

Biologie

**Die Funktion der Vaskulären Endothelialen  
Protein-Tyrosin Phosphatase VE-PTP  
bei der Regulierung von  
interendothelialen Zell-Zellkontakten**

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

vorgelegt von  
Alexander-Christian Gamp  
aus Heidelberg

- 2004 -

**Dekan:** Prof. Dr. Alexander Steinbüchel  
**Erster Gutachter:** Prof. Dr. Dietmar Vestweber  
**Zweiter Gutachter:** Prof. Dr. Volker Gerke

**Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2005**  
**Tag der Promotion: 04.02.2005**



# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>2</b>
1.1 ENDOTHELIALE ZELL-ZELLKONTAKTE .....	2
1.1.1 <i>Tight Junctions</i> .....	3
1.1.2 <i>Desmosomen und Complexus Adhaerentes</i> .....	6
1.1.3 <i>GAP-Junctions</i> .....	6
1.1.4 <i>Adherens Junctions</i> .....	6
1.1.4.1 <i>Der Cadherin-Catenin Komplex</i> .....	6
1.1.4.2 <i>Der Nectin-Afadin Komplex</i> .....	9
1.1.5 <i>Zelladhäsionsmoleküle ohne strukturelle Einteilung in Junctions</i> .....	9
1.2 DIE BETEILIGUNG DER ADHERENS JUNCTION AN SIGNALPROZESSEN .....	10
1.2.1 <i>Signalisierung durch die Catenine</i> .....	10
1.2.2 <i>Signalisierung unter Beteiligung von VE-Cadherin</i> .....	12
1.3 PROTEIN-TYROSIN PHOSPHATASEN .....	14
1.3.1 <i>Die PTP-Familie</i> .....	15
1.3.1.1 <i>Nicht-Rezeptor PTPs</i> .....	16
1.3.1.2 <i>Rezeptor PTPs</i> .....	18
1.3.2 <i>Die Bedeutung von Phosphatasen für den Zellkontakt</i> .....	19
1.3.3 <i>Die Vaskuläre Endotheliale Protein-Tyrosin Phosphatase</i> .....	21
1.4 DIE ADHERENS JUNCTION UND VASKULÄRE PERMEABILITÄT .....	22
1.4.1 <i>Tyrosin Phosphorylierung</i> .....	23
1.4.2 <i>Assoziation mit dem Cytoskelett</i> .....	25
1.5 TRANSENDOTHELIALE MIGRATION VON LEUKOZYTEN .....	26
1.5.1 <i>Die Leukozyten-Adhäsionskaskade</i> .....	26
1.5.2 <i>Der parazelluläre Weg durch den Zellkontakt</i> .....	28
1.6 ICAM-1 SIGNALWEGE .....	30
1.6.1 <i>Der Rho-Signalweg</i> .....	31
1.6.2 <i>Signalisierung durch PKC und p60<sup>src</sup></i> .....	31
1.7 ZIELSETZUNG DER DISSERTATION .....	33
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>34</b>
2.1 MATERIAL .....	34
2.1.1 <i>Allgemeine Chemikalien und Reagenzien</i> .....	34
2.1.2 <i>Spezielle Chemikalien, Reagenzien und Kits</i> .....	35
2.1.3 <i>Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur</i> .....	36
2.1.4 <i>Kommerzielle Medien und Puffer für die Zellkultur</i> .....	37
2.1.5 <i>Häufig verwendete Puffer und Stammlösungen</i> .....	37
2.1.6 <i>Spezielle Geräte</i> .....	38
2.1.7 <i>Antikörper</i> .....	39
2.1.7.1 <i>Primäre Antikörper</i> .....	39
2.1.7.2 <i>Sekundäre Antikörper</i> .....	39
2.1.8. <i>Enzyme</i> .....	39
2.1.9 <i>Verwendete Zelllinien</i> .....	40
2.1.10 <i>Verwendete Vektoren und DNA-Konstrukte</i> .....	40
2.2 METHODEN .....	41
2.2.1 <i>Molekularbiologische Methoden</i> .....	41
2.2.1.1 <i>Aufzucht und Lagerung von E.coli</i> .....	41
2.2.1.2 <i>Fällung von DNA</i> .....	41
2.2.1.3 <i>Isolierung von Plasmid-DNA</i> .....	41
2.2.1.4 <i>Sequenzierung von DNA</i> .....	41
2.2.1.5 <i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen</i> .....	42
2.2.1.6 <i>Elektrophorese von DNA in Agarosegelen</i> .....	43
2.2.1.7 <i>Isolierung von RNA aus Organen oder Zellen (Qiagen RNEasy Kit)</i> .....	43
2.2.1.8 <i>Herstellung von cDNA-Pools durch Reverse Transkription von Maus RNA</i> .....	44
2.2.1.9 <i>Restriktion von DNA</i> .....	45
2.2.1.10 <i>Dephosphorylierung / Kinasierung von DNA</i> .....	45
2.2.1.11 <i>Klonierung von GPP130 aus Maus cDNA-Pools</i> .....	45

2.2.1.12 Klonierung einer DC-SIGN R1 - GPP130 Chimäre.....	47
2.2.2 <i>Biochemische Methoden</i> .....	49
2.2.2.1 Herstellung von Gewebehomogenaten .....	49
2.2.2.2 Proteinbestimmung im Mikroansatz mit dem "Pierce BCA Protein Assay Reagent" .....	50
2.2.2.3 SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) zur Auftrennung von Proteinen .....	50
2.2.2.4 Coomassie - Färbung von SDS - Gelen .....	52
2.2.2.5 Silberfärbung von Proteinen im SDS Gel .....	52
2.2.2.6 Nachweis von Proteinen mit Antikörpern (Westernblot) .....	53
2.2.2.7 Elektrotransfer von Proteinen ("Semidry"-Westernblot).....	53
2.2.2.8 Nasstransfer von Proteinen ("Tankblot") .....	54
2.2.2.9 Dehybridisierung der Antikörper von Blotmembranen .....	55
2.2.2.10 Phosphotyrosinblot.....	55
2.2.2.11 Ko-Immunopräzipitation.....	57
2.2.2.12 Transiente Transfektion von eukaryontischen Zellen .....	58
2.2.2.13 ICAM-1 Quervernetzung auf bEnd.5 Endothelioma.....	59
2.2.2.14 Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen in <i>E.coli</i> .....	60
2.2.2.15 <i>In-vitro</i> Transkription/Translation von Proteinen .....	61
2.2.2.16 Fluorographie .....	62
2.2.3 <i>Zellbiologische Methoden</i> .....	62
2.2.3.1 Standardbedingungen für die Zellkultur.....	62
2.2.3.2 Einfrieren von Zellen.....	63
2.2.3.3 Auftauen und Revitalisieren von Zellen .....	63
2.2.3.4 Immunocytochemie durch indirekte Immunfluoreszenz.....	63
2.2.3.5 Immunhistologie am Kryoschnitt.....	65
2.2.3.6 Durchflußcytometrie (FACS) an bEnd.3 Endothelioma .....	66
2.2.3.7 siRNA vermittelter "Knock-Down" der Expression von Proteinen .....	68
2.2.3.8 Präparation von humanen Granulozyten aus Vollblut.....	69
2.2.3.9 Transmigrationsversuch auf Deckgläschen .....	70
2.2.3.10 Untersuchung der parazellulären Permeabilität von Endothelzellen.....	71
<b>3. ERGEBNISSE</b> .....	<b>73</b>
3.1 UNTERSUCHUNGEN ZU VE-PTP UND VE-CADHERIN.....	73
3.1.1 <i>VE-PTP Lokalisation im Endothel</i> .....	73
3.1.1.1 Untersuchung der gewebespezifischen Verteilung von VE-PTP mittels Immunhistochemie....	73
3.1.1.2 Untersuchung der subzellulären Verteilung von VE-PTP mittels Immunocytochemie .....	76
3.1.1.3 Untersuchung der dichteabhängigen Zelloberflächenexpression von VE-PTP .....	78
3.1.1.4 "Knock-down" von VE-Cadherin hat keinen Einfluß auf die Lokalisation von VE-PTP .....	79
3.1.2 <i>Die VE-PTP - VE-Cadherin Interaktion</i> .....	81
3.1.2.1 VE-PTP und VE-Cadherin assoziieren verstärkt mit steigender Zelldichte.....	81
3.1.2.2 Untersuchung der VE-Cadherin Phosphorylierung bei steigender Zelldichte .....	83
3.1.3 <i>Untersuchung der VE-PTP Funktion mittels siRNA</i> .....	86
3.1.3.1 Etablierung von siRNA für VE-PTP in HUVEC .....	86
3.1.3.2 Knock-down von VE-PTP führt zur erhöhten VE-Cadherin Phosphorylierung in HUVEC .....	88
3.1.3.3 siRNA-induziertes Ausschalten von VE-PTP in HUVECs führt zu erhöhter transendothelialer Migration von Polymorphonukleären Neutrophilen.....	89
3.1.3.4 siRNA-induziertes Ausschalten von VE-PTP in HUVECs führt zu veränderter parazellulärer Permeabilität .....	92
3.2 UNTERSUCHUNGEN ZUM EFFEKT DER LIGATION VON ICAM-1 AUF VE-CADHERIN-PHOSPHORYLIERUNG .....	94
3.2.1 <i>ICAM-1 abhängige Phosphorylierung von VE-Cadherin</i> .....	94
3.2.1.1 ICAM-1 Ligation führt zu transienter Phosphorylierung von VE-Cadherin in Endothelioma .....	94
3.2.1.2 Beteiligung von Src an der ICAM-1 vermittelten Phosphorylierung von VE-Cadherin.....	96
3.2.2 <i>ICAM-1 abhängige Änderung der Assoziation von VE-PTP und VE-Cadherin</i> .....	98
3.2.3 <i>Parazelluläre Permeabilität nach ICAM-1 Crosslink auf bEnd.5</i> .....	99
3.3 SUCHE NACH NEUEN VE-PTP INTERAKTIONSPARTNERN .....	102
3.3.1 <i>Isolierung eines VE-PTP interagierenden Proteines</i> .....	102
3.3.1.1 Pull-Down Experimente mit GST-Fusionsproteinen an Endothelioma-Lysaten.....	102
3.3.1.2 Identifizierung eines Kandidatenproteines.....	104
3.3.2 <i>Überprüfung der Interaktion von VE-PTP und GPP130</i> .....	106
3.3.2.1 Pull-Down mit GST-Fusionsproteinen und <i>in-vitro</i> translatierten Proteinen.....	106
3.3.2.2 Ko-Immunpräzipitationsexperimente mit transient transfizierten Zellen.....	107
3.3.3 <i>Subzelluläre Lokalisation von GPP130</i> .....	109

