-5), 1-3 (VE 4-5) oder 1-4 (VE 5) vorgenommen (Abb. 4.8. A). Die VE-Cadherin Deletionsklone und jeweils die VE-PTP - JAM Chimäre VE-JAM wurden in COS-7 Zellen transfiziert. Anschließend wurden an Triton X-100-Lysaten Immunpräzipitationen gegen VE-JAM durchgeführt. Die Präzipitate wurden nach SDS-PAGE und Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran im Immunblot analysiert. Mit Antikörpern gegen VE-Cadherin wurde im Immunblot gezeigt, daß VE-JAM mit jedem der VE-Cadherin Deletionsklone interagieren kann (Abb. 4.8. B). Es wurde jedoch keine Kreuzreaktion mit dem anti FLAG Antikörper und den VE-Cadherin Konstrukten festgestellt.

Damit konnte gezeigt werden, daß die Interaktion von VE-PTP zu VE-Cadherin über die membranproximalen, extrazellulären Domänen beider Proteine vermittelt wird.



**Abbildung 4.8.: Die membranproximale, extrazelluläre Fibronectin III Domäne von VE-PTP vermittelt die Assoziation zu der fünften Cadherin Domäne von VE-Cadherin**

**A:** Schematische Darstellung der VE-Cadherin Deletionsklone, denen jeweils der zytoplasmatische Teil bis auf fünf Aminosäuren und die Cadherin-Domänen 1 (VE-2-5), 2 (VE 3-5), 3 (VE 4-5) oder 4 (VE 5) fehlen. VE-JAM wurde zuvor in Abb. 7 A beschrieben. **B:** COS-7 Zellen wurden mit den VE-Cadherin Deletionsmutanten VE-Cad EC, VE 2-5, VE 3-5, VE 4-5 und VE 5 entweder zusammen mit VE-JAM oder alleine transfiziert. Nach Immunpräzipitation gegen VE-JAM wurden die Präzipitate mit Antikörpern gegen VE-Cadherin und VE-JAM im Immunblot analysiert. (MW: Molekulargewichtsmarker in Kilodalton (kDa), EC1-5: Cadherin Domäne, TM: Transmembrandomäne, FNIII: Fibronectin III Domäne, )

#### 4.5. Klonierung der cDNA von VE-PTP

In der Erstbeschreibung von VE-PTP wurden die C-terminalen 1743 Basenpaare kloniert und das abgeleitete Protein als ein Homolog der humanen Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatase HPTP $\beta$  charakterisiert [95].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die cDNA von murinem VE-PTP von der Firma OriGene aus einer murinen Leber-cDNA Bibliothek kloniert. Klon MG 37 enthält die gesamte kodierende Region von VE-PTP und wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Urban Deutsch am Max Planck Institut für physiologische und klinische Forschung in Bad Nauheim und Dr. David T. Shima am ICRF (Imperial Cancer Research Fund) in London sequenziert. Die Sequenz der VE-PTP cDNA umfaßt 6199 bp und enthält einen 5'-Nichtkodierungsbereich von 130 bp, gefolgt von

einem ORF (open reading frame) von 5994 bp, der mit dem Start-Codon ATG beginnt und mit dem Stop-Codon TAA endet. Die Sequenz endet mit einem 3'-Nichtkodierungsbereich von 72 bp und einer poly (A) Sequenz (siehe Anlage 1, 7.1.). Der ORF kodiert ein Protein mit einer Größe von 1998 Aminosäuren und einem mittleren Molekulargewicht von 220 kDa (siehe Anlage 2, 7.2.). Mit den Programmen SMART (EMBL) und SignalP V1.1 (CBS) wurde N-terminal ein potentiell Signalpeptid von 22 Aminosäuren erkannt (siehe Tabelle I). Signalpeptide zeichnen sich durch basische Aminosäuren am N-Terminus und hydrophoben Aminosäuren im Inneren der Sequenz aus, denen eine Spaltungsstelle für die Signalpeptidase folgt. Die putative Spaltungsstelle der Signalpeptidase befindet sich in der VE-PTP Sequenz zwischen den Aminosäuren Ala22/Glu23.

Domäne	Position (Aminosäure)
Signalpeptid	1-22
Fibronectin Typ III 1	22-103
Fibronectin Typ III 2	111-193
Fibronectin Typ III 3	204-281
Fibronectin Typ III 4	290-366
Fibronectin Typ III 5	378-459
Fibronectin Typ III 6	468-546
Fibronectin Typ III 7	555-632
Fibronectin Typ III 8	644-724
Fibronectin Typ III 9	732-811
Fibronectin Typ III 10	820-899
Fibronectin Typ III 11	908-987
Fibronectin Typ III 12	996-1075
Fibronectin Typ III 13	1086-1166
Fibronectin Typ III 14	1174-1253
Fibronectin Typ III 15	1262-1340
Fibronectin Typ III 16	1356-1435
Fibronectin Typ III 17	1449-1591
Transmembran Domäne	1620-1642
Protein-Tyrosinphosphatase Domäne	1703-1966

**Tabelle I:** Homologien der Primärstruktur von VE-PTP zu bekannten Proteindomänen

Es wurden außerdem 17 Fibronectin III Domänen, eine Transmembran-Domäne und eine Protein-Tyrosinphosphatase Domäne erkannt. Die Domänen sind mit den entsprechenden Aminosäurepositionen der Sequenz in Tabelle I angegeben. Sequenzvergleiche auf Nukleotidebene mit dem Programm BLAST (NCBI) bestätigten die Homologie zu HPTP $\beta$  über die gesamte Sequenz (83% Identität). Es wurden keine weiteren Proteine mit Homologien über den



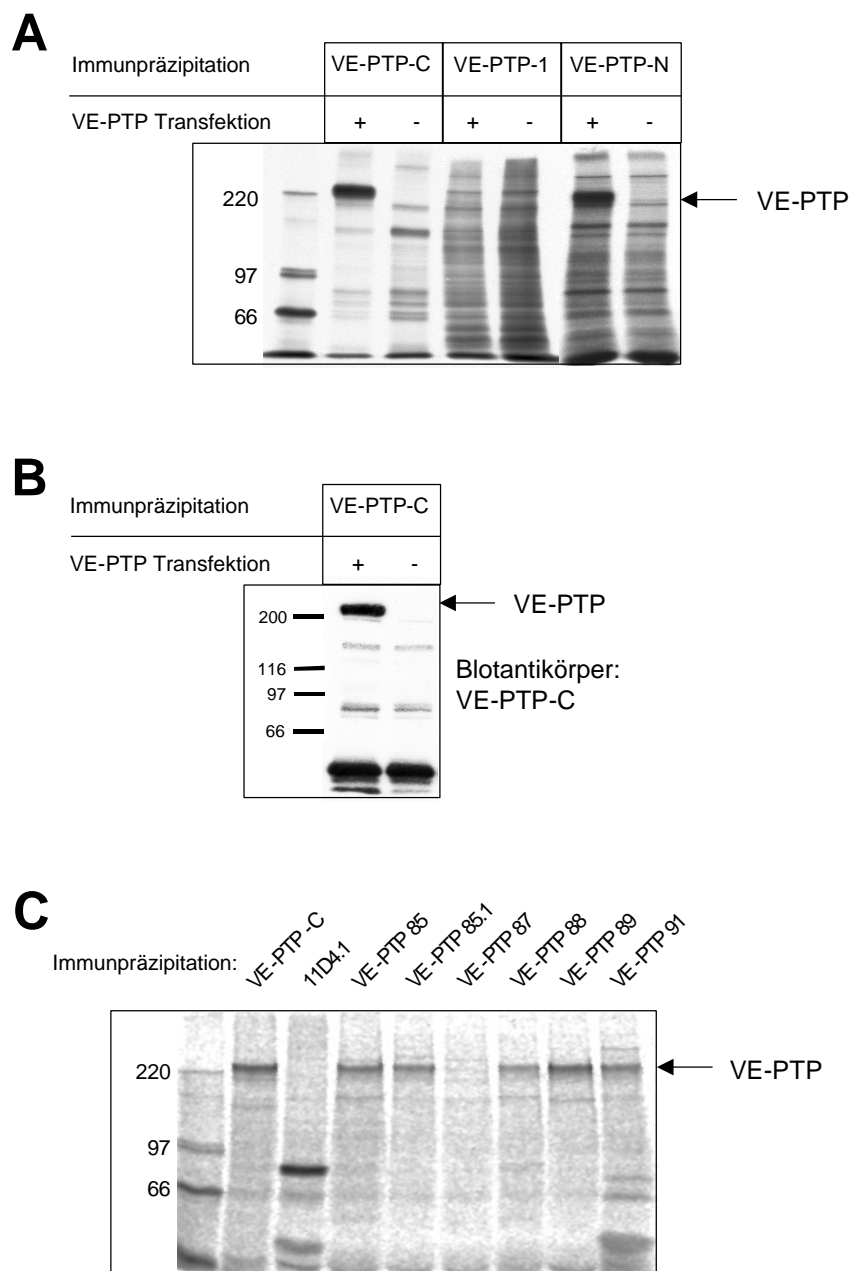
gesamten Sequenzbereich gefunden. Der zytoplasmatische Bereich von VE-PTP zeigt Homologien zu HPTP $\beta$  (94% Identität), Dep-1 und Byp-1 (beide 54% Identität). Beide Proteine gehören wie HPTP $\beta$  in die Subklasse III der Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatasen. Über das Programm Prosite (ExpPASy, Expert Protein Analysis System, Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)) konnten zudem verschiedene Sequenzen gefunden werden, an denen das Protein post-translational modifiziert werden kann. So befinden sich in der Sequenz der Ektodomäne 24 Erkennungsstellen für eine N-Glykosylierung.

#### **4.6. Herstellung und Charakterisierung polyklonaler und monoklonaler Antikörper gegen VE-PTP**

In dieser Arbeit sollte das native VE-PTP dargestellt und auf mögliche Interaktionen mit VE-Cadherin immunbiochemisch untersucht werden. Hierzu wurden VE-PTP spezifische anti-Peptid-Antikörper in Kaninchen hergestellt. Wie in "Material und Methoden" beschrieben, wurden für Antikörper gegen VE-PTP die Peptide VE-PTP-1 und VE-PTP-C gewählt. Die Aminosäuresequenz dieser Peptide entspricht den 13 C-terminalen Aminosäuren (VE-PTP-C) und einer weiteren, 14 Aminosäure umfassenden Sequenz, die 20 Aminosäuren vom C-Terminus beginnt (VE-PTP-1). Beide Peptide sind zu 84% (VE-PTP-C), bzw. 85% (VE-PTP-1) identisch mit dem humanen Homolog HPTP $\beta$ . Mit dem Programm BLAST (NCBI) konnten jedoch keine Homologien zu weiteren Proteinen gefunden werden.

Gegen den extrazellulären Bereich von VE-PTP wurde ein weiteres Antiserum in Kaninchen hergestellt (VE-PTP-N). Hierfür wurde ein hIgG<sub>1</sub>-Fc-Fusionsprotein, das den gesamten extrazellulären Bereich von VE-PTP umfaßt, als Immunogen eingesetzt. Dieses Fusionsprotein (pCMV6-XL4 VE-PTP 1-17 FNIII Fc) wurde durch transiente Expression in COS-7 Zellen exprimiert und aus dem Überstand der Zellen aufgereinigt. An Lysaten von metabolisch markierten und mit dem Wildtyp VE-PTP transient transfizierten COS-7 Zellen wurden anschließend Immunpräzipitationen mit den Seren durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden Lysate von COS-7 Zellen, die mit dem Vektor transfiziert wurden, eingesetzt. Die Präzipitate wurden anschließend in der Fluorographie analysiert. Sowohl das Serum VE-PTP-C, als auch VE-PTP-N erkennen spezifisch ein Protein bei etwa 220 kDa (Abb. 4.9. A). Diese Bande

entspricht dem mittleren theoretischen Molekulargewicht, das für VE-PTP errechnet wurde.



**Abbildung 4.9.: Charakterisierung polyklonaler und monoklonaler Antikörper gegen murines VE-PTP**

A: Immunpräzipitation mit den polyklonalen Antikörpern VE-PTP-C, VE-PTP-1 und VE-PTP-N in Lysaten metabolisch markierter COS-7 Zellen, die entweder mit VE-PTP (+) oder mit Vektor (-) transfiziert wurden. B: Nach Immunpräzipitation analog transfizierter COS-7 Zellen mit dem VE-PTP-C Antikörper wurde ein Immunblot mit VE-PTP-C durchgeführt. C: Mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern gegen VE-PTP wurden Immunpräzipitationen in metabolisch markierten, mit VE-PTP transfizierten COS-7 Zellen durchgeführt und mittels Fluorographie analysiert. VE-PTP-C wurde als Positivkontrolle und ein monoklonaler Antikörper gegen VE-Cadherin, 11D4.1 als Negativkontrolle eingesetzt. Die Positionen der Molekulargewichtsmarker sind auf der linken Seite in Kilodalton angegeben.

Das Serum VE-PTP-1 erkennt diese Bande nicht und ist demnach nicht funktionell gegenüber VE-PTP. Affinitätsgereinigter VE-PTP-C Antikörper wurde mit Lysaten von COS-7 Zellen, die mit VE-PTP transfiziert waren inkubiert. Die

Präzipitate wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. In einem Immunblot mit dem aufgereinigten Antikörper VE-PTP-C konnte ein spezifisches Signal bei etwa 220 kDa detektiert werden (Abb.4.9. B).

Damit wurde gezeigt, daß nach Transfektion der VE-PTP cDNA in COS-7 Zellen VE-PTP exprimiert und von zwei unabhängigen Antisera erkannt wird. Das Antiserum VE-PTP-C erwies sich dabei sowohl in der Immunpräzipitation, als auch im Immunblot als funktionell. In Versuchen über Immunfluoreszenz-Analysen die Lokalisation von VE-PTP in bEnd.3 Zellen zu zeigen, konnte jedoch mit dem Antikörper VE-PTP-C kein spezifisches Signal detektiert werden.

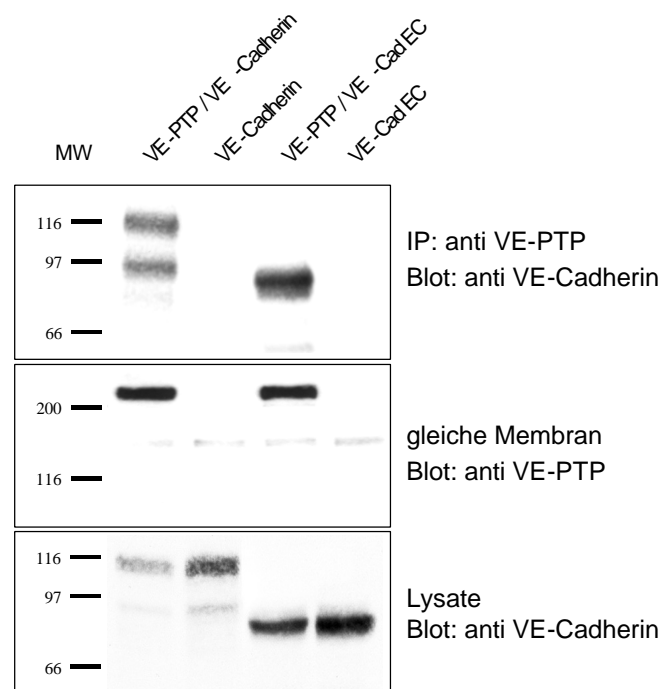
Zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen VE-PTP wurden Lewis-Ratten mit dem aufgereinigten Konstrukt VE-PTP 1-17 FNIII Fc immunisiert und die aus Milz und peripheren Lymphknoten isolierten B-Zellen mit SP2/0 Maus Myelomazellen nach der Methode von Vestweber und Kemler [132] fusioniert. Die Überstände der isolierten Hybridome wurden anschließend in einem Enzym-gebundenen-Immunadsorptions-Test (ELISA) mit dem Immunogen analysiert. Diese Arbeiten wurden von Dr. Ulrike Samulowitz und Ute Ipe durchgeführt.

Um die monoklonalen Antikörper auf ihre Funktionalität zu testen, wurden Immunpräzipitationen an Lysaten metabolisch markierter, mit VE-PTP transfizierter COS-7 Zellen durchgeführt. Die Präzipitate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Fluorographie analysiert. Als Negativkontrolle wurde mit dem monoklonalen Antikörper 11D4.1 gegen VE-Cadherin und als Positivkontrolle mit dem Antikörper VE-PTP-C eine Immunpräzipitation durchgeführt. Die monoklonalen Antikörper VE-PTP 85, 85.1, 88, 89 und 91 erkannten in der Immunpräzipitation spezifisch VE-PTP. Als nicht funktionell erwies sich der Antikörper VE-PTP 87 (Abb. 4.9. C).

#### **4.7. Das Wildtyp VE-PTP Protein assoziiert mit VE-Cadherin in COS-7 Zellen**

Nachdem zuvor mit verschiedenen VE-PTP Deletions-Konstrukten eine Assoziation mit VE-Cadherin beschrieben wurde, sollte nach der Klonierung der gesamten cDNA von VE-PTP eine Interaktion der Wildtyp Proteine

nachgewiesen werden. Diese Interaktion wurde in einem heterologen Expressionssystem untersucht. COS-7 Zellen wurden transient mit VE-PTP / VE-Cadherin oder VE-Cadherin und VE-PTP / VE-Cad EC oder VE-Cad EC transfiziert. Mit dem Antikörper VE-PTP-C wurde in Lysaten dieser Zellen eine Immunpräzipitation durchgeführt. Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und im Immunblot mit Antikörpern gegen VE-Cadherin und VE-PTP analysiert. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, daß auch die Wildtyp Proteine miteinander interagieren können (Abb. 4.10.). Wie schon mit den FLAG-VE-PTP Konstrukten (Abb. 4.6. B) konnte kein Unterschied im Bindungsverhalten der Proteine nach Deletion der zytoplasmatischen Domäne von VE-Cadherin festgestellt werden. In der Negativkontrolle konnte gezeigt werden, daß diese Interaktion spezifisch über VE-PTP vermittelt wird, da mit dem Antikörper VE-PTP-C keine Kreuzreaktion mit VE-Cadherin detektiert wurde.

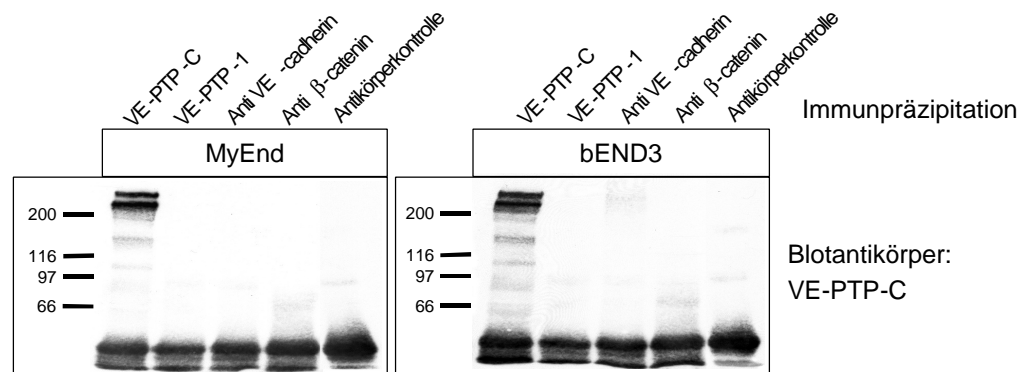


**Abbildung 4.10.: Die Wildtyp Proteine von VE-PTP und VE-Cadherin interagieren miteinander unabhängig von dem zytoplasmatischen Bereich von VE-Cadherin**

Lysate von COS-7 Zellen, die mit VE-PTP / VE-Cadherin oder VE-Cadherin und VE-PTP / VE-Cad EC oder VE-Cad EC transient transfiziert waren wurden mit dem Antikörper VE-PTP-C inkubiert. Die Präzipitate wurden anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Mit Antikörpern gegen VE-PTP und VE-Cadherin wurden diese Präzipitate über einen Immunblot analysiert. (MW, Molekulargewichtsmarker in Kilodalton)

## 4.8. Nachweis von VE-PTP in murinen endothelialen Zelllinien

Eine Teilsequenz von VE-PTP wurde ursprünglich aus der cDNA der murinen Endothelzelllinie bEnd.5 kloniert. Über *in situ* Hybridisierungen wurde die mRNA von VE-PTP in Gefäßen von Maus-Embryonen nachgewiesen. Das native Protein konnte jedoch bislang nicht in Endothelzellen nachgewiesen werden. In einer weiteren Charakterisierung des Antikörpers VE-PTP-C wurde versucht natives VE-PTP in Endothelzellen mittels Immunpräzipitation und Immunblot nachzuweisen. Mit den beiden Antiseren VE-PTP-C und VE-PTP-1, sowie weiteren Antiseren aus Kaninchen gegen VE-Cadherin und  $\beta$ -Catenin, wurden Immunpräzipitationen an Lysaten der Endothelzelllinien MyEnd und bEnd.3 durchgeführt.



**Abbildung 4.11.: Detektion von endogenem VE-PTP in endothelialen Zelllinien**

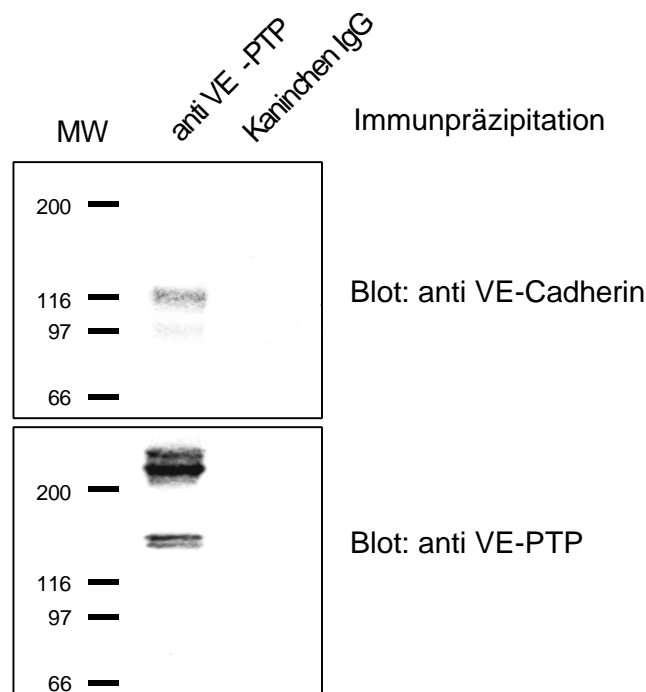
Triton X-100 Lysate von jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen bEnd.3 oder MyEnd wurden in Immunpräzipitationen mit polyklonalen Antikörpern gegen VE-PTP, VE-Cadherin und  $\beta$ -Catenin eingesetzt. Die Präzipitate wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Mit dem Antikörper VE-PTP-C wurde ein Immunblot gegen VE-PTP durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde der Antikörper VE-PTP-C alleine aufgetragen. (MW, Molekulargewichtsmarker in Kilodalton)

Dabei wurden je Immunpräzipitation Triton X-100 Extrakte von  $5 \times 10^6$  Zellen eingesetzt und im Immunblot mit dem Antikörper VE-PTP-C analysiert. Als eine weitere Kontrolle wurde in eine Spur des Gels nur VE-PTP-C Antikörper appliziert, um unspezifische Signale, hervorgerufen durch das Immunglobulin selbst, zuordnen zu können.

Mit dem Antikörper VE-PTP-C war es möglich sowohl in bEnd.3, als auch in MyEnd Zellen zwei spezifische Proteinbanden mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 220 und 250 kDa zu detektieren, die mit keinem der Kontroll-Antikörper präzipitiert wurden (Abb. 4.11.).

## 4.9. Koimmunpräzipitation von VE-Cadherin mit VE-PTP in Endothelzellen

Über Koimmunpräzipitationen konnte in heterologen Expressionssystemen eine Interaktion zwischen VE-PTP und VE-Cadherin gezeigt werden. In einem weiteren Experiment sollte analysiert werden, ob endogen exprimiertes VE-Cadherin und endogenes VE-PTP in Endothelzellen miteinander assoziieren. In bEnd.3 Zellen wird sowohl VE-PTP, als auch VE-Cadherin endogen exprimiert (Abb. 4.11.). Für Koimmunpräzipitationen von VE-Cadherin mit VE-PTP wurden Triton X-100 Lysate von  $5 \times 10^7$  Zellen bEnd.3 eingesetzt und Immunpräzipitationen mit dem Antikörper gegen VE-PTP (VE-PTP-C) durchgeführt. Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Anschließend wurde ein Immunblot mit einem monoklonalen Antikörper gegen VE-Cadherin und dem Antikörper gegen VE-PTP durchgeführt.



**Abbildung 4.12.: Endogenes VE-Cadherin in Maus Endothelioma Zellen interagiert mit nativem, endogenem VE-PTP**

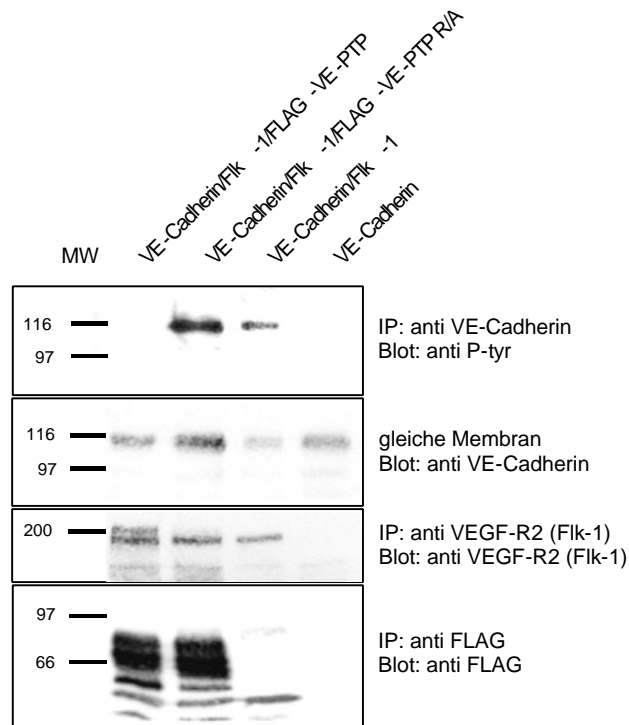
Antikörpern gegen VE-PTP (anti-VE-PTP) und als Kontrolle Kaninchen IgG (Kaninchen IgG) wurden in einer Immunpräzipitation mit Lysaten von bEnd.3 Zellen eingesetzt. Die präzipitierten Proteine wurden anschließend im Immunblot mit anti VE-Cadherin Antikörpern (obere Abbildung) oder anti VE-PTP Antikörper (untere Abbildung) analysiert. (MW, Molekulargewichtsmarker in Kilodalton)

Mit den beschriebenen Versuchsbedingungen war es möglich, die Interaktion von endogen exprimierten VE-Cadherin und VE-PTP über Koimmunpräzipitation nachzuweisen (Abb. 4.12.).

Zusammenfassend konnte in Interaktionsstudien sowohl in heterologen Expressionssystemen, als auch in Endothelzellen mit den endogenen Proteinen gezeigt werden, daß VE-PTP mit VE-Cadherin assoziiert.

#### **4.10. VE-PTP induziert die Dephosphorylierung von VE-Cadherin *in vivo***

In den bisherigen Experimenten konnte eine Interaktion zwischen VE-Cadherin und VE-PTP biochemisch charakterisiert werden. Es ist jedoch nicht bekannt, ob VE-PTP auch eine regulatorische Funktion auf Phosphorylierung von VE-Cadherin hat. Die Rezeptor Tyrosin Kinase Tie-2 interagiert mit VE-PTP und wird *in vivo* durch Expression von VE-PTP dephosphoryliert. Diese enzymatische Interaktion verläuft selektiv, da die Rezeptor Tyrosin Kinase VEGF-R2 nicht von VE-PTP dephosphoryliert wird [95]. Diese Daten implizieren, daß VE-PTP *in vivo* eine substratspezifische Aktivität hat. Deshalb wurde in einem heterologen Expressionssystem untersucht, ob VE-PTP eine Dephosphorylierung von VE-Cadherin induzieren kann. Transiente exprimiertes VE-Cadherin ist in COS-7 Zellen nicht phosphoryliert (Abb. 4.13., Spur 4). In verschiedenen Publikationen konnte jedoch gezeigt werden, daß die Behandlung von Endothelzellen mit VEGF zu einer Phosphorylierung von VE-Cadherin und der assoziierten Catenine führt [87]. VEGF aktiviert die Rezeptor Tyrosin Kinase VEGF-R2 (Flk-1), die eine wichtige Funktion bei der Regulation bei der Angiogenese übernimmt [133]. Wie in Immunblots gezeigt werden konnte, führt die Kotransfektion von VE-Cadherin und VEGF-R2 (Flk-1) in COS-7 Zellen tatsächlich zu einer Phosphorylierung von VE-Cadherin (Abb. 4.13. Spur 3). Im Gegensatz zu den Beobachtungen in Endothelzellen wird  $\beta$ -Catenin jedoch nur sehr schwach oder gar nicht phosphoryliert. Daher konnte in diesem Versuch nur eine Enzymaktivität von VE-PTP gegenüber VE-Cadherin untersucht werden. In Dreifachtransfektionen von COS-7 Zellen mit VE-Cadherin, VEGF-R2 (Flk-1) und FLAG-VE-PTP oder dem katalytisch inaktiven FLAG-VE-PTP R/A wurden Immunpräzipitationen gegen VE-Cadherin, FLAG