---

<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>111</b>
4.1 VE-PTP IST EIN FUNKTIONELLER INTERAKTIONSPARTNER VON VE-CADHERIN .....	111
4.1.1 <i>VE-PTP ist eine endothelspezifisch exprimierte Phosphatase .....</i>	113
4.1.2 <i>VE-PTP wird mit steigender Zelldichte in den endothelialen Zellkontakt umgelagert.....</i>	114
4.1.3 <i>VE-PTP und VE-Cadherin assoziieren verstärkt in konfluenten Endothelzellen .....</i>	116
4.1.4 <i>VE-Cadherin wird mit steigender Zelldichte Dephosphoryliert.....</i>	118
4.1.5 <i>VE-PTP dephosphoryliert VE-Cadherin in-vivo.....</i>	120
4.1.6 <i>Inhibition von VE-PTP erhöht die transendotheliale Migration von Neutrophilen .....</i>	121
4.2 VE-CADHERIN IST EIN ZIEL DER ICAM-1 SIGNALWEGE .....	124
4.2.1 <i>Transiente VE-Cadherin Phosphorylierung durch ICAM-1 Ligation.....</i>	125
4.2.2 <i>Inhibition von Src verhindert ICAM-1 abhängige Phosphorylierung von VE-Cadherin ...</i>	126
4.2.3 <i>Veränderte Assoziation von VE-PTP mit VE-Cadherin nach ICAM-1 Ligation .....</i>	128
4.2.4 <i>Permeabilitätsversuche nach ICAM-1 Quervernetzung .....</i>	129
4.3 IDENTIFIZIERUNG EINES NEUEN VE-PTP-INTERAGIERENDEN PROTEINES .....	129
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>133</b>
<b>6. ANHANG.....</b>	<b>144</b>
6.1 DNA SEQUENZ DER MURINEN GPP130 CDNA.....	144
6.2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	145
6.3 LEBENS LAUF .....	147
6.4 DANKSAGUNGEN .....	149

## **Zusammenfassung**

Endotheliale Adherens Junctions werden von VE-Cadherin Molekülen aufgebaut, die über Bindung an die Catenine mit dem Cytoskelett verankert sind. Dissoziierung des Zellkontaktes mit Antikörpern gegen VE-Cadherin erleichtert die Auswanderung von Leukozyten. Allgemein wird die Tyrosin-Phosphorylierung des VE-Cadherin-Catenin Komplexes im Zusammenhang mit der Regulierung der Stabilität des Zell-Zellkontaktes gesehen. In Vorarbeiten wurde die Vaskuläre Endotheliale Protein-Tyrosin Phosphatase (VE-PTP) als Interaktionspartner von VE-Cadherin identifiziert, dessen Induktion die parazelluläre Permeabilität transfizierter CHO-Zellen herabsetzt und deren Aggregation verstärkt (Nawroth *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde als Hauptprojekt die Bedeutung von endogener VE-PTP für die VE-Cadherin - abhängige Zellkontaktintegrität in Endothelzellen untersucht. Dabei wurde gezeigt, daß die Phosphatase bei gleichbleibender Gesamtexpression auf der Zelloberfläche mit steigender Konfluenz verstärkt im endothelialen Zellkontakt lokalisiert ist. Dies korreliert mit einer verstärkten Assoziation von VE-PTP und VE-Cadherin sowie der verminderten VE-Cadherin-Phosphorylierung in konfluentem gegenüber weniger dichtem Endothel. Eine Inhibition der VE-PTP Expression in humanen primären Endothelzellen durch siRNA führt zu verstärkter Tyrosinphosphorylierung von VE-Cadherin und erhöht die transendotheliale Migration von Neutrophilen um 60 %. VE-PTP wurde daher erstmalig als wichtiger Faktor für die Aufrechterhaltung der Integrität der VE-Cadherin - vermittelten Endothelzellbarriere bei der transendothelialen Migration von Leukozyten etabliert.

In zwei Nebenprojekten wurde zum einen die Auswirkung der Stimulierung des endothelialen Adhäsionsmoleküls Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) auf VE-Cadherin geprüft, zum anderen wurde nach VE-PTP assoziierten Proteinen gesucht. Nach Ligation von ICAM-1 durch Quervernetzung mit Antikörpern wurde eine transient erhöhte Tyrosinphosphorylierung von VE-Cadherin nachgewiesen. Der Effekt wird durch die pharmakologische Inhibition von Kinasen der Src-Familie unterbunden. Dies etabliert VE-Cadherin als Ziel der ICAM-1 abhängigen Signaltransduktion nach Aggregation des Moleküls auf der Zelloberfläche. Das *cis*-Golgi lokalisierte Typ-II Transmembranprotein GPP130 wurde biochemisch als neues VE-PTP interagierendes Protein isoliert. Beide Proteine sind in HUVEC partiell kolokalisierbar. Der Golgi-Luminale Teil von GPP130 ist für die Interaktion mit VE-PTP hinreichend. Ob die Assoziation von GPP130 mit VE-PTP für die Prozessierung der Phosphatase relevant ist, bleibt noch aufzuklären.

# **1. Einleitung**

## **1.1 Endotheliale Zell-Zellkontakte**

Endothelzellen gehören zu den wichtigsten zellulären Bestandteilen von Blutgefäßen, deren innere Gefäßwand sie auskleiden. Ihre Hauptaufgabe besteht in der räumlichen Trennung von Blut und Gewebe. Zusätzlich kontrollieren sie die selektive Permeabilität der Blutgefäßwand für Proteine und Zellen des Blutes. Jene besonderen Eigenschaften erhalten Endothelzellen durch ein spezialisiertes transzelluläres System von Transportvesikel (vesiculo-vacuoläre Organellen, Dvorak *et al.*, 1996) und das koordinierte Öffnen und Schließen von Zell-Zellkontakten (Stevens *et al.*, 2000). Solche Systeme müssen einer strengen Regulierung unterliegen, um die endotheliale Integrität zu wahren und die Gefäße vor einer unkontrollierten Erhöhung der Permeabilität zu schützen.

Endothelzellen bilden, wie auch Epithelzellen, miteinander feste Zellkontakte, die "Junctions" genannt werden. Junctions werden durch Transmembranproteine gebildet, die für die homophile Zell-Zell Adhäsion verantwortlich sind. Sie binden ihrerseits an spezifische intrazelluläre Partner, welche die Verankerung mit dem Cytoskelett und damit die Festigung der Struktur vermitteln (Vestweber, 2000; Bazzoni & Dejana, 2004, Dejana, 2004). Sowohl in Epithelzellen als auch Endothelzellen sind zwei wichtige Arten von Junctions sehr ausführlich beschrieben : Die "Adherens Junction" (AJ) und "Tight Junction" (TJ). Sie sorgen für die Abdichtung von Zellschichten und die Stabilität des Zell-Zellkontaktes. "Gap Junctions" dienen der Kommunikation zwischen Zellen. Außerdem sind die epithelzellspezifischen "Desmosomen" bekannt, sowie die "Complexus Adhaerentes" in Endothelzellen.

Ein wesentlicher Unterschied beider Zelltypen ist die Organisation der Zellkontakte. Im Gegensatz zu polarisierten Epithelzellen besitzen Endothelzellen eine weit weniger strikte Anordnung der Junctions. In ersteren versiegeln die Tight Junctions häufig die apikale Seite der Kontaktstelle benachbarter Zellen. Auch in Endothelzellen erfüllen sie diese Aufgabe und sind besonders gut an der Blut-Hirn Schranke sowie großen Arterien entwickelt. In den postkapillären Venolen hingegen, in denen vornehmlich die Extravasation der Leukozyten stattfindet, sind die TJ entweder stark reduziert oder gar nicht vorhanden. Hierdurch wird den Immunzellen die Einwanderung ins Gewebe erleichtert (Simionescu & Simionescu, 1991). Epitheliale Adherens Junctions befinden sich mehr basal im Zellkontakt und geben ihm zusätzliche Stabilität. In Endothelzellen liegen TJ und AJ oft vermischt entlang des Zell-Zellkontaktes vor (Anderson & van Itallie, 1995).

**Abbildung 1.1** gibt einen Überblick über die molekulare Zusammensetzung von Junctions in Endothelzellen, auf die in den folgenden Kapiteln näher eingegangen wird.