#### Abbildung 4.13.: VE-Cadherin wird *in vivo* durch VE-PTP dephosphoryliert

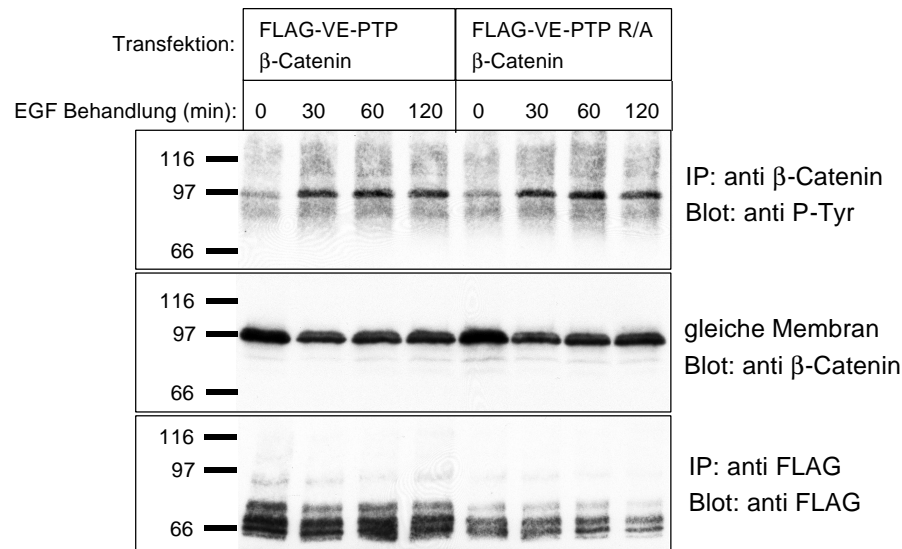
COS-7 Zellen wurden mit VE-Cadherin, VEGF-R2 (Flk-1) und FLAG-VE-PTP oder VE-Cadherin, VEGF-R2 (Flk-1) und FLAG-VE-PTP R/A, mit VE-Cadherin und VEGF-R2 (Flk-1) oder nur VE-Cadherin transient transfiziert. Die Zellsate wurden anschließend mit anti VE-Cadherin, anti Flk-1 oder anti-FLAG Antikörpern immunpräzipitiert und die Präzipitate im Immunblot analysiert (siehe Beschriftung rechts). (MW: Molekulargewichtsmarker in Kilodalton)

und VEGF-R2 (Flk-1) durchgeführt und in Immunblots die Phosphorylierung von VE-Cadherin und die Expression der präzipitierten Proteine untersucht. Nur nach Transfektion der katalytisch aktiven Form von VE-PTP, nicht jedoch der katalytisch inaktiven Form war VE-Cadherin dephosphoryliert (Abb. 4.13., Spuren 1 und 2). Mit dem gleichen Filter wurde anschließend über Immunblot gezeigt, daß in den einzelnen Transfektionsansätzen vergleichbare Mengen an VE-Cadherin von den Zellen exprimiert wurden. Zusätzlich wurden Immunblots gegen VEGF-R2 (Flk-1) und FLAG-VE-PTP durchgeführt und auch hier wurden vergleichbare Mengen an exprimierten Proteinen in den verschiedenen Transfektionsansätzen detektiert. Da VEGF-R2 (Flk-1) von VE-PTP nicht dephosphoryliert wird [95], konnte gezeigt werden, daß VE-PTP *in vivo* die Dephosphorylierung von VE-PTP induzieren und die durch VEGF-R2 (Flk-1) *in vivo* induzierte Phosphorylierung von VE-Cadherin reduzieren kann.



#### 4.11. $\beta$ -Catenin wird von VE-PTP *in vivo* nicht dephosphoryliert

In einer weiteren Fragestellung wurde untersucht, ob VE-PTP auch die Dephosphorylierung weiterer Proteine des Cadherin-Catenin-Komplexes induzieren kann. Diese Situation findet man bei der Interaktion von PTP1B und N-Cadherin. PTP1B induziert die Dephosphorylierung von  $\beta$ -Catenin, obwohl die Interaktion an den Cadherin-Catenin-Komplex über N-Cadherin verläuft. Stimulierung von COS-7 Zellen durch EGF führt zu einer Phosphorylierung des Catenin p120<sup>ctn</sup>, die durch Transfektion der Phosphatase RPTP $\mu$  deutlich reduziert wird [118]. EGF Stimulation von COS-7 Zellen führt jedoch auch zu einer Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin. Diese Antwort der Zellen nach EGF Stimulation konnte in dieser Arbeit auch für  $\beta$ -Catenin, nicht jedoch für VE-Cadherin gezeigt werden.



**Abbildung 4.14.:**  $\beta$ -Catenin wird nach EGF Behandlung nicht von VE-PTP dephosphoryliert.

COS-7 Zellen wurden mit  $\beta$ -Catenin und FLAG-VE-PTP oder FLAG-VE-PTP R/A transfiziert und mit 40 ng/ml EGF für verschiedene Zeitpunkte stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und eine Immunpräzipitation gegen  $\beta$ -Catenin und den FLAG-Tag durchgeführt. Die Präzipitate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. In einem Immunblot wurde mit einem Antikörper gegen Phosphotyrosin die Tyrosin-Phosphorylierung und mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Catenin und gegen FLAG die präzipitierten Mengen an Protein analysiert. Die Positionen der Molekülgewichtsmarker sind auf der linken Seite in Kilodalton angegeben.

Um zusätzliche Hinweise auf die Substratspezifität von VE-PTP in COS-7 Zellen zu erhalten, wurden COS-7 Zellen mit  $\beta$ -Catenin und mit FLAG-VE-PTP, bzw FLAG-VE-PTP R/A transient transfiziert und mit EGF behandelt. Anschließend wurden Immunpräzipitationen gegen  $\beta$ -Catenin und VE-PTP durchgeführt und die Präzipitate im Immunblot auf Phosphorylierung und

Expression der Proteine untersucht. Es wurde kein Unterschied in der Phosphorylierungskinetik von  $\beta$ -Catenin nach EGF Stimulierung in den COS-7 Zellen, die mit dem FLAG-VE-PTP Konstrukt transfiziert waren, im Vergleich zu den COS-7 Zellen die mit dem katalytisch inaktiven FLAG-VE-PTP R/A Konstrukt transfiziert waren, detektiert (Abb. 4.14.). Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, daß VE-PTP in COS-7 Zellen eine Dephosphorylierung von  $\beta$ -Catenin in Abwesenheit von VE-Cadherin nicht vermittelt. Demnach stellt die VE-PTP vermittelte Dephosphorylierung von VE-Cadherin in COS-7 Zellen einen selektiven Vorgang, ausgelöst durch die Expression von VE-PTP, dar.

## 5. Diskussion

Das Endothel bildet eine hochspezialisierte Barriere zwischen dem Blutgefäßsystem und dem umgebenden Gewebe. Die Integrität dieser Barriere wird durch die lateralen Zell-Zell-Kontakte der Endothelzellen reguliert. Verschiedene Regulationsmechanismen der Zelle bewirken ein selektives Öffnen der Zell-Zell-Kontakte, so daß der Stoffaustausch mit dem umgebenden Gewebe möglich ist. Aber auch die Neubildung von Gefäßen (Angiogenese) und das Auswandern von Blutzellen in das Gewebe wird durch Veränderungen der Integrität endothelialer Kontaktbereiche kontrolliert. Die Zelladhäsion wird auf molekularer Ebene durch Zelloberflächenmoleküle mit adhäsiven Eigenschaften verwirklicht. Diese Zelladhäsionsmoleküle ermöglichen spezifische Zellerkennung sowie selektive Interaktion von Zellen. Viele dieser Proteine sind als Proteinkomplexe in subzellulären Strukturen organisiert. Diese Strukturen werden auch als Junctions bezeichnet und setzen sich aus den Tight Junctions, Desmosomen, Gap-Junctions und den Adherens Junctions zusammen. Ein Proteinkomplex der Adherens Junctions ist der Cadherin-Catenin-Komplex. Die Cadherinfamilie umfaßt eine Gruppe von Zelladhäsionsmolekülen, deren Mitglieder Zell-Zell-Kontakte durch homophile,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Bindungen vermitteln. Die "klassischen" Cadherine sind gewebsspezifisch exprimierte Transmembran-proteine, für deren adhäsive Funktion neben den Wechselwirkungen der extrazellulären Domäne an der Zelloberfläche auch Interaktionen der intrazellulären Domäne mit zytoplasmatischen Proteinen von Bedeutung sind. Die intrazelluläre Domäne ist der am stärksten konservierte Bereich klassischer Cadherine [134]. An diesen Bereich binden die Catenine  $\beta$ -Catenin oder  $\gamma$ -Catenin, die wiederum mit  $\alpha$ -Catenin eine Interaktion eingehen. Das Vinculin homologe Protein  $\alpha$ -Catenin verbindet diesen Protein-Komplex mit dem Zytoskelett [23]. Verlust der Bindung an die Catenine und damit an das Zytoskelett ist gleichbedeutend mit dem Verlust der adhäsiven Funktion der Cadherine. So wird über Modulation dieses Proteinkomplexes die Integrität der Zell-Zell-Kontakte benachbarter Zellen reguliert [49].

Mechanismen die den Cadherin-Catenin-Komplex in seiner Funktionalität beeinflussen, waren in den vergangenen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Dabei stellte sich heraus, daß Veränderungen der Stabilität von

Zell-Zell-Kontakten häufig mit der Tyrosin-Phosphorylierung der Proteine des Cadherin-Catenin-Komplexes einhergehen [71] [73]. In der Zwischenzeit sind einige Mitglieder der Familie der Src- Kinasen identifiziert worden, deren Aktivierung zu einer Phosphorylierung des Cadherin-Catenin-Komplexes und zu einem Verlust der Zell-Zell-Kontakte führt [135] [79]. Auch die Aktivierung einiger Rezeptor Tyrosin Kinasen führt zu dem Verlust der Integrität von Zell-Kontakten und einer Phosphorylierung des Cadherin-Catenin-Komplexes [87] [85]. Ob die Phosphorylierung des Cadherin-Catenin-Komplexes jedoch tatsächlich für die Kontrolle der Zell-Zell-Kontakte verantwortlich ist, konnte bislang nicht eindeutig gezeigt werden. Um die Funktion der Tyrosin Phosphorylierung diese Proteinkomplexes in Adhäsionsprozessen zu verstehen, ist es von Bedeutung Proteine zu identifizieren, die eine regulatorische Funktion auf die Phosphorylierung des Cadherin-Catenin-Komplexes ausüben. Den Antagonisten der Kinasen, den Phosphatasen kommt bei dieser Aufgabe eine besondere Bedeutung zu. Bislang wurden die vier Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatasen LAR [113], RPTP $\mu$  [136], PTP $\kappa$  [114] und RPTP $\beta/\xi$  [100] und die zwei zytoplasmatische Phosphatasen SHP-2 [107] und PTP1B [80] beschrieben, die mit dem Cadherin-Catenin-Komplex interagieren. Bis auf PTP1B, die selektiv mit N-Cadherin interagiert und RPTP $\mu$ , die mit den Cadherinen E- und N-Cadherin, sowie Cadherin-4 eine Bindung eingehen kann, interagieren diese Phosphatasen alle mit  $\beta$ -Catenin. Bislang konnte für keine dieser Phosphatasen eine Funktion bei der Dephosphorylierung oder Bindung von VE-Cadherin nachgewiesen werden. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Charakterisierung von Interaktionen endothelspezifischer Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatasen mit dem VE-Cadherin-Catenin-Komplex. VE-PTP ist eine Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatase (RPTP), deren Sequenz partiell aus murinen Endothelzellen kloniert wurde. *In situ* Hybridisierungen ergaben, daß VE-PTP endothelspezifisch ab E.7 in Maus Embryonen exprimiert wird [95]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die vollständige Sequenz von VE-PTP in Zusammenarbeit mit Dr. Urban Deutsch (Max-Planck-Institut für klinische und physiologische Forschung, Bad-Nauheim) und Dr. Dave T. Shima (Institute of Cancer Research Fund, London) kloniert und sequenziert. Sequenzanalysen ergaben, daß VE-PTP ein Typ I Transmembran-Protein ist, daß in die Subklasse III der Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatasen gehört. Die Proteine

dieser Subgruppe zeichnen sich durch eine Ektodomäne, die strukturell nur aus Fibronectin III Domänen besteht und nur einer einzelnen aktiven katalytischen Domäne in ihrem zytoplasmatischen Bereich aus. In weiteren Untersuchungen konnte in dieser Arbeit erstmals endogen exprimiertes VE-PTP in den Endothelzelllinien MyEnd und bEnd.3 mit einem Antikörper gegen den C-Terminus des Proteins (VE-PTP-C) dargestellt werden. Dabei wurden zwei Proteine mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 220 und 250 kDa detektiert. Diese Proteine werden auch mit monoklonalen Antikörpern gegen VE-PTP in bEnd.3 Zellen detektiert (Alexander Gamb, persönliche Mitteilung). Nach Transfektion der VE-PTP cDNA in COS-7 und CHO Zellen wird von den verschiedenen Antikörpern selektiv ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 220 kDa detektiert. Diese Größe entspricht dem theoretischen Molekulargewicht von VE-PTP, das bei 220 kDa liegt. Das höhere Molekulargewicht des 250 kDa Protein in Endothelzellen könnte auf unterschiedliche post-translationäre Modifikationen, wie Glykosylierungen zurückzuführen sein. Ebenfalls denkbar wäre die Expression verschiedener Isoformen von VE-PTP in Endothelzellen.

### **5.1. VE-Cadherin assoziiert mit der Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatase VE-PTP**

In dieser Arbeit wurde eine Interaktion zwischen der Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatase VE-PTP und VE-Cadherin nachgewiesen. Diese Interaktion wurde mittels Koimmunpräzipitationen von VE-Cadherin mit VE-PTP in heterologen Expressionssystemen und mit den nativen, endogenen Proteinen aus Endothelzellen nachgewiesen. Zusätzlich konnte auch eine Interaktion zwischen VE-PTP und PECAM-1 gezeigt werden, die im weiteren getrennt diskutiert wird. Die nähere Charakterisierung der VE-PTP - VE-Cadherin Interaktion ergab, daß die beiden Catenine p120<sup>ctn</sup> oder  $\beta$ -Catenin keine Assoziation mit VE-PTP eingehen. Demnach verläuft die Bindung von VE-PTP an den Cadherin-Catenin-Komplex ausschließlich über die Interaktion mit VE-Cadherin. Die Selektivität der Bindung wurde außerdem in Bindungsstudien mit dem Tight Junction Protein JAM-1, sowie der Rezeptor Tyrosin Kinase VEGF-R2 (Flk-1) dokumentiert, die beide keine Interaktion mit VE-PTP eingehen konnten. Damit stellt die VE-PTP - VE-Cadherin Interaktion die erste beschriebene Assoziation einer RPTP mit VE-Cadherin dar. Es sind bislang

zwei weitere Phosphatasen beschrieben worden, die mit „klassischen“ Cadherinen interagieren. Zum einen wurde eine Interaktion zwischen der zytoplasmatischen Phosphatase PTP1B und N-Cadherin dokumentiert [80], zum anderen wurden mit RPTP $\mu$  Interaktionen zu den verschiedenen „klassischen“ Cadherinen E-Cadherin, N-Cadherin und Cadherin-4 gezeigt [136] [109]. RPTP $\mu$  geht jedoch auch eine Interaktion mit dem Catenin p120<sup>ctn</sup> ein [118]. Im Gegensatz zu der RPTP $\mu$  - Cadherin Interaktion scheint die Assoziation von VE-PTP mit VE-Cadherin spezifisch auf VE-Cadherin beschränkt zu sein, da mit N-Cadherin keine Interaktion eingegangen wurde. Dieser Versuch wurde mit endogenem, humanem N-Cadherin durchgeführt, daß gegenüber dem murinen N-Cadherin in seiner Aminosäuresequenz stark konserviert ist.