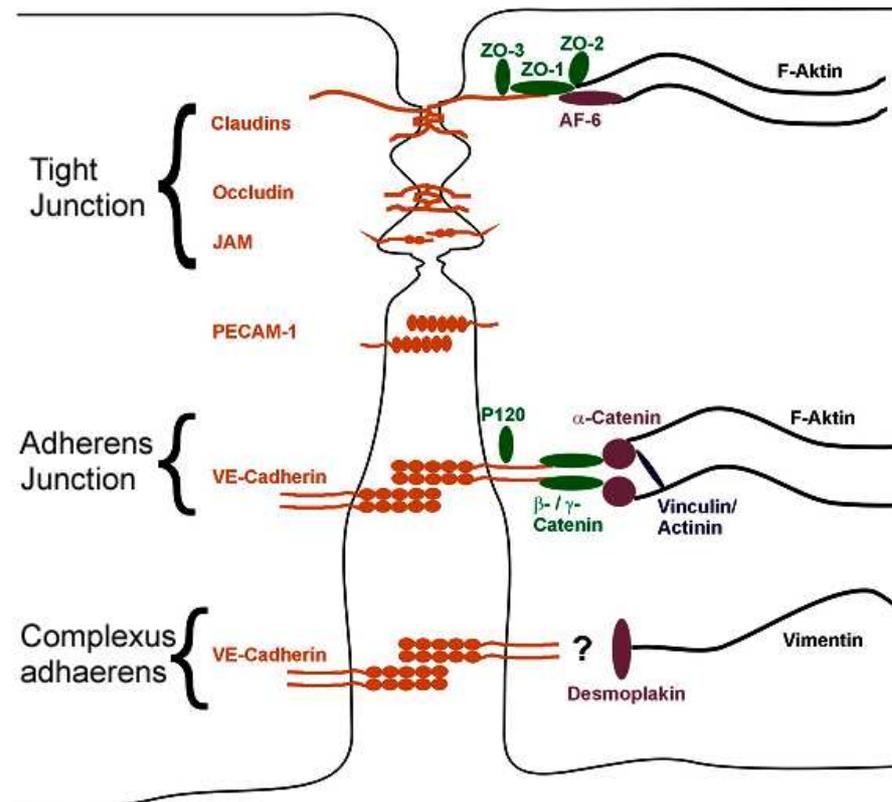
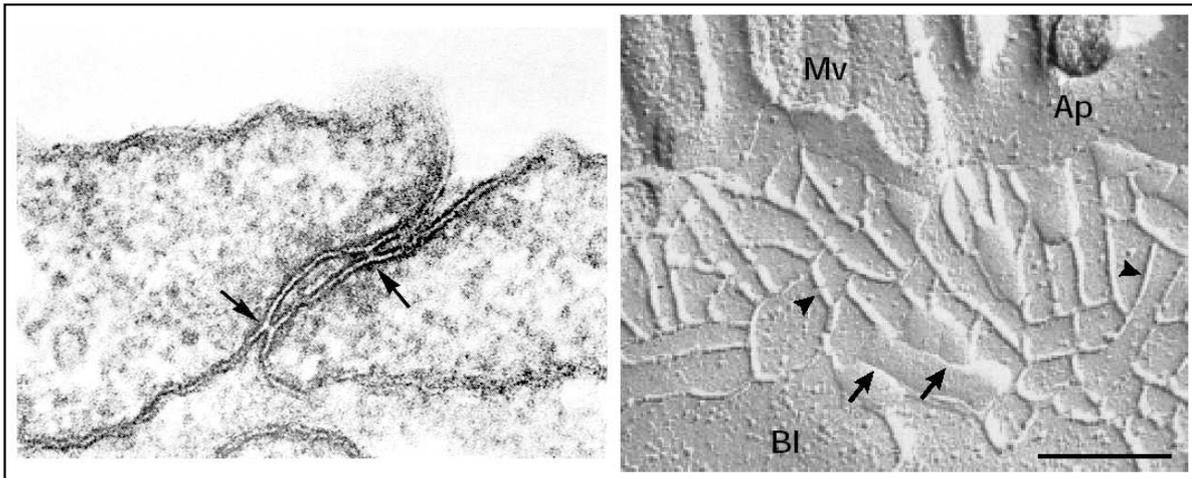


Abbildung 1.1 : Die molekulare Zusammensetzung endothelialer Junctions

### 1.1.1 Tight Junctions

Tight junctions sind morphologisch als dicht benachbarte Plasmamembranen definiert, die teilweise fusioniert zu sein scheinen ("Kissing points"). Dabei erscheinen sie in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Gefrierbruch-Präparaten als quervernetzte Stränge partikulärer Fibrillen innerhalb der Membran (siehe **Abb. 1.2**). Verschiedene Zelltypen zeigen beträchtliche Variationen in Anzahl und Verflechtung der TJ-Stränge. Sie erfüllen die Aufgabe einer Diffusionsbarriere zwischen den apikalen und basolateralen Plasmamembran-Bereichen der Zelle, die sich in ihrer Zusammensetzung aus integralen Membranproteinen und Lipiden unterscheiden. Außerdem versiegeln sie den parazellulären Spalt zwischen Zellen (Vestweber, 2000; Tsukita *et al.*, 2001). Dabei erlauben die TJs eine selektive Permeabilität gegenüber Proteinen verschiedener Größe und Ladung (Gumbiner, 1993).

Die molekulare Zusammensetzung von TJ ist sehr komplex, sie bestehen sowohl aus Transmembran- als auch intrazellulären Proteinen. Als integrale Membranproteine der TJ sind Occludine, Claudine und die JAMs (Junctional Adhesion Molecule) bekannt, wobei Occludin und Claudin in den "Kissing points" zu finden sind. Intrazellulär finden sich an der TJ die Proteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3, sowie PAR-3/ASIP und AF-6/Afadin und andere.



**Abbildung 1.2** : Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Tight Junction. Links TEM, rechts Gefrierbruch. Pfeile weisen auf "Kissing Points". Mv = Mikrovilli, Ap = Apikale Membran, BI = Basolaterale Membran. Aus Tsukita *et al.*, 2001.

Occludin wurde als erstes TJ-Protein identifiziert. Es lokalisiert direkt in den TJ-Strängen (Furuse *et al.*, 1993), und seine Überexpression erhöht die transepitheliale Resistenz (TER) in Zellen von Säugetieren (Balda *et al.*, 1996; McCarthy *et al.*, 1996). Daher trägt Occludin vermutlich zur Aufrechterhaltung der Barrierefunktion in Epithelien bei. Dies wird durch Experimente mit mutiertem Occludin gestützt, die eine erhöhte parazelluläre Permeabilität zur Folge hatten (Bamforth *et al.*, 1999). Ein möglicher Beitrag von Occludin zur interzellulären Adhäsion wurde durch eine Studie von Van Itallie & Anderson 1997 vorgeschlagen, in der eine erhöhte Zell-Aggregation von Occludin-transfizierten Fibroblasten demonstriert wurde. Andererseits besitzen die Epithelien Occludin-homozygot defizienter Mäuse morphologisch intakte TJs mit unbeeinträchtigt Barrierefunktion, was wiederum gegen eine direkte Beteiligung von Occludin am Aufbau der TJ spricht (Saitou *et al.*, 1998 + 2000).

Claudine bilden eine Proteinfamilie mit 24 Mitgliedern. Ihre Expression variiert beträchtlich in verschiedenen Geweben. Claudin-5 beispielsweise wird vorwiegend in Endothelzellen exprimiert, Claudin-11 in Oligodendrozyten und Sertoli-Zellen (Furuse *et al.*, 1998b, Morita *et al.*, 1999a-c). In transfizierten Fibroblasten sind Claudin-1 und -2 in der Lage, TJ-Stränge an Zellkontakten aufzubauen und Occludin zu rekrutieren (Furuse *et al.*, 1998; Kubota *et al.*, 1999). Die Untersuchung der Hunde-Epithelzelllinien MDCK I und II haben zum Verständnis der Rolle der Claudine bei der Barrierefunktion der TJ beigetragen. MDCK I Zellen exprimieren kein Claudin-2. Anhand von Überexpressionsstudien und Null-Mutationen im *claudin-1* Gen konnte eine positive Korrelation der Claudin-1 Expression mit der TJ-Stabilität abgeleitet werden (McCarthy *et al.*, 2000; Furuse *et al.*, 2002). Weiterhin wurde durch Mutationsstudien die Möglichkeit aufgezeigt, daß Claudine als elektrostatische Barriere für Ionen dienen könnten (Colegio *et al.*, 2002 + 2003). Claudine bilden gleichsam

das "Rückgrat" der Tight Junction, wobei vermutlich die Kombination verschiedener Claudine deren Barriereigenschaften bestimmt.

Weitere Transmembranproteine der TJ gehören zur Immunoglobulin-Superfamilie. Hier ist vor allem JAM-A zu nennen. JAM-A wird sowohl in Epithel- als auch Endothelzellen exprimiert und kolokalisiert dort gemeinsam mit Komponenten der TJ in der apikalen Region des parazellulären Spaltes (Martin-Padura *et al.*, 1998). Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben allerdings, daß JAM-A kein integraler Bestandteil der TJ-Stränge ist. Zudem führt die ektopische Expression von JAM-A in Fibroblasten nicht zur Bildung der charakteristischen TJ-Stränge, was auf eine von den Claudinen abweichende Funktion hindeutet (Itoh *et al.*, 2001). Zahlreiche Studien belegen die homophile *trans*-Interaktion von JAM-A auf benachbarten Zellen (Schneeberger & Lynch, 2004). Die Blockierung von JAM-A mit Antikörpern oder rekombinanten Fragmenten verhindert den Aufbau eines elektrischen Widerstandes (TER), was die Rolle des Moleküls für die Funktion der TJ illustriert (Bazzoni *et al.*, 2000; Liang *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000).

Von den intrazellulären TJ-Komponenten sind die Proteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3 die am intensivsten studierten. Sie gehören zur Familie der MAGUK ("Membrane Associated Guanylate Kinase") Proteine, die aus einer katalytisch inaktiven Guanylatkinase-Domäne, mehreren PDZ-Domänen und einer SH3-Domäne bestehen. MAGUK Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion, indem sie Membranproteine bündeln (Fanning & Anderson, 1999). Sämtliche dieser Domänen dienen der Interaktion zwischen Proteinen, was die Rolle der ZO-Proteine als Adaptoren unterstreicht. Eine Reihe von Transmembranproteinen der TJ binden an ZO-1, darunter die Claudine, Occludin, JAMs, aber auch ZO-2 und ZO-3 (zur Übersicht : Bazzoni & Dejana, 2004; Schneeberger & Lynch, 2004). Über den N-terminalen Bereich bindet ZO-1 an Transmembranproteine, der C-terminale Bereich dient als Anker für das Aktin-Cytoskelett (Fanning *et al.*, 2002). Seine vielfältigen Interaktionen lassen auf eine Funktion von ZO-1 als "Scaffolding Protein" schließen, welches möglicherweise die Infrastruktur für den koordinierten Aufbau der TJ bietet.

Durch die Rekrutierung zahlreicher Proteine wird offenbar ein großer makromolekularer Komplex an der cytoplasmatischen Seite der Tight Junction gebildet, welcher über ZO-1 und ZO-2 mit dem Cytoskelett verbunden ist. Dies könnte Einfluß auf die Stabilität der TJ haben, aber auch von Bedeutung für die regulierte Öffnung von Zellkontakten und die Aufrechterhaltung von Zellform und Polarität sein (Dejana, 2004). In Zusammenhang hiermit ist die Rekrutierung von Proteinen, welche mit der Etablierung der Zell-Polarität in Verbindung stehen, durch die TJ von Interesse. Zu besagten Proteinen gehören PAR-3, PAR-6 und aPKC (Schneeberger & Lynch, 2004).