Im Verlauf der Charakterisierung der VE-PTP - VE-Cadherin Interaktion wurden die Proteindomänen untersucht, die eine Interaktion von VE-Cadherin und VE-PTP vermitteln. Diese Experimente zeigten, daß die Interaktion von VE-PTP an VE-Cadherin wahrscheinlich primär durch die Ektodomänen vermittelt wird, obwohl die zytoplasmatischen Domänen auch miteinander interagieren können. So konnte die Präzipitation von VE-Cadherin mit Fusionsproteinen der bakteriellen Glutathion-S-Transferase (GST) und VE-PTP, die den zytoplasmatischen Teil von VE-PTP umfassen, gezeigt werden. Allerdings konnte in diesem System nur eine Interaktion zwischen den katalytisch inaktiven GST-VE-PTP Mutanten und VE-Cadherin, nicht jedoch mit dem Wildtyp GST-VE-PTP Fusionsprotein festgestellt werden. Diese Bindung verläuft in Lysaten von bEnd.3 Zellen mit sehr schwacher Effizienz. Das Einfügen von Punktmutationen im katalytischen Zentrum von Phosphatasen führt zu einer Inaktivierung der Phosphatasen, aber auch zu einer Stabilisierung der Bindung an mögliche Substraten [129]. Die verwendeten GST-VE-PTP Fusionsproteine interagieren mit einem weiteren Substrat von VE-PTP, der Kinase Tie-2 sehr effizient [95]. Daher scheinen die zytoplasmatischen Domänen für die Bindung zwischen VE-PTP und VE-Cadherin nur eine sekundäre Funktion für die Assoziation der Proteine zu haben. Extrazellulär ist die membranproximale fünfte Cadherin Domäne von VE-Cadherin und die membranproximale 17. Fibronectin III Domäne von VE-PTP an der extrazellulären Bindung beteiligt. Demnach stellt die Assoziation von VE-PTP an VE-Cadherin neben der Interaktion des Integrins  $\alpha_E\beta_7$  an E-Cadherin [137] und

Fibrin an VE-Cadherin [138] erst die dritte beschriebene heterophile Interaktion eines klassischen Cadherins mit einem Bindungspartner über die extrazelluläre Domäne dar. Da für diese Interaktion die membranproximalen Domänen ausreichen, ist eine heterophile Bindung in *cis* denkbar. Diese Bindung könnte die erste beschriebene heterophile Interaktion eines Transmembranmoleküls in *cis* an ein klassisches Cadherin darstellen. Für die Familie der „klassischen“ Cadherine gibt es nur sehr wenige Beispiele heterophiler Interaktionen, die über die Ektodomänen verlaufen. Für E-Cadherin ist eine heterophile Interaktion in *trans* mit dem Integrin  $\alpha_E\beta_7$  beschrieben worden, die über den N-Terminus von E-Cadherin verläuft und nur nach *cis*-Dimerisierung des Cadherins zustande kommt. Dieses Integrin wird hauptsächlich von Lymphozyten, die in der Mukosa lokalisiert sind exprimiert und vermittelt wahrscheinlich den Kontakt zwischen intraepithelialen Lymphozyten und Epithelzellen [137] [139]. Für VE-Cadherin ist eine heterophile Interaktion in *trans* mit Fibrin beschrieben worden, die über die N-terminale  $\beta_{15-42}$  Sequenz von Fibrin vermittelt wird. Fibrin induziert die Bildung neuer Blutgefäße während der Wundheilung und Tumorwachstums. In Fibrin- oder Collagen-Gelen werden Endothelzellen zu gefäßartigem Wachstum angeregt. Mit Antikörpern gegen die erste Cadherin-Domäne von VE-Cadherin kann dieses Wachstum inhibiert werden. Damit könnte Fibrin eine antagonistische Funktion bei der Induktion von Angiogeneseprozessen im Zusammenhang mit VE-Cadherin als Signalmolekül haben [140] [138] [141]. Die Ektodomänen von Cadherinen haben wichtige Funktionen bei der Regulation der Adhäsionsaktivität und der Signalübermittlung [142]. So können Antikörper gegen die Ektodomänen von klassischen Cadherinen ein reduziertes Adhäsionsverhalten der Zellen, bis hin zu einer völligen Zerstörung der Zell-Zell-Kontakte auslösen [54, 55]. Mit einem Antikörper (AA5), der gegen die fünfte Cadherin Domäne von C-Cadherin gerichtet ist, konnte genau der entgegengesetzte Effekt beobachtet werden. Die Inkubation von Zellen mit diesem Antikörper führt zu einem verbesserten Adhäsionsverhalten und wirkte migrationshemmend auf die animalen Pole von Blastozysten von *Xenopus* nach Activin Behandlung [58]. Diese Daten implizieren die Möglichkeit einer Modulation der Adhäsionsaktivität und damit auch der Funktion als Signalmolekül von VE-Cadherin durch die Bindung der fünften Cadherin-Domäne von VE-Cadherin an VE-PTP. Ob VE-PTP durch die Interaktion mit der fünften Cadherin-Domäne von VE-Cadherin eine Modulation der Aktivität von VE-Cadherin auf Endothelzellen bewirkt, könnte in weiteren Arbeiten durch die

kompetitive Hemmung der Interaktion gezeigt werden. Diese Experimente könnten mit löslichen Proteinen der 17. Fibronectin III Domäne von VE-PTP oder Antikörpern gegen die fünfte Cadherin-Domäne durchgeführt werden.

## **5.2. VE-PTP induziert die Dephosphorylierung von VE-Cadherin**

In dieser Arbeit konnte eine Interaktion zwischen VE-PTP und VE-Cadherin biochemisch nachgewiesen werden. In weiterführenden Versuchen wurde anschließend auch gezeigt, daß katalytisch aktives VE-PTP die Dephosphorylierung von VE-Cadherin induzieren kann. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß Kotransfektion von COS-7 Zellen mit VE-Cadherin und VEGF-R2 (Flk-1) zu einer Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin führt. Die zusätzliche Transfektion von VE-PTP führt zu einem Verlust dieser Phosphorylierung. Die Transfektion der katalytisch inaktiven VE-PTP R/A Mutante hat jedoch keinen Effekt auf die Phosphorylierung von VE-Cadherin. Da VEGF-R2 selbst nicht durch die Expression von VE-PTP in COS-7 Zellen dephosphoryliert wird [95], ist davon auszugehen, daß VE-PTP eine Dephosphorylierung von VE-Cadherin induziert. Diese Dephosphorylierung ist über verschiedene Mechanismen zu erklären. Es ist denkbar, daß VE-PTP die VEGF-R2 induzierte Phosphorylierung von VE-Cadherin verhindert, indem VE-Cadherin sterisch an einer Interaktion mit einer Kinase gehindert wird. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die katalytisch inaktive Mutante VE-PTP R/A eine VEGF-R2 induzierte Phosphorylierung von VE-Cadherin nicht verhindert. Demnach ist die enzymatische Aktivität von VE-PTP notwendig, um die Dephosphorylierung von VE-Cadherin zu induzieren. Ob die Dephosphorylierung jedoch direkt an VE-Cadherin erfolgt, oder indirekt verläuft muß in weiteren Studien gezeigt werden. Die Phosphorylierung von VE-Cadherin könnte der Situation in Endothelzellen nach VEGF Stimulation physiologisch entsprechen. An Endothelzellen konnte gezeigt werden, daß nach Stimulation von VEGF-R2 durch VEGF Behandlung der Cadherin-Catenin Komplex phosphoryliert vorliegt [87]. Daher könnte VE-PTP eine Funktion als VEGF-R2 Antagonist in Endothelzellen übernehmen. Ob diese Regulation auch in Endothelzellen erfolgt und damit direkten Einfluß auf VEGF-R2 vermittelte Signalübertragungswege in Endothelzellen nehmen kann, muß jedoch in weiteren Studien gezeigt werden.



VE-PTP induziert Dephosphorylierung von VE-Cadherin in COS-7 Zellen. Die Phosphorylierungskinetik von  $\beta$ -Catenin nach Stimulation der Zellen mit EGF wurde durch Expression von VE-PTP in COS-7 Zellen jedoch nicht beeinflusst. Analog wurde von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt, daß RPTP $\mu$  in COS-7 Zellen die Phosphorylierung von p120<sup>ctn</sup> nach EGF Stimulation der Zellen deutlich reduziert [118]. Eine interessante Frage ist, ob  $\beta$ -Catenin in Anwesenheit von VE-Cadherin über VE-PTP dephosphoryliert werden kann. In CHO-Zellen liegt  $\beta$ -Catenin unabhängig von der zusätzlichen Expression oder Aktivierung von Kinasen in einem phosphorylierten Zustand vor. In CHO-Zellen, die VE-Cadherin,  $\beta$ -Catenin und VE-PTP exprimieren, liegt  $\beta$ -Catenin in einem dephosphorylierten Zustand vor (Gregor Poell, persönliche Mitteilung). Es gibt verschiedene Möglichkeiten diese Dephosphorylierung zu erklären. VE-PTP könnte indirekt über Interaktionen mit weiteren Phosphatasen eine Dephosphorylierung von  $\beta$ -Catenin induzieren. Da sowohl VE-PTP, als auch  $\beta$ -Catenin an VE-Cadherin binden und dadurch in räumliche Nähe gebracht werden, könnte  $\beta$ -Catenin auch direkt durch VE-PTP dephosphoryliert werden. Auf jeden Fall scheint eine Komplexierung von  $\beta$ -Catenin, VE-Cadherin und VE-PTP notwendig zu sein, um eine VE-PTP vermittelte Dephosphorylierung von  $\beta$ -Catenin zu induzieren. Diese Daten lassen Rückschlüsse auf mögliche Regulationsmechanismen von VE-PTP gegenüber Substraten zu. Die Interaktion und damit verbunden die Aktivität von Phosphatasen gegenüber ihren Interaktionspartnern ist häufig von einer vorhergehenden Phosphorylierung der miteinander interagierenden Proteine abhängig [91]. So findet eine Bindung von p120<sup>ctn</sup> an SHP-1 nur nach Tyrosin Phosphorylierung von p120<sup>ctn</sup> statt [143]. In anderen Fällen wird über Phosphorylierung der Phosphatase die Interaktion mit Substraten reguliert, wie zum Beispiel zwischen SHP-2 und  $\beta$ -Catenin [107] oder PTP1B und N-Cadherin [144]. Es gibt jedoch auch Beispiele, in denen die Interaktion unabhängig von der Phosphorylierung der Interaktionspartner erfolgt. So konnte nachgewiesen werden, daß die Phosphatasen RPTP $\beta/\xi$  und  $\beta$ -Catenin [100] oder PTP $\mu$  und E-Cadherin [109] unabhängig von der Tyrosin Phosphorylierung der Interaktionspartner miteinander assoziieren können. Die Assoziation zwischen VE-PTP und VE-Cadherin wird wahrscheinlich nicht über Phosphorylierung von VE-Cadherin reguliert, da die Interaktion primär über die extrazellulären Domänen der Proteine vermittelt wird und eine Phosphorylierung von VE-Cadherin für die

Interaktion nicht notwendig ist. Zudem wurde auch für  $\beta$ -Catenin trotz Phosphorylierung keine Interaktion mit VE-PTP festgestellt. Daher wird die Aktivität von VE-PTP wahrscheinlich weniger über die Bindung an mögliche Substrate, sondern über Liganden der Rezeptor-Domäne reguliert.

### **5.3. Funktion von VE-PTP bei der Kontrolle der VE-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Kontakte von CHO Zellen**

Veränderungen der Integrität von Zell-Zell-Kontakten werden von der Tyrosin-Phosphorylierung der Proteine des Cadherin-Catenin Komplexes begleitet [142]. Daher war es in unserem Interesse die Funktion von VE-PTP bei der Modulation VE-Cadherin vermittelter Zell-Zell-Kontakte zu untersuchen. Um diese Frage zu klären, wurden von einem Doktoranden unserer Arbeitsgruppe (Gregor Poell), aufbauend auf den diskutierten Daten, stabil transfizierte CHO Zellen hergestellt. Diese Zellen wurden mit VE-Cadherin (CHO-VE), VE-Cadherin und einem induzierbarem VE-PTP (CHO-C3) und VE-Cadherin / VEGF-R2 / VE-PTP induzierbar (CHO-F12) stabil transfiziert. Das VE-PTP Konstrukt umfaßte die 17. Fibronectin III Domäne und den zytoplasmatischen Teil von VE-PTP. Die Expression von diesem Konstrukt wurde über die Behandlung der Zellen mit dem Progesteron-Antagonisten Mifepriston induziert. VE-Cadherin Expression in CHO Zellen führt zu der Bildung eines Cadherin-Catenin-Komplexes mit in diesen Zellen endogen exprimierten Cateninen. In Permeabilitäts-Experimenten konnte nachgewiesen werden, daß VE-Cadherin Expression die Permeabilität eines Zellrasens von CHO Zellen, die selbst nicht über Zell-Junctions verfügen, stark herabsetzt [145]. Die CHO-C3 Zelllinie exprimiert konstitutiv VE-Cadherin und nach Induktion mit Mifepriston auch VE-PTP. Mit diesen Zellen wurde gezeigt, daß weder die Expression von katalytisch aktivem VE-PTP, noch die Behandlung der Zellen mit Mifepriston eine Veränderung der Permeabilität und damit der VE-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Kontakte zur Folge hat. Für einige Phosphatasen ist eine homophile Interaktion in *trans* Orientierung gezeigt worden, die zu der Adhäsion von Zellen führen kann [102, 104] [92]. Für die Phosphatasen HPTP $\beta$  und Dep-1, die wie VE-PTP in die Subklasse III der RPTPs gehören, wurde bislang noch keine homophile Interaktion beschrieben. Die Ektodomänen dieser Phosphatasen setzen sich ausschließlich aus Fibronectin III Domänen zusammen. Homophile

Bindungen anderer Phosphatasen werden über deren Ig Domänen vermittelt. Daher wäre es möglich, daß Mitglieder der RPTP Subklasse III generell keine homophilen Interaktionen eingehen können [97]. Das Ergebnis in der Zelllinie CHO-C3 dokumentiert, daß die Expression des in seiner Ektodomäne zum Teil deletierten VE-PTP keine adhäsiven Eigenschaften durch homophile Interaktion in *trans* hat.