### **1.1.2 Desmosomen und Complexus Adhaerentes**

In Epithelien wird die Adhäsion zwischen Zellen durch Desmosomen stabilisiert. Dies ist aufgrund der hohen mechanischen Belastung der Zellschicht notwendig. Desmosomen werden von den Transmembranproteinen Desmoglein und Desmocollin gebildet (Schwarz *et al.*, 1990). Diese gehören zur Cadherin-Familie und binden über ihren intrazellulären Teil an Desmoplakin I und II, Plakoglobin und verwandte Moleküle der Plakoglobin-Familie. Morphologisch bilden Desmosomen einen zentralen Plaque, welcher als Ankerpunkt für intermediäre Keratin-Filamente dient (Schmidt *et al.*, 1994).

Endothelzellen bilden anstelle von Desmosomen die strukturell ähnlichen Complexus Adhaerentes (Schmelz *et al.*, 1993 + 1994). Dort ist VE-Cadherin das zentrale Adhäsionsmolekül, welches intrazellulär an Plakoglobin und Desmoplakin bindet. Der Komplex ist mit Vimentin-Filamenten verbunden (Valiron *et al.*, 1996; Lampugnani & Dejana, 1997).

### **1.1.3 GAP-Junctions**

Zusätzlich zur Zell-Zell Adhäsion vermittelt eine andere Art von Junction die Kommunikation zwischen Zellen. Diese Struktur wird von Connexinen (Cx) aufgebaut. Drei Connexine (Cx43, Cx40 und Cx37) werden im Endothel exprimiert, wo sie in einem hexameren Connexon organisiert sind. Connexone bilden durch direkte Apposition Kanäle zwischen Zellen, durch die Ionen und kleine Moleküle diffundieren können (Simon & Goodenough, 1998).

### **1.1.4 Adherens Junctions**

#### **1.1.4.1 Der Cadherin-Catenin Komplex**

Adherens Junctions werden in sehr frühen Stadien zellulärer Kontakte von Cadherinen gebildet. Den AJs folgt die Ausbildung der Tight Junctions. In einigen zellulären Systemen verhindert die Blockierung von AJs durch Antikörper die nachfolgende Ausbildung von TJs (Behrens *et al.*, 1985; Gumbiner *et al.*, 1988).

Bei Cadherinen handelt es sich um Transmembran-Zelladhäsionsmoleküle, die über ihre extrazelluläre Domäne calciumabhängig homophil miteinander interagieren und über den cytoplasmatischen Teil mit dem Aktin-Cytoskelett verbunden sind. Cadherine gehören zu

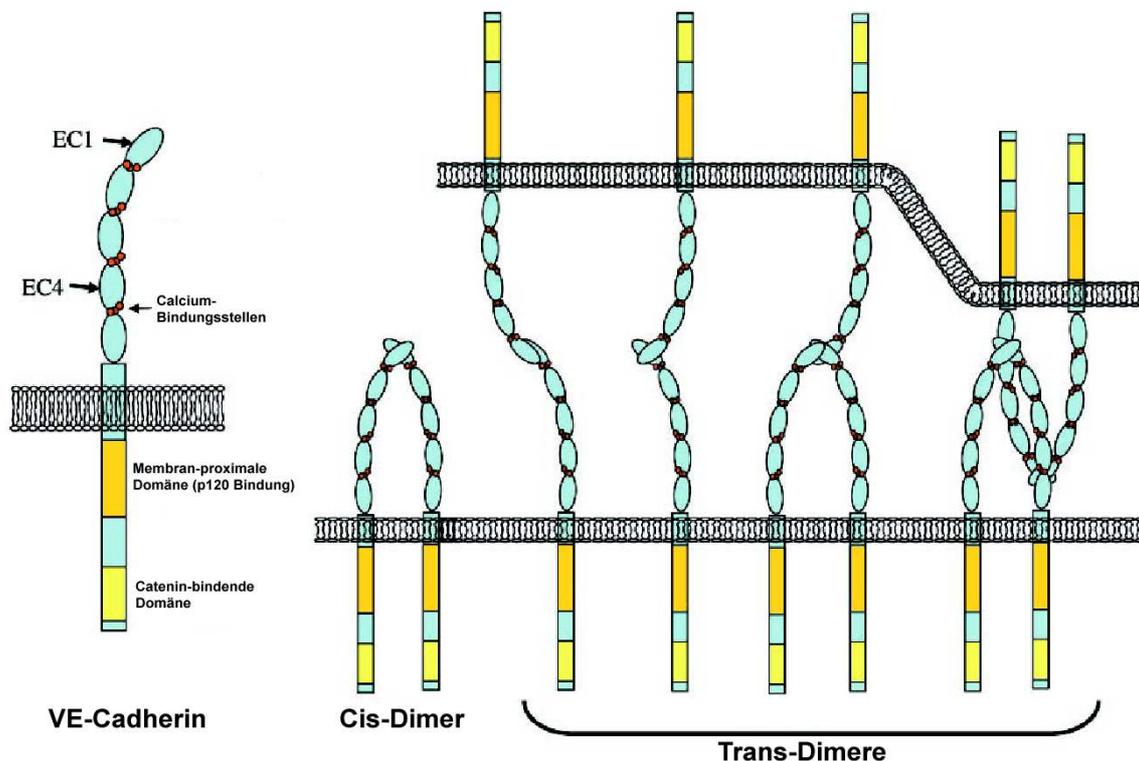
einer Superfamilie einkettiger Moleküle, die weiter in zwei Subklassen eingeteilt werden. Bislang sind über 15 klassische Cadherine beschrieben (Vestweber, 2000). Das primäre Cadherin der epithelialen Adherens Junction ist E-Cadherin (Vestweber & Kemler, 1985). Endothelzellen exprimieren dagegen VE-Cadherin, welches 1991 identifiziert wurde und als spezifisches Markerprotein für diesen Zelltyp dient (Suzuki *et al.*, 1991; Lampugnani *et al.*, 1992). VE-Cadherin wird auf Endothelzellen sämtlicher Gefäße exprimiert.

Cadherine besitzen fünf extrazelluläre homologe Cadherin-Domänen, eine Transmembrandomäne und einen cytoplasmatischen Teil. Der extrazelluläre Teil bildet Homodimere und beherbergt die Calcium-Bindungsstellen. Abhängig von der extrazellulären Calcium-Konzentration nimmt das Cadherin verschiedene Konformationen an. Für E-Cadherin wurde bei steigender  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration ein Übergang von der monomeren Struktur über *cis*-Dimere zur *trans*-Interaktion mit der Bildung reißverschluss-ähnlicher Strukturen nachgewiesen (Pertz *et al.*, 1999). Über die genaue Natur der Dimerisierung ist die Literatur geteilter Meinung. Vermutlich werden laterale *cis*-homodimere gebildet, die wiederum über die aminoterminalen Cadherin-Domänen Kopf-zu-Kopf Kontakte in *trans* bilden (Vincent *et al.*, 2004). Es liegen aber auch Daten vor, die mehrere homophile Bindungsstellen entlang des extrazellulären Teils beschreiben (Chappuis-Flament *et al.*, 2001; Corada *et al.*, 2002). **Abbildung 1.3** gibt einen Überblick über die denkbaren Varianten der Cadherin Dimerisierung.

Der cytoplasmatische Teil von VE-Cadherin ist hochgradig homolog zu dem anderer klassischer Cadherine. Er vermittelt die Interaktion mit den Cateninen, welche ihrerseits an das Cytoskelett binden (Kemler, 1993; Aberle *et al.*, 1996). Die Assoziation mit den Cateninen ist für die Cadherin-abhängige Adhäsion notwendig. **Abbildung 1.1** zeigt die Zusammensetzung des Cadherin-Catenin Komplexes an der Adherens Junction. Der carboxyterminale Abschnitt des cytoplasmatischen Teiles von VE-Cadherin beherbergt die Bindungsstellen für  $\beta$ -Catenin und Plakoglobin ( $\gamma$ -Catenin). Diese beiden Proteine sind homolog und enthalten 10-13 "Armadillo-repeats", die ein Merkmal vieler an Signalwegen beteiligter Proteine sind. Sowohl  $\beta$ -Catenin als auch Plakoglobin binden an  $\alpha$ -Catenin, das den Komplex mit Aktinfilamenten verankert (Ben-Ze'ev & Geiger, 1998; Vleminckx & Kemler, 1999). Ein weiterer Bindungspartner von VE-Cadherin ist p120, ein Protein mit Homologie zu  $\beta$ -Catenin und Plakoglobin (Anastasiadis *et al.*, 2000). Die p120 Bindungsstelle an VE-Cadherin liegt jedoch, im Gegensatz zu der für andere Catenine, im membranproximalen Bereich des cytoplasmatischen Teils (**Abb. 1.3**). p120 assoziiert nicht mit  $\alpha$ -Catenin oder anderen Aktin-bindenden Proteinen (Thoreson *et al.*, 2000). ZO-1, das als Bestandteil der Tight Junctions gilt, liegt in frühen Stadien mit der Adherens Junction

organisiert vor. Ursache hierfür ist seine Bindung an  $\alpha$ -Catenin, die nach Bildung der Junction zugunsten einer Lokalisation von ZO-1 in der TJ verloren geht (Itoh *et al.*, 1997).

Obwohl in der AJ am stärksten exprimiert, ist VE-Cadherin nicht das einzige endotheliale Cadherin : N-Cadherin wird in den meisten untersuchten Endothelzellen in vergleichbaren Mengen gefunden. Dort ist es allerdings nicht in der AJ lokalisiert, sondern diffus auf der Zelloberfläche verteilt. Bei Ko-Transfektion beider Cadherine verhindert VE-Cadherin die Lokalisation von N-Cadherin an Zellkontakten. Diese Konkurrenz könnte auf verschiedene Funktionen der Cadherine in Endothelzellen hinweisen : VE-Cadherin fördert die homotypische Interaktion zwischen Endothelzellen, N-Cadherin die Verankerung mit anderen N-Cadherin-exprimierenden Zellen wie glatten Muskelzellen und Perizyten (Navarro *et al.*, 1998). Die Konzentrierung von N-Cadherin an der basalen Seite von Endothelzellen wurde im Gehirn nachgewiesen, wo Kontakte mit Peri- und Astrozyten stattfinden (Liebner *et al.*, 2000). Weiterhin wurden P- und T-Cadherin in Endothel gefunden, sowie ein als VE-Cadherin-2 bezeichnetes Protein (Bazzoni & Dejana, 2004).



**Abbildung 1.3** : Schematische Darstellung der VE-Cadherin Domänenstruktur und Modelle für die Cadherin-basierte Adhäsion (verändert nach Vincent *et al.*, 2004)

#### **1.1.4.2 Der Nectin-Afadin Komplex**

Dieser Komplex wurde in Epithelzellen beschrieben. Obwohl Komponenten im Endothel zu finden sind, ist dort wenig über seine Funktion bekannt. Bekannte Proteine des Komplexes sind Nectin, Afadin und Ponsin. Nectine sind eine Familie Calcium-unabhängiger Immunglobulin-ähnlicher Zelladhäsionsmoleküle, von denen zur Zeit vier Mitglieder bekannt sind. Über ihren cytoplasmatischen Teil binden sie an Afadin (AF-6), welches Nectin mit dem Aktin-Cytoskelett verbindet. Ponsin schließt sich dem Komplex an und bindet an Afadin, Vinculin und  $\alpha$ -Catenin. Dies liefert die molekulare Grundlage für eine Interaktion mit den Cadherinen, mit denen Nectin und Afadin kolokalisierbar sind (Takahashi *et al.*, 1999; Takai *et al.*, 2003). Daher könnten diese Proteine eine Funktion bei der Organisation von Adherens Junctions besitzen. Allerdings handelt es sich nicht um exklusive Interaktionspartner der AJ. Afadin wurde als Partnerprotein von JAM-A identifiziert (Ebnet *et al.*, 2000), und Fukuhara *et al.* fanden 2002 Hinweise auf eine Beteiligung von Nectin an der Lokalisation von JAM in den TJs. Daher läßt sich keine strikte Zuordnung des Nectin-Afadin Komplexes zur AJ oder TJ vornehmen, möglicherweise ist er generell am Aufbau verschiedener Junctions beteiligt.

#### **1.1.5 Zelladhäsionsmoleküle ohne strukturelle Einteilung in Junctions**

Endothelzellen exprimieren auch Adhäsionsmoleküle, die zwar am interendothelialen Zellkontakt konzentriert, aber nicht eindeutig der AJ oder TJ zuzuordnen sind. Von jenen Molekülen ist PECAM-1 (Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule - 1) am ausführlichsten untersucht. Als Transmembranprotein gehört es zur Immunglobulin-Superfamilie und wird auf Endothelzellen, Leukozyten und Thrombozyten exprimiert (Newman, 1997). In subkonfluenten Endothelzellen ist PECAM diffus über die Zelloberfläche verteilt und wird bei Etablierung der ersten Zell-Zellkontakte in selbigen konzentriert, was für eine homophile Interaktion spricht (Albelda *et al.*, 1991).

Außer homophilen Kontakten interagiert PECAM-1 heterophil mit  $\alpha_v\beta_3$  Integrinen (Piali *et al.*, 1995). Zusammen mit weiteren Daten spricht dies für eine Beteiligung des Moleküls an der transendothelialen Migration von Leukozyten. Blockierung von PECAM-1 mit Antikörpern verhindert die TEM von Neutrophilen und Monozyten (Muller *et al.*, 1993). Die Analyse PECAM-1 homozygot defizienter Mäuse zeigte, daß Neutrophile dieser Tiere zwar in Endothel einwandern können, aber im letzten Schritt zwischen der Zellschicht und Basalmembran stecken bleiben (Thompson *et al.*, 2001). Neuere Daten weisen auf die Notwendigkeit einer sequenziellen Interaktion der Leukozyten mit PECAM und anderen Zelladhäsionsmolekülen für die effiziente Transmigration hin. Vor allem CD99 scheint an

der TEM von Leukozyten maßgeblich beteiligt zu sein (Schenkel *et al.*, 2002; Bixel *et al.*, 2004).

PECAM-1 besitzt eine Funktion als Signalmolekül, wobei der Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt wurde. Das Molekül verfügt intrazellulär über zwei ITIMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif; Newman, 1999) und vermutlich auch ein ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif; Lu *et al.*, 1997). Über diese Motive, die bei Aktivierung Tyrosin-phosphoryliert werden, bindet PECAM unter anderem an die Phosphatase SHP-2 und phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin (Ilan *et al.*, 1999-2003). Daher könnte PECAM-1 eine ähnliche biologische Bedeutung wie den Cadherinen zukommen und deren Funktion über Interaktion mit Komponenten des MAPK Signalweges modulieren, da SHP-2 Teil jener Signalkaskade ist (Perkins *et al.*, 1992; Sheibani *et al.*, 2000; Ilan & Madri, 2003).

Weitere endotheliale Zellkontaktproteine sind S-endo 1 (CD146) und Endoglin. S-endo 1 ist ein Immunglobulin-ähnliches Molekül, das homophile Zelladhäsion induziert (Bardin *et al.*, 2001). Endoglin wird in großer Menge auf vaskulären Endothelzellen exprimiert und lokalisiert an interendothelialen Zellkontakten. Es funktioniert als akzessorisches Protein für Rezeptoren der TGF- $\beta$  Superfamilie (Transforming Growth Factor, Barbara *et al.*, 1999). Endoglin "knock-out" Mäuse besitzen einen ähnlichen vaskulären Phänotyp wie VE-Cadherin-defiziente Tiere (Bourdeau *et al.*, 1999).

## **1.2 Die Beteiligung der Adherens Junction an Signalprozessen**

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

### **1.2.1 Signalisierung durch die Catenine**

Einige intrazelluläre Proteine der Junctions besitzen neben der Aufgabe der Verankerung des Cadherin-Catenin Komplexes mit dem Aktin-Cytoskelett die Eigenschaft, als cytosolische Proteine Signalfunktionen zu übernehmen. Die transkriptionelle Aktivität von

Cateninen ist gut untersucht.  $\beta$ -Catenin, Plakoglobin und p120 können sowohl in Assoziation mit den Cadherinen als auch frei im Cytoplasma vorliegen und im Zellkern durch Bindung an Transkriptionsfaktoren die Expression von Genen beeinflussen.

$\beta$ -Catenin ist ein wichtiger Bestandteil des Wnt-Signaltransduktionsweges, der eine Schlüsselrolle für die Zellspezifizierung während der Embryonalentwicklung spielt. Zahlreiche Mitglieder der Wnt Familie signalisieren über die transkriptionelle Aktivität von  $\beta$ -Catenin (Bienz & Clevers, 2000; Gottardi *et al.*, 2002). Die Regulierung der Aktivität findet über Phosphorylierung von N-terminalen Serin und Threonin Resten von cytoplasmatischem  $\beta$ -Catenin statt. Diese wird konstitutiv von Casein I  $\alpha$  Kinase und GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase - 3) ausgeübt und führt zur Degradierung des Catenins im Proteasom (Liu *et al.*, 2002). Signale der Wnt-Kaskade verhindern die Phosphorylierung und erhöhen dadurch die cytoplasmatische Menge von  $\beta$ -Catenin, das in den Nucleus gelangt und dort an die Transkriptionsfaktoren TCF/LEF bindet (T-Cell Factor / Lymphoid Enhancer Factor, Novak & Dedhar, 1999). Eine fehlerhafte Regulierung der Signalisierung kann die Ursache für Krebs sein. Die Liste der durch  $\beta$ -Catenin regulierten Gene ist lang; viele von ihnen sind für die Zellteilung oder Apoptose von Bedeutung (Bienz & Clevers, 2000; Polakis, 2000).

Die Cadherin-Catenin Bindung könnte auch die Menge an freiem cytoplasmatischem Catenin regulieren. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, daß mutiertes oder fehlendes E-Cadherin zu einer Erhöhung des Anteils an ungebundenem  $\beta$ -Catenin im Cytoplasma führt, verbunden mit dessen erhöhter Aktivität als Signalprotein (Gottardi *et al.*, 2001). Zudem verhält sich die Cadherin-Expression umgekehrt proportional zur Invasivität und Proliferation von Tumoren (Takeichi, 1993).

Die Bindung von  $\beta$ -Catenin an E-Cadherin wird ebenfalls über Phosphorylierung reguliert. Die Phosphorylierung von Tyrosin-654 auf  $\beta$ -Catenin verringert seine Affinität für den cytoplasmatischen Teil von E-Cadherin um das Sechsfache (Roura *et al.*, 1999). Zusätzlich spielt auch Ser- und Thr- Phosphorylierung für die Cadherin-Catenin Bindung eine Rolle. Eine aktuelle Arbeit von Gottardi & Gumbiner, 2004 favorisiert zwei verschiedene molekulare Formen von  $\beta$ -Catenin. Die monomere, cytosolische Form übt die Signalfunktionen aus, eine dimere Form, welche mit  $\alpha$ -Catenin assoziiert vorliegt, bindet vornehmlich an das Cadherin und vermittelt die adhäsive Funktion der Catenine. Diese verschiedenen Formen von  $\beta$ -Catenin werden in *C.elegans* durch die Expression mehrerer Gene bereitgestellt (Korswagen *et al.*, 2000), bei Vertebraten durch Modifikationen auf Proteinebene. Als Modifikationen sind zum einen die beschriebene Phosphorylierung bekannt, zum anderen wurde kürzlich das inhibitorische Peptid ICAT (Inhibitor of  $\beta$ -Catenin and TCF-4) vorgestellt, welches mit  $\beta$ -Catenin um dessen Bindung an TCF kompetiert.