Die CHO-F12 Zellen sind zusätzlich noch mit VEGF-R2 transfiziert. Expression von VEGF-R2 führt auch in CHO Zellen zu einer Tyrosin Phosphorylierung von VE-Cadherin. Nach Induktion von VE-PTP wird in diesen Zellen eine Dephosphorylierung von VE-Cadherin beobachtet. Diese Dephosphorylierung korreliert mit einem Rückgang der Permeabilität eines Zellrasens um 38 %. Dieses Ergebnis dokumentiert, daß die enzymatisch aktive Phosphatase VE-PTP, die mit dem Cadherin-Catenin-Komplex interagiert, Einfluß auf die Permeabilität als Meßgröße für die Integrität von Zell-Zell-Kontakten hat. Voraussetzung für diese Funktion ist jedoch die Expression der Kinase VEGF-R2, die mit einer Phosphorylierung von VE-Cadherin verbunden ist. Ein Zusammenhang zwischen der Aktivität einer Phosphatase gegenüber Cadherinen und der Modulation der Cadherin Aktivität wurde bislang nur für die Phosphatase PTP1B und N-Cadherin gezeigt. Die Inaktivierung der Phosphatase führt in diesem Fall zu einem Verlust der N-Cadherin vermittelten Adhäsion von Zellen [110]. PTP1B bindet jedoch selektiv an N-Cadherin und wahrscheinlich nicht an weitere Mitglieder der Cadherin-Familie [109]. Der N-Cadherin-Catenin-Komplex ist in Endothelzellen nicht an der Bildung von lateralen Zell-Zell-Kontakten beteiligt [51].

In der CHO-C3 Zelllinie wird  $\beta$ -Catenin nach VE-PTP Expression dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung von  $\beta$ -Catenin führte in diesen Zellen jedoch nicht zu einer Veränderung der Permeabilität und damit zu einer Veränderung der Zell-Zell-Kontakte hinsichtlich ihrer Integrität. In MDCK Zellen, die mit einem E-Cadherin- $\alpha$ -Catenin transfiziert waren, wurde nach Aktivierung der Src Kinase eine verringerte Adhäsionsaktivität gemessen, obwohl  $\beta$ -Catenin nicht mehr an der Aktivität des Cadherins beteiligt ist [81]. Die Phosphorylierung, bzw. Dephosphorylierung von  $\beta$ -Catenin könnte demnach in CHO Zellen und in MDCK Zellen keine regulatorische Funktion der Cadherin vermittelten Zell-Zell-Kontakte haben. Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, daß VE-PTP die Integrität von VE-Cadherin vermittelten Zell-Zell-

Kontakten in CHO Zellen bei gleichzeitiger Expression der Rezeptor Tyrosin Kinase VEGF-R2 beeinflussen kann. Wird diese Kinase nicht exprimiert, hat VE-PTP keinen Effekt auf die Zell-Zell-Kontakte dieser Zellen. Die VE-PTP vermittelte Regulation der Zell-Zell-Kontakte geht mit einer Dephosphorylierung von VE-Cadherin einher. Diese Daten implizieren die Möglichkeit einer Regulation VE-Cadherin vermittelter Zell-Zell-Kontakte durch den Phosphorylierungs-Zustand von VE-Cadherin. Die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin ist wahrscheinlich nicht entscheidend an dieser Regulation beteiligt. Der Effekt von VE-PTP auf die Integrität von Zell-Zell-Kontakten kann verschiedene Ursachen haben. So kann die enzymatische Aktivität von VE-PTP gegenüber spezifischen Substraten, wie VE-Cadherin zu dieser Modulation führen. Durch die Expression von VE-PTP und VEGF-R2 könnten jedoch auch weitere Proteine aktiviert werden, die eine regulatorische Funktion auf VE-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Kontakte ausüben. So wurde kürzlich in einer Studie gezeigt, daß PTP $\mu$  eine indirekte Regulation E-Cadherin vermittelter Zell-Adhäsion induziert, die nicht über die enzymatische Aktivität der Phosphatase vermittelt wird [116]. PTP $\mu$  rekrutiert mit RACK1 (receptor for activated Protein C Kinase 1) ein Gerüstprotein in die Zell-Zell-Kontaktbereiche von Zellen. An RACK1 assoziieren wiederum verschiedene Moleküle mit Signalübertragungsfunktion wie zum Beispiel PKC $\delta$ . Die Regulation von E-Cadherin vermittelter Adhäsion durch PTP $\mu$  ist wahrscheinlich durch die Rekrutierung von RACK1 und einer nachfolgenden Inaktivierung von PKC $\delta$  verbunden [146]. Ob die Modulation der Zell-Zell-Kontakte durch die enzymatische Aktivität von VE-PTP gegenüber möglichen Substraten der entscheidende Faktor ist, oder durch die Expression von VE-PTP weitere Proteine aktiviert werden, ist daher noch nachzuweisen. Dieser Nachweis kann geführt werden, indem eine CHO Zelllinie mit VE-Cadherin, VEGF-R2 und einer katalytisch inaktivierten Mutante von VE-PTP transfiziert wird. Dieses VE-PTP Konstrukt sollte nach der Expression keinen Effekt auf die Integrität der Zell-Zell-Kontakte hervorrufen, wenn die enzymatische Aktivität von VE-PTP für die Regulation VE-Cadherin vermittelter Zell-Zell-Kontakte notwendig ist. Der Austausch von VE-Cadherin in diesem zellulären System gegen ein VE-Cadherin Konstrukt, das Mutationen in seinen Tyrosinen enthält, könnte zudem die Funktion der Tyrosin Phosphorylierung von VE-Cadherin auf Zell-Zell-Kontakte aufklären.

Die Behandlung von Endothelzellen mit dem Wachstumsfaktor VEGF führt nicht nur zu einer Tyrosin Phosphorylierung von VE-Cadherin, sondern auch von PECAM-1 [87]. Sowohl Tie-2, als auch VEGF-R2 haben Funktionen bei der Proliferation von Endothelzellen und Neubildung von Gefäßen (Angiogenese) [133]. In der Erstbeschreibung von VE-PTP wurde eine Interaktion mit Tie-2 nachgewiesen [95]. Diese Interaktion führt zu einer Dephosphorylierung von Tie-2. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch auch eine Funktion von VE-PTP als Antagonist für VEGF-R2 vermittelte Phosphorylierung festgestellt werden. Dieses Ergebnis könnte bedeuten, daß durch die Modulation der Aktivität von VE-PTP die Neubildung von Gefäßen reguliert wird.

RPTPs können über Interaktionen mit extrazellulären Liganden in ihrer Aktivität reguliert werden. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, daß die Aktivität von RPTP $\beta/\xi$  gegenüber  $\beta$ -Catenin über den Liganden Pleiotrophin reguliert wird. Pleiotrophin führt zu einer Inaktivierung der Phosphatase und einem Anstieg der  $\beta$ -Catenin Phosphorylierung. Die Bindung der beiden Assoziationspartner wird jedoch durch die Stimulation von RPTP $\beta/\xi$  nicht verändert [100]. Dieses Prinzip der Regulation könnte auch auf die VE-PTP - VE-Cadherin Interaktion zutreffen, wobei entsprechende Liganden noch identifiziert werden müssen.

#### **5.4. PECAM-1 - ein Bindungspartner von VE-PTP**

PECAM-1 wurde wie VE-Cadherin in den Zell-Zell-Kontaktzonen von Endothelzellen nachgewiesen. Jedoch ist PECAM-1 nicht in subzellulären Strukturen, wie Junctions organisiert, sondern über den gesamten lateralen Kontaktbereich verteilt. Neben VE-Cadherin hat auch PECAM-1 eine Funktion bei der Bildung der Zell-Zell-Kontakte. Tyrosin Phosphorylierung von PECAM-1 wird nach Stimulation von Scherkräften auf Endothelzellen oder Aggregation von Blutplättchen und Mastzellen ausgelöst [147] [30].

PECAM-1 wurde in dieser Arbeit als ein weiterer Interaktionspartner von VE-PTP identifiziert. Für diese Bindung ist die Ektodomäne von VE-PTP essentiell, da eine Interaktion der intrazellulären Domänen von PECAM-1 und VE-PTP nicht nachgewiesen werden konnte. Da VE-Cadherin und PECAM-1 während verschiedener physiologischer Situationen in der Zelle parallel angesprochen werden, könnte VE-PTP ein Molekül sein, daß bei diesen Vorgängen eine gemeinsame Funktion für beide Proteine hat [148]. PECAM-1 wird neben VE-

Cadherin durch VEGF Stimulation von Endothelzellen in seinen Tyrosinresten phosphoryliert. Damit könnte VE-PTP auch gegenüber PECAM-1 eine regulatorische Funktion bei der VEGF-Antwort von Endothelzellen haben. PECAM-1 hat verschiedene Funktionen während der Transmigration von Leukozyten [33]. So kann mit Hilfe von Antikörper gegen verschiedene Domänen von PECAM-1 oder löslichen PECAM-1 Fusionsproteinen sowohl das Auswandern der Leukozyten aus den Gefäßen, als auch das Einwandern der Leukozyten in die Extrazelluläre-Matrix, inhibiert werden. Ob bei diesen Funktionen eine Phosphorylierung von PECAM-1 stattfindet, konnte noch nicht nachgewiesen werden. Diese Daten sprechen für eine parazelluläre Transmigration von Leukozyten, die mit einer Interaktion zwischen spezifischen Proteinen der Zell-Zell-Kontaktbereiche und Zell-Oberflächenproteinen von Leukozyten einhergehen. VE-PTP könnte eine entscheidende Funktion in der Regulation der Zell-Zell-Kontakte von Endothelzellen während der Transmigration von Leukozyten zukommen. Es wäre möglich, daß Liganden für VE-PTP auf Leukozyten exprimiert, oder während Entzündungsreaktionen in löslicher Form sekretiert werden und eine Modulation der VE-PTP Aktivität auslösen. Da VE-PTP die Integrität der VE-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Kontakte von CHO Zellen beeinflussen kann, ist es vorstellbar, daß die Interaktion von VE-PTP mit einem Liganden zu einer Öffnung der Zell-Zell-Kontakte führt. Dieser Mechanismus könnte anschließend die Transmigration von Leukozyten ermöglichen. Das Auffinden von Liganden der Ektodomäne von VE-PTP ist daher eine Möglichkeit, die Funktion dieser Phosphatase bei der Kontrolle der Zell-Zell-Kontakte zu charakterisieren.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Granger, D.N. and P. Kubes, *The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte- endothelial cell adhesion*. J Leukoc Biol, 1994. 55(5): p. 662-75.
2. Gowans, J.L. and H.W. Steer, *The function and pathways of lymphocyte recirculation*. Ciba Found Symp, 1980. 71: p. 113-26.
3. Westermann, J. and R. Pabst, *How organ-specific is the migration of 'naive' and 'memory' T cells?* Immunol Today, 1996. 17(6): p. 278-82.
4. Picker, L.J. and E.C. Butcher, *Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing*. Annu Rev Immunol, 1992. 10: p. 561-91.
5. Butcher, E.C., *Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity*. Cell, 1991. 67(6): p. 1033-6.
6. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell, 1994. 76(2): p. 301-14.
7. Ebnet, K. and D. Vestweber, *Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines*. Histochem Cell Biol, 1999. 112(1): p. 1-23.
8. Burns, A.R., et al., *Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners*. J Immunol, 1997. 159(6): p. 2893-903.
9. Johnson-Leger, C., M. Aurrand-Lions, and B.A. Imhof, *The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair?* J Cell Sci, 2000. 113(Pt 6): p. 921-33.
10. Feng, D., et al., *Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP*. J Exp Med, 1998. 187(6): p. 903-15.
11. Vestweber, D., *Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts*. J Pathol, 2000. 190(3): p. 281-91.
12. Allport, J.R., et al., *Endothelial-dependent mechanisms regulate leukocyte transmigration: a process involving the proteasome and disruption of the vascular endothelial-cadherin complex at endothelial cell-to-cell junctions*. J Exp Med, 1997. 186(4): p. 517-27.
13. Madri, J.A. and D. Graesser, *Cell migration in the immune system: the evolving inter-related roles of adhesion molecules and proteinases*. Dev Immunol, 2000. 7(2-4): p. 103-16.
14. Simionescu, M. and N. Simionescu, *Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. A look from cell biology*. Cell Biol Rev, 1991. 25(1): p. 1-78.
15. Gumbiner, B.M., *Breaking through the tight junction barrier*. J Cell Biol, 1993. 123(6 Pt 2): p. 1631-3.
16. Tsukita, S., M. Furuse, and M. Itoh, *Multifunctional strands in tight junctions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. 2(4): p. 285-93.
17. Del Maschio, A., et al., *Leukocyte recruitment in the cerebrospinal fluid of mice with experimental meningitis is inhibited by an antibody to junctional adhesion molecule (JAM)*. J Exp Med, 1999. 190(9): p. 1351-6.
18. Ebnet, K., et al., *The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM)*. Embo J, 2001. 20(14): p. 3738-48.
19. Beyer, E.C., *Gap junctions*. Int Rev Cytol, 1993: p. 1-37.
20. Lampugnani, M.G. and E. Dejana, *Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles*. Curr Opin Cell Biol, 1997. 9(5): p. 674-82.

21. Ando-Akatsuka, Y., *et al.*, *Differential behavior of E-cadherin and occludin in their colocalization with ZO-1 during the establishment of epithelial cell polarity.* J Cell Physiol, 1999. 179(2): p. 115-25.
22. Gumbiner, B., B. Stevenson, and A. Grimaldi, *The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex.* J Cell Biol, 1988. 107(4): p. 1575-87.
23. Aberle, H., H. Schwartz, and R. Kemler, *Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function.* J Cell Biochem, 1996. 61(4): p. 514-23.
24. Albelda, S.M., *et al.*, *EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule.* J Cell Biol, 1990. 110(4): p. 1227-37.
25. Ilan, N., *et al.*, *PECAM-1 (CD31) functions as a reservoir for and a modulator of tyrosine- phosphorylated beta-catenin.* J Cell Sci, 1999. 112 Pt 18: p. 3005-14.
26. Jackson, D.E., *et al.*, *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, 1997. 272(11): p. 6986-93.
27. Hua, C.T., *et al.*, *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, 1998. 273(43): p. 28332-40.
28. Pumphrey, N.J., *et al.*, *Differential association of cytoplasmic signalling molecules SHP-1, SHP- 2, SHIP and phospholipase C-gamma1 with PECAM-1/CD31.* FEBS Lett, 1999. 450(1-2): p. 77-83.
29. Cao, M.Y., *et al.*, *Regulation of mouse PECAM-1 tyrosine phosphorylation by the Src and Csk families of protein-tyrosine kinases.* J Biol Chem, 1998. 273(25): p. 15765-72.
30. Fujiwara, K., *et al.*, *Is PECAM-1 a mechanoresponsive molecule?* Cell Struct Funct, 2001. 26(1): p. 11-7.
31. Muller, W.A., *et al.*, *PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes.* J Exp Med, 1993. 178(2): p. 449-60.
32. Vaporciyan, A.A., *et al.*, *Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo.* Science, 1993. 262(5139): p. 1580-2.
33. Muller, W.A. and G.J. Randolph, *Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes.* J Leukoc Biol, 1999. 66(5): p. 698-704.
34. Duncan, G.S., *et al.*, *Genetic evidence for functional redundancy of Platelet/Endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1- dependent and PECAM-1-independent functions.* J Immunol, 1999. 162(5): p. 3022-30.
35. Schenkel, A.R., *et al.*, *CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions.* Nat Immunol, 2002. 3(2): p. 143-50.
36. Huang, A.J., *et al.*, *Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells.* J Cell Biol, 1993. 120(6): p. 1371-80.
37. Shaw, S.K., *et al.*, *Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium.* J Immunol, 2001. 167(4): p. 2323-30.