Neben der Inhibition des Wnt-Signalweges könnte ICAT auch Konsequenzen für die Cadherin-abhängige Zelladhäsion haben (Tago *et al.*, 2000; Gottardi & Gumbiner, 2004b). Plakoglobin bindet ebenfalls an TCF/LEF, allerdings über eine andere Bindungsstelle als  $\beta$ -Catenin (Miravet *et al.*, 2002). Die Effekte auf Zellproliferation bei übermäßiger Aktivität sind bei beiden Proteinen ähnlich, jedoch kann Plakoglobin nicht die Funktion von  $\beta$ -Catenin ersetzen (Zhurinsky *et al.*, 2000).

In Endothelzellen ist wenig über die Rolle von  $\beta$ -Catenin als Transkriptionsfaktor bekannt. VE-Cadherin ist jedoch sehr wahrscheinlich an der Kontaktinhibition des Zellwachstums beteiligt, indem es die transkriptionelle Aktivität von  $\beta$ -Catenin inhibiert (Caveda *et al.*, 1996; Venkiteswaran *et al.*, 2002).

### **1.2.2 Signalisierung unter Beteiligung von VE-Cadherin**

Die gezielte Deletion des VE-Cadherin Genes in Mäusen hat den Tod der betroffenen Tiere am Tag E 9,5 *in utero* zur Folge. Der Grund hierfür liegt nicht in der fehlerhaften Anordnung der Endothelzellen im primitiven vaskulären Plexus, sondern im fehlenden Umbau und Reifungsprozeß dieser Strukturen. Dies führt bereits am Tag E 8.75 - E 9.0 zu Endothelzellen, die voneinander und von der Basalmembran abgelöst im vaskulären Lumen verstreut sind. Zudem zeigen die Tiere starke Defekte in der Herzentwicklung. Die VE-Cadherin Defizienz oder Deletion des cytoplasmatischen Teils bewirkt in Endothelzellen den programmierten Zelltod durch Apoptose und blockiert den VEGF-A Signaltransduktionsweg, welcher für das Überleben von Endothelzellen wichtig ist. Molekulare Ursache hierfür ist in normalem Endothel die Assoziation von VE-Cadherin mit VEGFR-2,  $\beta$ -Catenin und PI-3-Kinase (Phosphatidyl-Inositid-3 Kinase). Letztere übermittelt nach VEGF-Stimulation über Akt ein Überlebens-Signal an Bcl-2 und wirkt über Tiam und Rac auf das Aktin-Cytoskelett (Carmeliet *et al.*, 1999).

Die Konzentrierung von VE-Cadherin am Zell-Zellkontakt führt, wie auch von anderen Cadherinen bekannt, zur Aktivierung von PI-3 Kinasen und der Phosphorylierung von Akt (Yap *et al.*, 1997). Der Vorgang wird effizienter, wenn nach VEGF-Stimulierung der VEGFR-2 und PI-3 Kinase mit dem VE-Cadherin-Catenin Komplex assoziieren. Für diese Assoziation ist gemäß Carmeliet *et al.* die Catenin-Bindungsstelle notwendig, nicht jedoch die p120 Bindungsstelle.

Andere Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, so der FGF- und EGF-Rezeptor, sind als ebenfalls Interaktionspartner von Cadherinen bekannt. Auch die EGFR - E-Cadherin Interaktion findet über  $\beta$ -Catenin statt (Hoschuetzky *et al.*, 1994; El-Hariry *et al.*, 2001; Dumstrei *et al.*, 2002).

VE-Cadherin ist als wichtiger Modulator des VEGFR-2 Signaltransduktionsweges etabliert. Bei geringer Zelldichte führt die Stimulierung der Zellen mit VEGF zu einer starken Autophosphorylierung und Aktivierung des VEGF-Rezeptors-2. In der Folge bewirkt das VEGF-Signal die verstärkte Proliferation und Motilität der Zelle. Bei hoher Zelldichte induziert VEGF kaum noch die Tyrosin-Phosphorylierung des Rezeptors. Nach Zugabe von blockierenden Antikörpern gegen VE-Cadherin oder Entzug von divalenten Kationen aus dem Medium konfluenten Endothelzellen kann die VEGF-abhängige Autoaktivierung des Rezeptors jedoch wieder hergestellt werden (Rahimi & Kazlauskas, 1999). Für die Kontaktinhibition von Zellen wurde die Notwendigkeit einer  $\beta$ -Catenin-vermittelten Assoziation des VEGFR-2 mit VE-Cadherin gezeigt. Diese führt in konfluenten Endothelzellen, möglicherweise unter Beteiligung der Phosphatase DEP-1, zur verminderten Signalisierung des VEGF-Rezeptors an die proliferationsfördernden Proteine ERK/MAPK (Extracellular Signal-Regulated Kinase/Mitogen Activated Protein Kinase) (Lampugnani *et al.*, 2003). Die VEGFR-2 Signalisierung an Akt, welche ein Überlebens-Signal darstellt, ist bei hoher Zelldichte nicht betroffen (Dejana, 2004).

Ein weiterer Partner im VE-Cadherin Signalisationskomplex ist das Adapterprotein Shc, welches als Komponente des RAS Signaltransduktionsweges gilt. Die Interaktion setzt die Stimulierung der Zelle mit VEGF und Tyrosin-Phosphorylierung des cytoplasmatischen Teils von VE-Cadherin voraus. Dadurch wird Shc vermutlich über eine mit dem Komplex assoziierte Phosphatase dephosphoryliert, wodurch es nicht mehr RAS aktivieren kann. Da der RAS Signaltransduktionsweg über ERK/MAPK das Zellwachstum fördert, setzt die Bindung von Shc an VE-Cadherin möglicherweise die Halbwertszeit des mitogenen Stimulus von VEGF herab (Zanetti *et al.*, 2002).

Die Konzentrierung von VE-Cadherin an der Adherens Junction hat einen Effekt auf die Aktivierung der GTPasen Rac und RhoA. Die Implikation von Rho und Rac in der Organisation von Zellkontakten und dem Aktin-Cytoskelett ist bereits für epitheliales E-Cadherin bekannt (Nusrat *et al.*, 1995; Nakagawa *et al.*, 2001). Tiam, ein Rac Guanosin-Austausch Faktor, ist in VE-Cadherin-abhängiger Weise an der AJ lokalisiert. Wahrscheinlich wird Tiam von VE-Cadherin über PI-3-Kinase-Induktion aktiviert und rekrutiert, was wiederum Rac aktiviert. Die Aktivierung von Rac bewirkt unter anderem eine Aktin-Umverteilung in Endothelzellen, welche für die Ausbildung der typischen Morphologie dieser Zellen verantwortlich ist (Lampugnani *et al.*, 2002). Weiterhin besitzt es vermutlich Funktionen bei Wachstum, Migration und Differenzierung von Zellen (Ridley *et al.*, 2001). Rac ist als Negativ-Regulator für Rho etabliert, und das Gleichgewicht von Rho und Rac ist ein wichtiger Faktor für die Cadherin-basierte Zelladhäsion in Fibroblasten (Braga *et al.*,

1997; Hordijk *et al.*, 1997). Eine Störung des Gleichgewichtes zu erhöhter Rho Aktivität verändert die Morphologie von NIH3T3 Fibroblasten hin zu einem epithelialen Phänotyp (Sander *et al.*, 1999; Zondag *et al.*, 2000b).

VE-Cadherin und PECAM-1 wurden als Mechanosensoren beschrieben. Endothelzellen sind in der Vaskulatur stets hohen Flüssigkeits-Scherkräften ausgesetzt, welche die Zusammensetzung des VE-Cadherin Komplexes beeinflussen. Nach Ausüben von Scherkräften auf Endothel wurde eine Dissoziierung von  $\alpha$ -Catenin und SHP-2 von VE-Cadherin beobachtet, sowie eine verstärkte Bindung von VEGFR-2 an den VE-Cadherin- $\beta$ -Catenin Komplex (Ukropec *et al.*, 2002; Shay-Salit *et al.*, 2002). Osawa *et al.* beschrieben 2002 PECAM-1 als Mechanosensor für Scherkräfte in Flüssigkeiten. Interessanterweise zeigte besagte Gruppe unter Scherkräften eine verstärkte Assoziation von PECAM-1 mit SHP-2.

### 1.3 Protein-Tyrosin Phosphatasen

Phosphorylierung ist ein bedeutender Mechanismus für zahlreiche wichtige Aspekte der Physiologie von Eukaryoten. Das Hinzufügen oder Entfernen von Phosphatresten an Tyrosin-Seitenketten kann ein Erkennungsmotiv für Protein-Protein Interaktionen bilden, die Stabilität eines Proteines kontrollieren und die Aktivität von Enzymen modulieren.

Im Vergleich zur Phosphorylierung im Allgemeinen wird Tyrosin Phosphorylierung nur in vielzelligen Organismen extensiv genutzt. Sie dient der Kommunikation zwischen und innerhalb von Zellen, der Regulierung von Form und Motilität der Zelle, Proliferation und Differenzierung, sowie zellulären Prozessen wie Regulierung der Transkription und Transport von Stoffen. Die Tyrosin Phosphorylierung spielt auch eine wichtige Rolle bei der Koordinierung dieser Vorgänge zwischen benachbarten Zellen während der Embryogenese, Organentwicklung, Gewebe-Homöostase und im Immunsystem. Störungen der Protein-Tyrosin Phosphorylierung sind die Ursache zahlreicher menschlicher Erkrankungen von Krebs bis zu Immunschwäche (Mustelin *et al.*, 2002 + 2002 b; Alonso *et al.*, 2004). Etwa 30 % der zellulären Proteine sind Phosphoproteine, wobei der Großteil an Serin- und Threonin Seitenketten phosphoryliert ist. Die mit einem Anteil von 0,01 - 0,05 % der Gesamtposphorylierung recht niedrige Tyrosin-Phosphorylierung steigt nach Stimulierung der Zelle mit Wachstumsfaktoren oder nach onkogenischer Transformation stark an, bis auf das 100-fache des normalen Niveaus (Zhang, 2002).