38. Tinsley, J.H., *et al.*, *Activated neutrophils induce hyperpermeability and phosphorylation of adherens junction proteins in coronary venular endothelial cells.* J Biol Chem, 1999. 274(35): p. 24930-4.
39. Cai, J., W.G. Jiang, and R.E. Mansel, *Phosphorylation and disorganization of vascular-endothelial cadherin in interaction between breast cancer and vascular endothelial cells.* Int J Mol Med, 1999. 4(2): p. 191-5.
40. Lewalle, J.M., *et al.*, *Alteration of interendothelial adherens junctions following tumor cell- endothelial cell interaction in vitro.* Exp Cell Res, 1997. 237(2): p. 347-56.
41. Andriopoulou, P., *et al.*, *Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. 19(10): p. 2286-97.
42. Rabet, M.J., *et al.*, *Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. 16(3): p. 488-96.
43. Gloor, S.M., *et al.*, *Interleukin-1 modulates protein tyrosine phosphatase activity and permeability of brain endothelial cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1997. 239(3): p. 804-9.
44. Wong, R.K., A.L. Baldwin, and R.L. Heimark, *Cadherin-5 redistribution at sites of TNF-alpha and IFN-gamma-induced permeability in mesenteric venules.* Am J Physiol, 1999. 276(2 Pt 2): p. H736-48.
45. Ozaki, H., *et al.*, *Cutting edge: combined treatment of TNF-alpha and IFN-gamma causes redistribution of junctional adhesion molecule in human endothelial cells.* J Immunol, 1999. 163(2): p. 553-7.
46. Rival, Y., *et al.*, *Inhibition of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 synthesis and leukocyte transmigration in endothelial cells by the combined action of TNF-alpha and IFN-gamma.* J Immunol, 1996. 157(3): p. 1233-41.
47. Barth, A.I., I.S. Nathke, and W.J. Nelson, *Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways.* Curr Opin Cell Biol, 1997. 9(5): p. 683-90.
48. Nose, A., K. Tsuji, and M. Takeichi, *Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules.* Cell, 1990. 61(1): p. 147-55.
49. Vleminckx, K. and R. Kemler, *Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling.* Bioessays, 1999. 21(3): p. 211-20.
50. Takeichi, M., *Morphogenetic roles of classic cadherins.* Curr Opin Cell Biol, 1995. 7(5): p. 619-27.
51. Navarro, P., L. Ruco, and E. Dejana, *Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization.* J Cell Biol, 1998. 140(6): p. 1475-84.
52. Carmeliet, P., *et al.*, *Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis.* Cell, 1999. 98(2): p. 147-57.
53. Shapiro, L., *et al.*, *Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins [see comments].* Nature, 1995. 374(6520): p. 327-37.
54. Gotsch, U., *et al.*, *VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo.* J Cell Sci, 1997. 110(Pt 5): p. 583-8.
55. Corada, M., *et al.*, *Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability.* Blood, 2001. 97(6): p. 1679-84.

56. Corada, M., *et al.*, *Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(17): p. 9815-20.
57. Hordijk, P.L., *et al.*, *Vascular-endothelial-cadherin modulates endothelial monolayer permeability*. J Cell Sci, 1999. 112(Pt 12): p. 1915-23.
58. Zhong, Y., W.M. Brieher, and B.M. Gumbiner, *Analysis of C-cadherin regulation during tissue morphogenesis with an activating antibody*. J Cell Biol, 1999. 144(2): p. 351-9.
59. Butz, S. and R. Kemler, *Distinct cadherin-catenin complexes in Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion*. FEBS Lett, 1994. 355(2): p. 195-200.
60. Nagafuchi, A., *Molecular architecture of adherens junctions*. Curr Opin Cell Biol, 2001. 13(5): p. 600-3.
61. Provost, E. and D.L. Rimm, *Controversies at the cytoplasmic face of the cadherin-based adhesion complex*. Curr Opin Cell Biol, 1999. 11(5): p. 567-72.
62. Novak, A. and S. Dedhar, *Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf*. Cell Mol Life Sci, 1999. 56(5-6): p. 523-37.
63. Eastman, Q. and R. Grosschedl, *Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals*. Curr Opin Cell Biol, 1999. 11(2): p. 233-40.
64. Navarro, P., *et al.*, *Catenin-dependent and -independent functions of vascular endothelial cadherin*. J Biol Chem, 1995. 270(52): p. 30965-72.
65. Lampugnani, M.G., *et al.*, *Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells*. J Cell Sci, 1997. 110(Pt 17): p. 2065-77.
66. Anastasiadis, P.Z. and A.B. Reynolds, *The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer*. J Cell Sci, 2000. 113(Pt 8): p. 1319-34.
67. Dejana, E., G. Bazzoni, and M.G. Lampugnani, *Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue?* Exp Cell Res, 1999. 252(1): p. 13-9.
68. Lampugnani, M.G., *et al.*, *The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin)*. J Cell Biol, 1995. 129(1): p. 203-17.
69. Lee, M.J., *et al.*, *Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate*. Cell, 1999. 99(3): p. 301-12.
70. Warren, S.L. and W.J. Nelson, *Nonmitogenic morphoregulatory action of pp60v-src on multicellular epithelial structures*. Mol Cell Biol, 1987. 7(4): p. 1326-37.
71. Volberg, T., *et al.*, *The effect of tyrosine-specific protein phosphorylation on the assembly of adherens-type junctions*. Embo J, 1992. 11(5): p. 1733-42.
72. Birchmeier, W. and J. Behrens, *Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness*. Biochim Biophys Acta, 1994. 1198(1): p. 11-26.
73. Daniel, J.M. and A.B. Reynolds, *Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function*. Bioessays, 1997. 19(10): p. 883-91.
74. Roura, S., *et al.*, *Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation*. J Biol Chem, 1999. 274(51): p. 36734-40.

75. Tsukita, S., A. Nagafuchi, and S. Yonemura, *Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions*. *Curr Opin Cell Biol*, 1992. 4(5): p. 834-9.
76. Matsuyoshi, N., *et al.*, *Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts*. *J Cell Biol*, 1992. 118(3): p. 703-14.
77. Hazan, R.B. and L. Norton, *The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton*. *J Biol Chem*, 1998. 273(15): p. 9078-84.
78. Hamaguchi, M., *et al.*, *p60v-src causes tyrosine phosphorylation and inactivation of the N-cadherin-catenin cell adhesion system*. *Embo J*, 1993. 12(1): p. 307-14.
79. Behrens, J., *et al.*, *Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene*. *J Cell Biol*, 1993. 120(3): p. 757-66.
80. Balsamo, J., *et al.*, *Regulated binding of PTP1B-like phosphatase to N-cadherin: control of cadherin-mediated adhesion by dephosphorylation of beta-catenin*. *J Cell Biol*, 1996. 134(3): p. 801-13.
81. Takeda, H., *et al.*, *V-src kinase shifts the cadherin-based cell adhesion from the strong to the weak state and beta catenin is not required for the shift*. *J Cell Biol*, 1995. 131(6 Pt 2): p. 1839-47.
82. Tsukita, S., *et al.*, *Submembranous junctional plaque proteins include potential tumor suppressor molecules*. *J Cell Biol*, 1993. 123(5): p. 1049-53.
83. Shibamoto, S., *et al.*, *Tyrosine phosphorylation of beta-catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells*. *Cell Adhes Commun*, 1994. 1(4): p. 295-305.
84. Downing, J.R. and A.B. Reynolds, *PDGF, CSF-1, and EGF induce tyrosine phosphorylation of p120, a pp60src transformation-associated substrate*. *Oncogene*, 1991. 6(4): p. 607-13.
85. Hoschuetzky, H., H. Aberle, and R. Kemler, *Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor*. *J Cell Biol*, 1994. 127(5): p. 1375-80.
86. El-Hariry, I., M. Pignatelli, and N.R. Lemoine, *FGF-1 and FGF-2 modulate the E-cadherin/catenin system in pancreatic adenocarcinoma cell lines*. *Br J Cancer*, 2001. 84(12): p. 1656-63.
87. Esser, S., *et al.*, *Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells*. *J Cell Sci*, 1998. 111(Pt 13): p. 1853-65.
88. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. *Nature*, 1997. 386(6626): p. 671-4.
89. Schlessinger, J., *Signal transduction by allosteric receptor oligomerization*. *Trends Biochem Sci*, 1988. 13(11): p. 443-7.
90. Van Vactor, D., A.M. O'Reilly, and B.G. Neel, *Genetic analysis of protein tyrosine phosphatases*. *Curr Opin Genet Dev*, 1998. 8(1): p. 112-26.
91. Pawson, T., G.D. Gish, and P. Nash, *SH2 domains, interaction modules and cellular wiring*. *Trends Cell Biol*, 2001. 11(12): p. 504-11.
92. Brady-Kalnay, S.M. and N.K. Tonks, *Protein tyrosine phosphatases as adhesion receptors*. *Curr Opin Cell Biol*, 1995. 7(5): p. 650-7.
93. Martin, G.S., *The hunting of the Src*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. 2(6): p. 467-75.

94. Su, J., M. Muranjan, and J. Sap, *Receptor protein tyrosine phosphatase alpha activates Src-family kinases and controls integrin-mediated responses in fibroblasts*. *Curr Biol*, 1999. 9(10): p. 505-11.
95. Fachinger, G., U. Deutsch, and W. Risau, *Functional interaction of vascular endothelial-protein-tyrosine phosphatase with the angiopoietin receptor Tie-2*. *Oncogene*, 1999. 18(43): p. 5948-53.
96. Weiss, A. and J. Schlessinger, *Switching signals on or off by receptor dimerization*. *Cell*, 1998. 94(3): p. 277-80.
97. Bixby, J.L., *Ligands and signaling through receptor-type tyrosine phosphatases*. *IUBMB Life*, 2001. 51(3): p. 157-63.
98. Walzel, H., et al., *Galectin-1, a natural ligand for the receptor-type protein tyrosine phosphatase CD45*. *Immunol Lett*, 1999. 67(3): p. 193-202.
99. O'Grady, P., T.C. Thai, and H. Saito, *The laminin-nidogen complex is a ligand for a specific splice isoform of the transmembrane protein tyrosine phosphatase LAR*. *J Cell Biol*, 1998. 141(7): p. 1675-84.
100. Meng, K., et al., *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 U S A*, 2000. 97(6): p. 2603-8.
101. Zeng, L., et al., *Protein tyrosine phosphatase alpha (PTPalpha) and contactin form a novel neuronal receptor complex linked to the intracellular tyrosine kinase fyn*. *J Cell Biol*, 1999. 147(4): p. 707-14.
102. Zondag, G.C., et al., *Homophilic interactions mediated by receptor tyrosine phosphatases mu and kappa. A critical role for the novel extracellular MAM domain [published erratum appears in J Biol Chem 1995 Oct 13;270(41):24621]*. *J Biol Chem*, 1995. 270(24): p. 14247-50.
103. Wang, J. and J.L. Bixby, *Receptor tyrosine phosphatase-delta is a homophilic, neurite-promoting cell adhesion molecular for CNS neurons*. *Mol Cell Neurosci*, 1999. 14(4-5): p. 370-84.
104. Brady-Kalnay, S.M., A.J. Flint, and N.K. Tonks, *Homophilic binding of PTP mu, a receptor-type protein tyrosine phosphatase, can mediate cell-cell aggregation*. *J Cell Biol*, 1993. 122(4): p. 961-72.
105. Gebbink, M.F., et al., *Cell-cell adhesion mediated by a receptor-like protein tyrosine phosphatase*. *J Biol Chem*, 1993. 268(22): p. 16101-4.
106. Sap, J., et al., *Receptor tyrosine phosphatase R-PTP-kappa mediates homophilic binding*. *Mol Cell Biol*, 1994. 14(1): p. 1-9.
107. Ukropec, J.A., et al., *SHP2 association with VE-cadherin complexes in human endothelial cells is regulated by thrombin*. *J Biol Chem*, 2000. 275(8): p. 5983-6.
108. Ukropec, J.A., M.K. Hollinger, and M.J. Woolkalis, *Regulation of VE-Cadherin Linkage to the Cytoskeleton in Endothelial Cells Exposed to Fluid Shear Stress*. *Exp Cell Res*, 2002. 273(2): p. 240-247.
109. Brady-Kalnay, S.M., et al., *Dynamic interaction of PTPmu with multiple cadherins in vivo*. *J Cell Biol*, 1998. 141(1): p. 287-96.
110. Balsamo, J., et al., *The nonreceptor protein tyrosine phosphatase PTP1B binds to the cytoplasmic domain of N-cadherin and regulates the cadherin-actin linkage*. *J Cell Biol*, 1998. 143(2): p. 523-32.
111. Fujita, Y., et al., *Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex*. *Nat Cell Biol*, 2002. 4(3): p. 222-31.
112. Kypta, R.M., H. Su, and L.F. Reichardt, *Association between a transmembrane protein tyrosine phosphatase and the cadherin-catenin complex*. *J Cell Biol*, 1996. 134(6): p. 1519-29.

113. Muller, T., *et al.*, *Phosphorylation and free pool of beta-catenin are regulated by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration.* J Biol Chem, 1999. 274(15): p. 10173-83.
114. Fuchs, M., *et al.*, *Association of human protein-tyrosine phosphatase kappa with members of the armadillo family.* J Biol Chem, 1996. 271(28): p. 16712-9.
115. Bianchi, C., *et al.*, *Receptor-type protein-tyrosine phosphatase mu is expressed in specific vascular endothelial beds in vivo.* Exp Cell Res, 1999. 248(1): p. 329-38.
116. Hellberg, C.B., *et al.*, *Expression of the receptor protein tyrosine phosphatase, PTPmu, restores E-cadherin-dependent adhesion in human prostate carcinoma cells.* J Biol Chem, 2002. 18: p. 18.
117. Burden-Gulley, S.M. and S.M. Brady-Kalnay, *PTPmu regulates N-cadherin-dependent neurite outgrowth.* J Cell Biol, 1999. 144(6): p. 1323-36.
118. Zondag, G.C., A.B. Reynolds, and W.H. Moolenaar, *Receptor protein-tyrosine phosphatase RPTPmu binds to and dephosphorylates the catenin p120(ctn).* J Biol Chem, 2000. 275(15): p. 11264-9.
119. Bebbington, C.R. and C.C.G. Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells.*, in *DNA cloning: A practical approach*, D.M. Glover, Editor. 1987, IRL Press: Oxford. p. 163-188.
120. Bebbington, C.R., *Expression of antibody genes in nonlymphoid mammalian cells.* Methods: A companion to methods in Enzymology, 1991. 2: p. 136-145.
121. Millauer, B., *et al.*, *High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis.* Cell, 1993. 72(6): p. 835-46.
122. Wong, C.W., *et al.*, *PECAM-1/CD31 trans-homophilic binding at the intercellular junctions is independent of its cytoplasmic domain; evidence for heterophilic interaction with integrin alphavbeta3 in Cis.* Mol Biol Cell, 2000. 11(9): p. 3109-21.
123. Martin-Padura, I., *et al.*, *Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration.* J Cell Biol, 1998. 142(1): p. 117-27.
124. Herrenknecht, K., *et al.*, *The uvomorulin-anchorage protein alpha catenin is a vinculin homologue.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(20): p. 9156-60.
125. Graham, F.L., *et al.*, *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.* J Gen Virol, 1977. 36(1): p. 59-74.
126. Golenhofen, N., *et al.*, *Expression and induction of the stress protein alpha-B-crystallin in vascular endothelial cells.* Histochem Cell Biol, 2002. 117(3): p. 203-9.
127. Gluzman, Y., *SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants.* Cell, 1981. 23(1): p. 175-82.
128. Stanley, P., V. Caillibot, and L. Siminovitch, *Selection and characterization of eight phenotypically distinct lines of lectin-resistant Chinese hamster ovary cell.* Cell, 1975. 6(2): p. 121-8.
129. Flint, A.J., *et al.*, *Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(5): p. 1680-5.