Tyrosin Phosphorylierung ist ein reversibler und dynamischer Prozeß. In der Zelle bilden die Aktivitäten von **Protein Tyrosin Kinasen (PTKs)**, welche die Tyrosin-Phosphorylierung katalysieren und **Protein Tyrosin Phosphatasen (PTPs)**, die für die Dephosphorylierung

verantwortlich sind, ein Gleichgewicht. Bis vor kurzem lag der Fokus von Studien zur Tyrosin Phosphorylierung von Proteinen fast ausschließlich auf den PTKs. PTPs wurden für "housekeeping"-Gene gehalten, welche in geringer Anzahl in der Zelle vorkommen und wenig Spezifität besitzen. In den letzten Jahren wurde jedoch deutlich, daß diese Ansicht gänzlich falsch ist. PTPs umfassen eine große Superfamilie von verwandten Enzymen, die strikten Regulationsmechanismen unterworfen sind und wichtige Funktionen bei vielen Signalwegen in der Zelle ausüben. Zudem besitzen PTPs eine hohe Spezifität für bestimmte phosphorylierte Proteine, teilweise sogar für spezielle Phosphorylierungsstellen an den Substraten (Tonks & Neel, 2001).

### **1.3.1 Die PTP-Familie**

Im menschlichen Genom befinden sich 107 Gene für Protein-Tyrosin Phosphatasen, die sich in vier PTP-Familien einordnen lassen (Alonso *et al.*, 2004). **Abbildung 1.4** gibt einen Überblick über die Mitglieder der Klasse-1 Cystein-basierten Familie, welche mit 99 Mitgliedern die weitaus größte Gruppe darstellt. Ihre Mitglieder zeichnen sich durch ein besonderes Signatur-Motiv H-C-X-X-G-X-X-R (HC<sub>x</sub>R) im aktiven Zentrum aus. Das hoch konservierte Cystein innerhalb der Signatur dient in allen PTPs zur Hydrolyse des Phosphatrestes am Zielprotein (Li & Dixon, 2000). Die Klasse-1 Cystein-basierte Familie wird weiter in "klassische PTPs" und "dual specificity PTPs (DSPs)" eingeteilt, zu denen auch PTEN gehört. Die 38 zur Zeit bekannten klassischen PTPs hydrolysieren ausschließlich phosphorylierte Tyrosine (pTyr), wohingegen die 61 bekannten DSPs typischerweise auch Serin- (pSer) und Threonin- (pThr) Seitenketten dephosphorylieren. Die Klasse-2 und Klasse-3 Cys-basierten und die Klasse-4 Asp-basierten PTPs enthalten zusammen sieben Mitglieder, wobei die Einteilung in diese Gruppen noch als vorläufig betrachtet werden muß (Alonso *et al.*, 2004). Sie werden hier nicht näher behandelt. PTP1B und CD45 sind prototypische Mitglieder der klassischen PTPs, auf die im Folgenden näher eingegangen wird. Sie besitzen eine oder zwei PTP-Domänen, bei denen es sich um konservierte strukturelle Motive von etwa 250 Aminosäuren handelt. Diese enthalten auch das aktive Zentrum. Die Struktur des aktiven Zentrums einer PTP bestimmt deren Spezifität für pTyr oder pSer und pThr (Barford *et al.*, 1994). Klassische PTPs werden weiter unterteilt in Transmembran-Rezeptorähnliche PTPs (RPTPs) und intrazelluläre nicht-Rezeptor PTPs (NRPTPs). Ausschlaggebend für die Einteilung sind die flankierenden Sequenzen der Phosphatase-Domäne(n). Flankierende Sequenzen regulieren die katalytische Aktivität der PTPs sowohl direkt als auch indirekt durch Interaktion mit anderen Proteinen.



potentieller Interaktionspartner von PTP-1B identifiziert werden (Flint *et al.*, 1997). Solche "Substrate Trapping" Mutanten kamen auch in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz.

Die 17 Mitglieder der cytosolischen NRPTPs besitzen besonders viele Strukturmodule zur Interaktion mit anderen Proteinen. Die Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 sind gut untersuchte Beispiele dafür, wie die Kooperation zwischen der Phosphatase-Domäne und Protein-Interaktions Domänen Einfluß auf die Substratspezifität und Aktivität des Enzyms hat. Beide PTPs sind eng miteinander verwandt (ca. 60 % Sequenzidentität) und besitzen eine vergleichbare Topologie : Sie sind jeweils mit zwei aminoterminalen SH2-Domänen, welche an phosphorylierte Tyrosine binden, und einer PTP-Domäne ausgestattet. In Abwesenheit von Liganden falten sich die SH2-Domänen über das aktive Zentrum der Phosphatase, wodurch der Zugang zu Substraten blockiert wird (Hof *et al.*, 1998). Sobald die SH2-Domänen von SHP-1 oder SHP-2 einen phosphorylierten Liganden binden, nimmt das Enzym eine offene Konformation mit 100-facher Erhöhung der Aktivität an. Unter physiologischen Bedingungen bringt die Bindung von Liganden an die SH2-Domäne das phosphorylierte Substrat in Apposition zur PTP-Domäne (Pei *et al.*, 1994; Pluskey *et al.*, 1995).

SHP-1 ist ein Negativ-Regulator zahlreicher hematopoietischer Signalwege, welche durch Cytokin-, Wachstumsfaktor-, Antigen-Rezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle aktiviert werden (Tamir *et al.*, 2000). In diesen Signalwegen wird SHP-1 meistens durch seine SH2-Domäne zu den Rezeptoren rekrutiert. Ein Beispiel für die direkte Bindung mit SHP-1 sind die inhibitorischen Rezeptoren CD22, Pir-B/p91A, Shps-1/Sirp $\alpha$ 1 und der "Killer Inhibitory Receptor" von NK Zellen (Ravetch & Lanier, 2000). SHP-2 dagegen fungiert meistens als Positiv-Regulator. Fibroblasten von SHP-2 homozygot defizienten Mäusen zeigen Defekte in verschiedenen Signalkaskaden von Wachstumsfaktoren (Saxton *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1998) und Integrinen (Yu *et al.*, 1998; Oh *et al.*, 1999). SHP-2 beeinflusst die EGF-Rezeptor Signaltransduktion positiv (Qu *et al.*, 1999). Die SHP-2 Homologe aus *Drosophila* und *C.elegans* sind ebenfalls wichtige positive Komponenten von Wachstumsfaktor-Rezeptor Signaltransduktionswegen (Van Vactor *et al.*, 1998).

Die Spezifität der Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 wurde anhand von Proteinchimären beider Moleküle *in-vivo* untersucht. Aus den Studien ging hervor, daß die *Phosphatasedomänen* die Determinanten für Substratspezifität enthalten (Tenev *et al.*, 1997). Diese Daten sprechen für ein kombinatorisches Spezifitäts-Modell, in welchem die Phosphatase durch flankierende Domänen wie der SH2-Domäne an den richtigen Ort in der Zelle rekrutiert wird. Durch die Phosphatasedomäne findet dann die Auswahl des korrekten Substrates statt (Tonks & Neel, 2001). Wie dies genau geschieht, ist zur Zeit noch unklar. Kristallstrukturen von PTP-Substrat-Komplexen könnten über den Mechanismus Aufschluß geben.

### 1.3.1.2 Rezeptor PTPs (RPTPs)

Die meisten RPTPs besitzen zwei Phosphatasedomänen, der Grund hierfür ist jedoch unbekannt. In fast allen Fällen ist bei ihnen die zweite, carboxyterminale PTP-Domäne katalytisch inaktiv, könnte aber regulatorische Funktionen ausüben. Eine Ausnahme bildet die Typ-III Unterfamilie, der DEP-1 und VE-PTP angehören. Sie besitzen eine große Zahl von Fibronectin-III Motiven im extrazellulären Teil und nur eine Phosphatasedomäne. Alle klassischen RPTPs besitzen eine helikale Transmembrandomäne und befinden sich hauptsächlich an der Plasmamembran, wo sie mit der extrazellulären Umgebung interagieren können. Bis auf PTP $\alpha$  und PTP $\epsilon$  besitzen alle RPTPs ausgedehnte extrazelluläre Domänen mit verschiedenen Strukturmotiven (siehe **Abb. 1.4**).

RPTPs werden, wie der Name andeutet, aufgrund der Organisation ihrer extrazellulären Domäne für Rezeptoren gehalten. Daher könnte die Interaktion mit Liganden ihre Spezifität zumindest teilweise bestimmen. Allerdings sind bisher nur wenige Liganden für RPTPs bekannt.

Einige RPTPs, darunter RPTP $\mu$  und RPTP $\kappa$ , interagieren miteinander durch homophile Bindung von Molekülen auf benachbarten Zellen (Brady-Kalnay, 1998). Dies gibt Anlaß zur Vermutung einer Funktion von RPTPs bei Vorgängen, die durch den Kontakt von Zellen eingeleitet werden, wie der Inhibition von Zellwachstum. Kürzlich wurde eine Beteiligung von DEP-1/CD148 bei der Kontakthinderung von VEGF-induzierter Proliferation in Endothelzellen vorgeschlagen (Lampugnani *et al.*, 2003).

Andere RPTPs besitzen Eigenschaften von Zelladhäsionsmolekülen und sind an der Bildung von Zellkontakten beteiligt (Brady-Kalnay & Tonks 1995). Die Phosphatase RPTP  $\zeta/\beta$  beispielsweise spielt eine Rolle bei der neuronalen Migration. Sie wird an der Oberfläche von Glia-Zellen exprimiert und ist ein Ligand des axonalen Zellerkennungsmoleküles Contactin. Diese Interaktion leitet das Auswachsen von Neuriten an Glia-Axon Kontaktstellen ein (Peles *et al.*, 1995). Weitere interessante RPTP  $\zeta/\beta$ -Interaktionspartner sind N-CAM, Ng-CAM und Tenascin (Milev *et al.*, 1994), die eine Beteiligung der Phosphatase bei der Entwicklung des Zentralnervensystems nahelegen. Am besten charakterisiert ist jedoch die Interaktion von RPTP  $\zeta/\beta$  mit Pleiotrophin, welche zu einer Inhibition der Phosphatase führt und die Migration von kortikalen Neuronen der Ratte *in-vitro* fördert (Maeda *et al.*, 1998).

Die hematopoietische Phosphatase CD45, welche zu den am intensivsten studierten Phosphatasen gehört, interagiert über die extrazelluläre Domäne mit Galectin-1. Folge der Interaktion ist eine verringerte Aktivität der Phosphatase *in-vitro* (Walzel *et al.*, 1999). Stamenkovic *et al.* beschrieben 1991 das B-Zell-spezifische Oberflächenprotein CD22, ein inhibitorisches Signalmolekül, als Interaktionspartner für eine CD45-Isoform. Die Bedeutung der Interaktion ist jedoch unklar.