130. Newman, P.J., *The biology of PECAM-1*. J Clin Invest, 1997. 100(11 Suppl): p. S25-9.
131. Feiken, E., et al., *Intramolecular interactions between the juxtamembrane domain and phosphatase domains of receptor protein-tyrosine phosphatase RPTPmu. Regulation of catalytic activity*. J Biol Chem, 2000. 275(20): p. 15350-6.
132. Vestweber, D. and R. Kemler, *Identification of a putative cell adhesion domain of uvomorulin*. Embo J, 1985. 4(13A): p. 3393-8.
133. Suda, T., N. Takakura, and Y. Oike, *Hematopoiesis and angiogenesis*. Int J Hematol, 2000. 71(2): p. 99-107.
134. Takeichi, M., *Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion*. Annu Rev Biochem, 1990. 59: p. 237-52.
135. Tsukita, S., et al., *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, 1991. 113(4): p. 867-79.
136. Brady-Kalnay, S.M., D.L. Rimm, and N.K. Tonks, *Receptor protein tyrosine phosphatase PTPmu associates with cadherins and catenins in vivo*. J Cell Biol, 1995. 130(4): p. 977-86.
137. Cepek, K.L., et al., *Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin*. Nature, 1994. 372(6502): p. 190-3.
138. Bach, T.L., et al., *Endothelial cell VE-cadherin functions as a receptor for the beta15-42 sequence of fibrin*. J Biol Chem, 1998. 273(46): p. 30719-28.
139. Karecla, P.I., et al., *Identification of a binding site for integrin alphaEbeta7 in the N-terminal domain of E-cadherin*. J Biol Chem, 1996. 271(48): p. 30909-15.
140. Martinez, J., et al., *Interaction of fibrin with VE-cadherin*. Ann N Y Acad Sci, 2001. 936: p. 386-405.
141. Bach, T.L., et al., *VE-Cadherin mediates endothelial cell capillary tube formation in fibrin and collagen gels*. Exp Cell Res, 1998. 238(2): p. 324-34.
142. Gumbiner, B.M., *Regulation of cadherin adhesive activity*. J Cell Biol, 2000. 148(3): p. 399-404.
143. Keilhack, H., et al., *The protein-tyrosine phosphatase SHP-1 binds to and dephosphorylates p120 catenin*. J Biol Chem, 2000. 275(34): p. 26376-84.
144. Rhee, J., J. Lilien, and J. Balsamo, *Essential tyrosine residues for interaction of the non-receptor protein-tyrosine phosphatase PTP1B with N-cadherin*. J Biol Chem, 2001. 276(9): p. 6640-4.
145. Caveda, L., et al., *Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin)*. J Clin Invest, 1996. 98(4): p. 886-93.
146. Mourton, T., et al., *The PTPmu protein tyrosine phosphatase binds and recruits the scaffolding protein RACK1 to cell-cell contacts*. J Biol Chem, 2001. 13: p. 13.
147. Osawa, M., et al., *Tyrosine phosphorylation of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in mechanically stimulated vascular endothelial cells*. Eur J Cell Biol, 1997. 72(3): p. 229-37.
148. Petzelbauer, P., T. Halama, and M. Groger, *Endothelial adherens junctions*. J Invest Dermatol Symp Proc, 2000. 5(1): p. 10-3.

## 7. Anhang

### 7.1. Anlage 1

#### Nukleotidsequenz von VE-PTP.

Start- und Stop- Codon des kodierenden ORF sind blau umrandet.

```

1  GGCACGAGGG  CGGCTGCCAC  GGCCCTTGAG  CATCGCCAGC  CCCGAGGGTA  GCGCGCTGCG
60  CCCGCCCGCA  GGGCGCGCTG  AGCGCTCAAC  AAGTGGTACC  CAGAAGTGCC  CTGGCTGGCC
120  TCCCAGCGAG  ATCCTGAGGC  ATGGAGCCCT  AACGGCCTTG  TGGATAACAC  TGAGCGTCGT
180  GCAGACTGGA  GTGGCAGAGC  AAGTGAAATG  TAACTTCACA  CTGTTGGAGT  CCAGGGTCTC
240  TAGCTTGTCA  GCGTCTATCC  AGTGGAGGAC  TTTTCGCGTCA  CCCTGTAACT  TTAGCCTCAT
300  CTACAGCAGT  GATACCTCGG  GGCCCATGTG  GTGCCATCCT  ATTCGGATAG  ACAACTTTAC
360  CTACGGATGT  AACCCCAAGG  ATTTACAAGC  AGGGACCGTC  TATAACTTCA  GGATTGTTTC
420  TCTGGATGGA  GAAGAGAGCA  CTCTGGTCTT  ACAGACAGAT  CCGTTGCCTC  CTGCCAGGTT
480  TGAAGTCAAT  CGGGAGAAAA  CAGCATCAAC  CACCCTGCAG  GTCCGGTGGA  CTCCCTCTTC
540  TGGAAAAGTC  TCCTGGTATG  AGGTGCAATT  ATTTGATCAT  AACAATCAAA  AGATACAAGA
600  AGTCCAAGTT  CAAGAAAGTA  CCACCTGGAG  CCAATATACT  TTTCTGAACC  TCACTGAGGG
660  TAACAGTTAC  AAAGTTGCCA  TCACAGCTGT  TTCGGGAGAA  AAGCGTCTCT  TTCCGGTGTA
720  TATCAATGGC  TCTACAGTAC  CATCTCCAGT  GAAAGATCTT  GGCATTTCCC  CCAATCCTAA
780  TTCTCTCCTA  ATTTCTGGT  CTCGTGGTTC  TGGGAATGTG  GAACAATACA  GGCTGGTGCT
840  AATGGATAAA  GGGGCCATCG  TTCAAGACAC  AAACGTGGAC  AGGCGTGATA  CTTCTTATGC
900  TTTTCACGAG  CTGACCCCTG  GCCACCTCTA  CAACCTCACT  ATTGTCACCA  TGGCCTCGGG
960  ACTGCAAAAC  TCCAGGTGGA  AACTGGTGAG  GACCGCTCCC  ATGGAAGTCT  CAAATCTGAA
1020  GGTGACAAAT  GACGGGAGGT  TGACCTCTCT  AAATGTGAAG  TGGCAGAAAC  CCCCTGGGGA
1080  TGTAGATTCC  TACAGCATT  CCCTGTCTCA  CCAAGGGACC  ATCAAAGAAT  CCAAAACATT
1140  AGCACCTCCT  GTTACTGAAA  CTCAATTTAA  GGACTTAGTC  CCTGGACGGC  TTTACCAAGT
1200  GACCATCAGC  TGCATCTCTG  GTGAGCTCTC  TGCTGAGAAG  TCAGCAGCGG  GGAGAACAGT
1260  TCCAGAAAAA  GTGAGGAATC  TGGTTTCCTA  CAACGAGATT  TGGATGAAGT  CCTTTACAGT
1320  GAACTGGACG  CCCCCTGCTG  GAGATTGGGA  GCATTATCGT  ATCGTGCTCT  TCAATGAATC
1380  CTTGGTCTTG  CTCAACACCA  CAGTGGGAAA  GGAAGAAACG  CACTATGCCT  TGGATGGCTT
1440  GGAGCTCATA  CCAGGAAGAC  AGTATGAGAT  AGAAGTCATT  GTTGAAGAGC  GAAATCTGCG
1500  GAATTCGGAG  CGCTGTCAAG  GCAGGACAGT  ACCCCTGGCT  GTCCCTCAGC  TTCGCGTCAA
1560  ACACGCTAAC  GAAACTTCAC  TGGGCATCAC  GTGGCGGGCC  CCTCTAGGCG  AATGGGAGAA
1620  ATACATCATT  TCGTTGATGG  ACAGAGAGCT  CTTGGTCATC  CACAAGTCAC  TCTCAAAGA
1680  TGCCAAAGAA  TTCACTTTTA  CAGACCTGAT  GCCTGGACGG  AATTACAAGG  CTAAGTGCAC
1740  TAGCATGAGT  GGAGATTTAA  AACAGTCATC  TTCAATCAAA  GGAAGAACAG  TGCCCTGCCA
1800  GGTGACTGAC  CTGCACGTCA  ACAACCAAGG  GATGACCAGT  AGTCTGTTCA  ATGACTGGAC
1860  AAAGGCACTG  GGAGATGTAG  AGTTCTACCA  AGTTTTACTG  ATCCATGAAA  ATGTGGTTGT
1920  CAAGAACGAG  AGTGTTTCCA  GTGATACCAG  CAGATACAGC  TTCCGCGCCC  TGAAACCCGG
1980  CAGCCTCTAC  TCCGTGGTGG  TGACCACGGT  GAGTGGAGGG  ATCTCCTCCC  GGCAGGTGGT
2040  GCGGGAAGGA  AGAACAGTCC  CGTCCAGCGT  GAGTGGGGTG  ACAGTCAACA  ATTCTGGCCG
2100  GAATGACTAC  CTCAGCGTTT  CCTGGCTGCC  GGCGCCTGGA  GAAGTGGATC  ACTACGTGGT
2160  GAGCCTCTCC  CACGAGGGCA  AGGTGGATCA  GTTCCTCATC  ATCGCCAAAT  CTGTACGCGA
2220  GTGTTCCCTC  AGCTCCCTCA  CCCCAGGCGG  CCTCTACAAC  GTCAGTGTAA  CCACCAAGAG
2280  CGGCAATTAT  GCAAGCCACT  CTTTACCCTG  GGAACGGACA  GTGCCAGACA  AGGTCCAGGG
2340  AATCAGTGTT  AGCAACTCTG  CCAGAAGCGA  CTAAGTAAAG  GTGTCCTGGG  TGCATGCCAC
2400  TGGAGACTTT  GACCACTATG  AAGTCACCAT  CAAAAACAGA  GAAAGCTTCA  TTCAAACCAA
2460  AACCATCCCC  AAGTCAGAAA  ATGAGTGTGA  ATTTATTGAG  CTGGTTCTCT  GACGCTGTGA
2520  CAGCGTCACT  GTCAGTACAA  AGAGTGGACA  ATATGAAGCC  AGTGAACAGG  GGACAGGGAG
2580  AACGATCCCA  GAGCCTGTGA  AGGATCTCAC  CCTTCTCAAC  AGGAGTACGG  AGGATCTCCA
2640  TGTGACTTGG  TCAAGAGCCA  ATGGGGATGT  TGATCAGTAC  GAGGTCCAGC  TGCTCTTCAA
2700  CGACATGAAA  GTCTTCCCTC  ATATTCACCT  TGTGAACACA  GCAACTGAGT  ATAAGTTCAC
2760  GCGCTCACG  CCGGGGCGCC  ATTACAAAAT  CCTCGTCTCT  ACCATCAGTG  GCGATGTCCA
2820  GCAGTCAGCC  TTCATTGAAG  GCCTCCAGT  TCCCAGCACT  GTCAAAAACA  TTCACATTTT
2880  TGCCAATGGA  GCCACGGATA  GGCTGATGGT  AACCTGGAGC  CCTGGTGGCG  GGGATGTGGA

```

2940 CTCCTATGTG GTGTCTGCAT TCAGACAGGA CGAGAAGGTT GACTCTCAGA CCATTCCCAA  
3000 GCATGCCTCG GAGCACACGT TCCACAGGCT GGAGGCCGGA GCCAAGTACA GGATCGCCAT  
3060 TGTTTCTGTC AGTGGGTCCC TGAGAAACCA GATAGATGCG CTCGGACAGA CAGTCCCAGC  
3120 GTCTGTCCAG GGAGTCGTCG CAGCCAATGC ATACAGCAGT AATTCCTTAA CAGTAAGTTG  
3180 GCAGAAAGCC CTTGGTGTGG CAGAAAGATA CGATATCCTG CTTCTAAACG AGAATGGGCT  
3240 TCTTTTGAGC AACGTGTCAG AGCCAGCTAC GGCAAGACAG CACAAATTTG AAGATCTAAC  
3300 GCCAGGCAAG AAATACAAGA TGCAGATCCT GACTGTCAGC GGAGGCCTCT TCAGTAAAGA  
3360 ATCTCAGGCT GAAGGCCGAA CAGTCCCAGC AGCTGTCACC AATCTGAGGA TCACAGAGAA  
3420 CTCCAGTAGA TACCTGTCCT TCGGCTGGAC CGCCTCGGAG GGTGAACCTCA GCTGGTACAA  
3480 CATCTTCCTC TACAACCCAG ACAGGACTCT TCAGGAGCGA GCTCAAGTTG ACCCGCTAGT  
3540 CCAGAGCTTC TCTTTCCAGA ACTTGCTACA AGGCAGAATG TACAAGATGG TGATTGTAC  
3600 TCACAGTGGG GAGCTGTCCA ATGAGTCATT TATATTCGGC AGAACAGTTC CTGCTGCCGT  
3660 GAACCATCTC AAAGGCTCCC ATCGGAACAC GACAGACAGC CTGTGGTTCA GCTGGAGCCC  
3720 AGCCTCCGGG GACTTTGACT TCTATGAGCT GATTCTTTAC AATCCCAACG GCACGAAGAA  
3780 GGAGAATGG AAAGAAAAGG ACGTGACAGA GTGGCGTTTC CAAGGTCTTG TTCCTGGAAG  
3840 GAAATACACC CTGTATGTGG TGACTCACAG TGGGGACCTC AGCAATAAAG TCACAGGGGA  
3900 GGGCAGAACA GCCCCAAGTC CTCGAGTCT TTTGTCATTC GCTGATGTTG CAAACACCTC  
3960 CTTGGCTATC ACCTGGAAGG GACCCCCAGA CTGGACAGAT TACAATGACT TTGAGCTGCA  
4020 GTGGTTCCCT GGAGATGCAC TTACCATCTT CAACCCCTAC AGCAGCAGAA AGTCAGAAGG  
4080 ACGCATTTGTG TACGGGCTTC ACCCAGGGAG GTCCTATCAA TTCAGTGTCA AGACTGTGAG  
4140 CGGGGACTCC TGGAAAACCT ACAGCAAACC AATTTCTGGG TCTGTGAGGA CAAAGCCAGA  
4200 CAAGATACAA AACCTGCATT GCCGCCCCA GAACTCCACG GCCATTGCCT GCTCTTGAT  
4260 ACCTCCTGAC TCCGACTTTG ATGGCTACAG CATTGAGTGC CGAAAAATGG ATACCAAGA  
4320 AATCGAGTTT TCCAGAAAGC TGGAGAAAGA AAAATCACTG CTCAACATCA TGATGTTAGT  
4380 ACCTCATAAG AGGTACCTGG TGTCCATCAA GGTGCAGTCG GCCGGCATGA CCAGTGAGGT  
4440 GGTGAAGAT AGCACCATCA CCATGATAGA CCGCCCGCCT CAACCGCCTC CACACATCCG  
4500 TGTGAATGAA AAGGATGTGC TAATCAGCAA ATCTTCCATC AACTTTACTG TCAACTGCAG  
4560 CTGGTTCAGC GACACCAACG GAGCGGTTAA ATACTTTGCT GTGGTGGTGA GAGAGGCCGA  
4620 CAGCATGGAT GAGTTGAAGC CAGAACAGCA GCACCCTCTC CCTTCCTACC TGGAGTACAG  
4680 ACACAACGCC TCCATCCGAG TCTACCAGAC CAATTATTTT GCCAGCAAT GTGCTGAAAG  
4740 TCCCGACAGC AGTTCTAAAA GTTTCAACAT TAAGCTTGGG GCAGAGATGG ACAGCCTCGG  
4800 TGGCAAATGT GATCCCAGTC AGCAAAATTT CTGTGATGGA CCGCTGAAGC CACACACCGC  
4860 CTACAGAAATC AGCATCCGGG CTTTTACACA GATATTTGAC TATATTTGAC GAGGACTTGA AAGACTTCA  
4920 CAAACCTCTC TACTCGGATA CGTTCTTCTC TATGCCATC ACCACAGAGT CAGAGCCCTT  
4980 GTTTGGAGTT ATTGAAGGTG TGAGTGCTGG CCTGTTTCTA ATTGGCATGC TGGTGGCCCT  
5040 TGTTGCCTTC TTCATCTGCA GACAGAAAGC TAGCCACAGC AGGGAAAAGC CATCTGCCCG  
5100 GCTCAGCATT CGTAGGGACC GGCCTTTGTC TGTCCATCTG AATCTGGGCC AGAAAGGCAA  
5160 CCGGAAAAC TCTTGCCCCA TAAAGATCAA TCAGTTTGAA GGGCATTTC TGAAGCTGCA  
5220 GGCAGACTCC AACTACCTTC TATCCAAGGA ATATGAGGAC TTAAAAGACG TGGGTAGAAG  
5280 CCAGTCATGT GACATTGCCC TCTTGCCCTGA GAATCGAGGG AAAAATCGAT ACAACAACAT  
5340 ATTGCCTTAT GATGCCTCAA GAGTGAAGCT CTCGAATGTC GATGACGACC CTTGCTCTGA  
5400 CTACATCAAC GCCAGCTACA TCCCCGGTAA CAACTTCAGA CGAGAATACA TCGCCACTCA  
5460 GGGACCGCTT CCAGGCACCA AGGATGACTT CTGGAAGATG GCGTGGGAGC AGAACGTTCA  
5520 CAACATCGTC ATGGTGACCC AGTGTGTTGA AAAGGGCCGA GTGAAGTGTG ACCATTACTG  
5580 GCCAGCAGAC CAGGACCCCT TCTACTACGG TGATCTCATC CTACAGATGG TCTCGGAGTC  
5640 CGTGCTCCCC GAGTGGACCA TCAGGGAGTT TAAGATATGC AGTGAAGAAC AGTTGGATGC  
5700 ACACAGACTC ATCCGTCACT TTTACTACAC GGTGTGGCCA GACCATGGGG TCCCAGAGAC  
5760 CACCCAGTCC CTGATCCAAT TTGTGAGGAC AGTCAGGGAC TACATCAACA GAAGCCCCGG  
5820 GGCTGGGCCC ACCGTAGTGC ACTGCAGCGC TGGTGTGGGC AGAACAGGGA CGTTCGTTGC  
5880 CCTGGACCGG ATCCTCCAGC AGTTGGACTC TAAGGACTCC TAAGGACTCC ATGGGGCAGT  
5940 GCATGACCTA AGACTCCACA GGGTTCACAT GGTCCAGACC GAGTGTCAAT ATGTGTATCT  
6000 GCATCAGTGT GTAAGAGACG TCCTCAGAGC AAAGAAACTG CGGAACGAGC AAGAGAACCC  
6060 CCTGTTTCCG ATTTATGAGA ATGTGAATCC AGAGTATCAC AGAGATGCAA TCTACTCGAG  
6120 ACATTAAGAA TTCACCTGAA GATCCCCTGG AATAAAGCGT TTCACTGTGT GACTTTAAAA  
6180 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA



## 7.2. Anlage 2

### Abgeleitete Aminosäuresequenz von VE-PTP

1     MLRHGALTAL WITLSVVQTG VAEQVKCNFT  $\mapsto$  D1     LLESRVSSLS ASIQRWTFAS PCNFSLIYSS DTSGPMWCHP IRIDNFTYGC  
 81     NPKDLQAGTV YNFRIVSLDG EESTLVLQTD  $\mapsto$  D2     PLPPARFEVN REKTASTTLQ VRWTPSSGKV SWYEVQLFDH NNQKIQEVQV  
 161    QESTTWSQYT FLNLTEGNSY KVAITAVSGE KRSFPVYING  $\mapsto$  D3     STVSPVKDL GISPNPNSLL ISWSRGSNGV EQYRLVLMDK  
 241    GAIVQDTNVD RRDTSYAFHE LTPGHLYNLT IVTMASGLQN SRWKLVRTAP  $\mapsto$  D4     MEVSNLKVTN DGRLTSLNVK WQKPPGDVDS  
 321    YSITLSHQGT IKESKTLAPP VTETQFKDLV PGRLYQVTIS  $\mapsto$  D5     CISGELSAEK SAAGRTVPEK VRNLVSYNEI WMKSFTVNWT  
 401    PPAGDWEHYR IVLFNESLVL LNTTVGKEET HYALDGLELI PGRQYEIEVI  $\mapsto$  D6     VESGNLRNSE RCQGRTPVLA VLQLRVKHAN  
 481    ETSLGITWRA PLGEWEKYII SLMDRELLVI HKSLSKDAKE  $\mapsto$  D7     FTFTDLMPGR NYKATVTSMS GDLKQSSSIK GRTVPAQVTD  
 561    LHVNNQGMTS SLFTNWTKAL GDVEFYQVLL IHENVVVKNE SVSSDTSRYS  $\mapsto$  D8     FRALKPGSLY SVVVTTVSGG ISSRQVVAEG  
 641    RTVPSSVSGV TVNNSGRNDY LSVSWLPAPG EVDHYVVVLS  $\mapsto$  D9     HEGKVDQFLI IAKSVSECSF SSLTPGRLYN VTVTTKSGNY  
 721    ASHSFTEERT VPKVQGISV SNSARSDYLK  $\mapsto$  D10     VSWHATGDF DHYEVTIKNR ESFIQTKTIP KSENECEFIE LVPGRLYSVT  
 801    VSTKSGQYEA SEQGTGRTIP EPVKDLTLLN  $\mapsto$  D11     RSTEDLHVTW SRANGDVDQY EVQLLFNDMK VFPHIHLVNT ATEYKFTALT  
 881    PGRHYKILVL TISGDVQOSA FIEGLPVPST  $\mapsto$  D12     VKNIHISANG ATDRLMVTWS PGGGDVDSYV VSAFRQDEKV DSQTIPKHAS  
 961    EHTFHRLEAG AKYRIAIVSV SGSLRNQIDA LGQTVPASVQ  $\mapsto$  D13     GVVAANAYSS NSLTVSWQKA LGVAERYDIL LLNENGLLLS  
 1041  NVSEPTARQ HKFEDLTPGK KYKMQILTVS  $\mapsto$  D14     GGLFSKESQA EGRTVPAAVT NLRITENSSR YLSFGWTASE GELSWYNIFL  
 1121  YNPDRTLQER AQVDPLVQSF SFQNLQGRM  $\mapsto$  D15     YKMVIVTHSG ELSNESFIFG RTVPAAVNHL KGSHRNTTDS LWFWSWPASG  
 1201  DFDFYELILY NPNGTCKENW KEKDVTWRF  $\mapsto$  D16     QGLVPGRKYT LYVVTHSGDL SNKVTGEGRT APSPPSLLSF ADVANTSLAI  
 1281  TWKGPPDWD YNDFELQWFP GDALTIFNPY  $\mapsto$  D17     SSRKSEGRIV YGLHPGRSYQ FSVKTVSGDS WKTYSKPISG SVRTKPKIQ  
 1361  NLHCRPQNST AIACSWIPPD SDFDGYSIEC  $\mapsto$  D17     RKMDTQEIEF SRKLEKEKSL LNIMMLVPHK RYLVSIVQVS AGMTSEVVED  
 1441  STITMIDRPP QPPPHIRVNE KDVLSKSSI  $\mapsto$  D17     NFTVNCWFWS DTNGAVKYFA VVVREADSMD ELKPEQQHPL PSYLEYRHNA  
 1521  SIRVYQTNFY ASKCAESPDS SSKSFNIKLG  $\mapsto$  D17     AEMDSLGGKC DPSQQKFCDG PLKPHTAYRI SIRAFQTQFD EDLKEFTKPL  
 1601  YSDTFFSMPI TTESEPLFGV IEGVSAGLFL IGMLVALVAF FICRQKASHS  $\mapsto$  D17     RERPSARLSI RDRRPLSVHL NLGQKGNRKT  
 1681  SCPIKINQFE GHFMKLQADS NYLLSKEYED LKDVGSRQSC DIALLPENRG KNRYNNILPY DASRVKLSNV DDDPCSDYIN  
 1761  ASYIPGNFR REYIATQGPL PGTKDDFWKM AWEQNVHNIV MVTQCVEKGR VKCDHYWPAD QDPLYYGDLI LQMVSESVLP  
 1841  EWTIREFKIC SEEQLDAHRL IRHFHYTVWP DHGVPETTQS LIQFVRTVRD YINRSPGAGP TVVHCSAGVG RTGTFVALDR  
 1921  LLQQLDSKDS VDIYGAVHDL RLHRVHMVQT ECQYVYLHQC VRDVLRAKKL RNEQENPLFP IYENVNPEYH RDAIYSRH

Dick unterstrichen sind das Signalpeptid und die Transmembrandomäne. Der Beginn jeder Fibronectin III Domäne vom Typ III ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Protein Tyrosin Phosphatase Domäne ist dünn unterstrichen.

### 7.3. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	"American Type Culture Collection"
Blot	Immunblot
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
C-	Carboxy
cDNA	komplementäre DNA
D	Dalton
dATP	2`-Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	2`-Desoxycytidintriphosphat
dGTP	2`-Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2`-Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Guanin
h	Stunde
IgG	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
kDa	Kilodalton
M	Molarität
min	Minuten
MW	Molekulargewicht
N-	Amino
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
U	unit
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Volumenprozente
w/v	Gewichtsprozente

## 7.4. Lebenslauf

### Roman Nawroth

geboren am 02.05.1972 in Herford

Familienstand:  
verheiratet

Name des Vaters:  
Peter Nawroth

Name der Mutter:  
Marisa Nawroth, geb. Cerasuolo

**Schulbildung:** Grundschule: von 1978 bis 1982  
Widukind-Gymnasium Enger: von 1982 bis 1991

**Hochschulreife:** 29.05.1991 in Enger

**Militärdienst:** 1991-1992

**Studium:** Biologie (Diplom) an der Universität Bielefeld von 1992-1998

**Promotionsstudiengang:** Biologie  
WS 98/99 - heute: an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

**Prüfungen:** Diplom im Fach Biologie am 31.03.1998

**Tätigkeiten:** Juni 1996, September 96 - Dezember 97: Tätigkeit als studentische Hilfskraft and der Universität Bielefeld

15.4.1998 - 31.12.1999: Tätigkeit als Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Westfälischen Wilhelms-Universität

01.01.2000 - heute: Tätigkeit als Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Physiologische und klinische Forschung, Bad-Nauheim

**Beginn der Dissertation:** April 1998 am ZMBE, Institut für Zellbiologie bei Prof. Dr. Dietmar Vestweber

## 7.5. Danksagung

Für die Vertretung der hier vorliegenden Arbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster danke ich Herrn Prof. Dr. Volker Gerke und Herrn Prof. Dr. Dietmar Vestweber.

Herrn Prof. Dr. Dietmar Vestweber möchte ich für die Bereitstellung einer interessanten Arbeit, den optimalen Arbeitsmöglichkeiten und den fachlich sehr lehrreichen Gesprächen während dieser Promotion danken.

Dr. Urban Deutsch danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und für die netten Aufenthalte in Bad Nauheim. Silvia Hennig möchte ich für ihre Express-Klonierungen verschiedener Konstrukte danken.

Mein Dank geht an Dr. Klaus Ebnet, der immer gute Ratschläge auf meine Fragen hatte und mir mit seinen exzellenten Vorträgen ein Vorbild war.

Dr. Stefan Butz möchte ich für drei spannende Jahre danken, in denen ich immer wieder aufregendes aus der Welt der Proteinbiochemie lernen durfte und in denen er mir bei vielen wissenschaftlichen Problemen immer sehr kompetent zur Seite gestanden hat. Ferner möchte ich ihm danken, daß er sich durch meine Arbeit gequält hat und ich nie Angst hatte am Sonntag meinen Kuchen alleine im Labor essen zu müssen.

Danken möchte ich auch dem ehemaligen Kollegen Dr. Gunter Pendl für die interessanten Gespräche über die neuere und meist ältere Geschichte Deutschlands und sein gelebtes Vorbild, auch während langer Durststrecken nicht zu verzweifeln.

Mein Dank für eine gute Zusammenarbeit gilt den Kollegen Dr. Ulrike Samulowitz, Gregor Poell und Alexander Ranft, sowie den Mitgliedern des gesamten Arbeitskreises des Instituts für Zellbiologie. Ohne die gute Atmosphäre im Labor und die Hilfe bei Problemen, wäre diese Arbeit sehr viel schwieriger gewesen. Danke auch an Renate Thanos und Sibylle Witt für die

technische Unterstützung in der Zellkultur und im Labor und Annette Wintgens für die Hilfe bei allen Verwaltungsangelegenheiten. Danke auch an Heinz Kleff, ohne den so manches Paket wahrscheinlich nie angekommen wäre.

Mein besonderer Dank geht an meine Eltern, ohne deren aufmerksame Begleitung meiner Ausbildung vieles nicht in dieser Form realisierbar gewesen wäre.

Ein ganz lieber Dank gilt meiner Frau Silvia, die mich während der gesamten Zeit meiner Promotion in jeder Phase unterstützt hat.