Für die Phosphatase RPTP Lar wurde eine Interaktion mit dem Laminin/Nidogen Komplex über die fünfte extrazelluläre FN-III-Domäne gezeigt die von Bedeutung für die Adhäsion der Zelle an Komponenten der Extrazellulären Matrix sein könnte (O'Grady *et al.*, 1998).

Die strukturelle Analyse von RPTP $\alpha$  führte zur Hypothese einer Liganden-induzierten Inhibition von RPTPs durch Dimerisierung (Bilwes *et al.*, 1996). Die Hypothese erfuhr Unterstützung durch die Analyse von RPTP $\alpha$  - Mutanten und die *in-vitro* Beobachtung der Dimerisierung auf der Zelloberfläche (Jiang *et al.*, 1999 + 2000). Transgene Mäuse mit mutiertem, konstitutiv aktivem CD45 besitzen einen letalen Phänotyp, der die Notwendigkeit der dimerisierungsabhängigen Negativ-Regulierung von CD45 *in-vivo* bekräftigt (Majeti *et al.*, 2000). Ob das Modell auf andere PTPs unter physiologischen Bedingungen übertragbar ist, bleibt allerdings fraglich; die strukturelle Analyse von RPTP $\mu$  (Hoffmann *et al.*, 1997) und RPTP Lar (Nam *et al.*, 2000) schließt eine Inaktivierung dieser Phosphatasen durch Dimerisierung aus.

Zudem könnte die katalytisch inaktive Phosphatasedomäne der meisten RPTP Unterfamilien durch Bindung an regulatorische Proteine eine Rolle bei der Wahl des Substrates spielen. Einige solcher Bindungspartner beeinflussen die subzelluläre Lokalisierung der Phosphatase. Dies wurde gezeigt für Fodrin als Bindungspartner für CD45 (Lokeshwar *et al.*, 1992) und Liprin für RPTP Lar (Serra-Pages *et al.*, 1998).

Generell präsentiert die Modulierung der Aktivität und Auswahl von Substraten durch Bindung von RPTPs an Proteinpartner einen potentiellen Mechanismus zur Dirigierung der Funktion der Phosphatasen.

### **1.3.2 Die Bedeutung von Phosphatasen für den Zellkontakt**

Einige Nicht-Rezeptor PTPs sind als Assoziationspartner des Cadherin-Catenin Komplexes beschrieben worden. Ukropec *et al.* fanden 2000 in Endothelzellen folgende Korrelation : Nach Thrombin-Stimulierung des Endothels ist eine transiente Phosphorylierung der Catenine, nicht jedoch von VE-Cadherin selbst nachweisbar. Die Phosphorylierung geht mit einer gleichzeitigen SHP-2 Dissoziierung vom VE-Cadherin-Catenin Komplex einher. In der gleichen Studie werden biochemische Hinweise für  $\beta$ -Catenin als direkten SHP-2-Interaktionspartner gezeigt. In einer weiteren Arbeit wurde demonstriert, daß die Applikation von Scherkräften auf Endothel die Phosphorylierung von VE-Cadherin-assoziiertem  $\beta$ -Catenin zur Folge hat. Dies korreliert mit einer gleichzeitigen Dissoziierung von  $\alpha$ -Catenin und SHP-2 vom VE-Cadherin Komplex (Ukropec *et al.*, 2002).

PTP-1B wurde als regulatorische Phosphatase für N-Cadherin beschrieben. Überexpression einer katalytisch inaktiven Form von PTP-1B bewirkte eine verminderte Cadherin-vermittelte Zelladhäsion in L-Zellen, die N-Cadherin konstitutiv exprimieren. Sowohl die katalytisch aktive als auch inaktive Form von PTP-1B sind aber in der Lage, an N-Cadherin zu binden. Auch hier scheint der Effekt der Phosphatase auf der Dephosphorylierung von  $\beta$ -Catenin zu beruhen, welche die Cadherin-Aktin Bindung verstärkt (Balsamo *et al.*, 1996 + 1998).

Interessanterweise interagieren auch zahlreiche Rezeptor-PTPs mit dem Cadherin-Catenin Komplex. In verschiedenen Geweben sind PTP $\mu$  und PTP $\kappa$  als ein Bindungspartner von Cadherinen und Cateninen (sowohl  $\alpha$  und  $\beta$ ) identifiziert worden, wobei zur PTP $\mu$  Interaktion mit E-Cadherin widersprüchliche Daten vorliegen (Brady-Kalnay *et al.*, 1995 + 1998, Zondag *et al.*, 1996). Jedoch ist PTP $\mu$  als funktioneller Interaktionspartner von N-Cadherin beschrieben. Beide Moleküle interagieren miteinander durch direkte Bindung der cytoplasmatischen Domänen in Retina-Zellen. Die Herabregulierung der PTP $\mu$ -Expression durch Antisense Technologie bewirkt ein vermindertes Auswachsen von Neuriten aus Retina Explantations-Kulturen auf N-Cadherin-, nicht jedoch auf Laminin- oder L1-Substraten (Burden-Gulley & Brady-Kalnay, 1999). Zondag *et al.* zeigten 2000 eine Interaktion zwischen RPTP $\mu$  und p120<sup>ctn</sup>, nicht aber mit  $\beta$ -Catenin. p120<sup>ctn</sup> wird von der Phosphatase *in-vitro* dephosphoryliert, für die Bindung sind beide Phosphatasedomänen notwendig. PTP $\kappa$  bindet an  $\beta$ -Catenin und  $\gamma$ -Catenin/Plakoglobin *in-vitro* und *in-vivo*. Die Expression der Phosphatase wird durch Zelldichte reguliert und  $\beta$ -Catenin ist ein Substrat für PTP $\kappa$  *in-vitro* (Fuchs *et al.*, 1996). Neben den bereits erwähnten Liganden für RPTP  $\zeta/\beta$  (**siehe oben**) kann auch diese Phosphatase  $\beta$ -Catenin *in-vitro* binden und dessen Dephosphorylierung katalysieren. Die Inhibition der Phosphatase durch Zugabe von Pleiotrophin, welches an deren extrazelluläre Domäne bindet, bewirkt eine drastische Zunahme der  $\beta$ -Catenin Tyrosin Phosphorylierung (Meng *et al.*, 2000).

Einige Arbeiten demonstrieren die Lokalisation von Rezeptor-Protein Tyrosin Phosphatasen an Zell-Zell- und Zell-Substrat Kontakten. Dies gilt vornehmlich für RPTPs vom Typ IIa, zu denen RPTP Lar gehört und die den Typ III Phosphatasen in ihrer extrazellulären Domäne ähneln. Liprin- $\alpha$  und Lar lokalisieren in Fibroblasten gemeinsam in "Focal Adhesions" (Serra-Pages *et al.*, 1998). "Focal Adhesions" sind Kontaktstellen zwischen Zellen und dem darunterliegenden Substrat. Zahlreiche cytoskelettale- und Signalproteine sind an solchen Strukturen konzentriert (Sastry & Burridge, 2000).

Weiterhin sind RPTP Lar und RPTP $\sigma$  in der "Adherens Junction" zwischen benachbarten Zellen lokalisiert. Jene Zell-Zellkontakte werden von Cadherinen aufgebaut (**siehe oben**). In Übereinstimmung hiermit wurden Plakoglobin und  $\beta$ -Catenin als direkte biochemische

Interaktionspartner des intrazellulären Teils von Lar nachgewiesen (Aicher *et al.*, 1997). Weitere Studien bestätigen die Bindung von  $\beta$ -Catenin und RPTP Lar (Kypta *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1999). Experimente in *Drosophila* argumentieren für eine funktionelle Interaktion von Dlar mit N-Cadherin, welche bei der Regulierung der Führung von Photorezeptor-Axonon von Bedeutung ist (Johnson & van Vactor, 2003).

In einer Reihe von Studien wurde zudem die Bedeutung der Zelldichte, welche Einfluß auf die Stabilität der Adherens Junction hat, für die Aktivität von Phosphatasen demonstriert. Paradebeispiel hierfür ist die Density Enhanced Phosphatase DEP-1, deren Expression und Aktivität mit steigender Konfluenz zunimmt (Ostmann *et al.*, 1994). Die Bedeutung von DEP-1 für das Gefäßsystem wurde durch die Analyse einer homozygot defizienten Maus demonstriert, die eine Funktion von DEP-1 für die Regulierung der Proliferation von Endothelzellen und deren Interaktion mit Perizyten nahelegt (Takahashi *et al.*, 2003). Suzuki *et al.* zeigten 2000, daß kontaktinhibierte HUVECs durch die Behandlung mit dem PTP-Inhibitor Natrium Pervanadat zum Wiedereintritt in den Zellzyklus gezwungen werden können. Folglich kann eine Beteiligung von PTPs an Mechanismen erwartet werden, welche die Proliferation von Endothelzellen betreffen. Dies wurde durch die kürzlich veröffentlichte Arbeit von Lampugnani *et al.*, 2003 bestätigt.

In vaskulären Endothelzellen wurde die zell-dichteabhängige Zunahme von Pervanadat-sensitiver Phosphataseaktivität als Ursache für die Herunterregulierung von p42/p44 MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) diskutiert. Die Inhibition der p42/p44 MAPK Aktivität durch den Zell-Zellkontakt ist ein wichtiger Schritt beim Verlassen des Zellzyklus in Endothelzellen (Vinals & Pouyssegur, 1999). Auch die Expression von hPTP- $\beta$  mRNA nimmt mit steigender Zelldichte zu und reflektiert so die Zunahme der Gesamtaktivität von membrangebundenen PTPs (Gaits *et al.*, 1995).

### **1.3.3 Die Vaskuläre Endotheliale Protein-Tyrosin Phosphatase**

Die vorliegende Arbeit nimmt zum Teil die Daten zweier Publikationen der jüngeren Vergangenheit zur Grundlage weiterführender Studien, welche die Bedeutung der Vaskulären Endothelialen Protein-Tyrosin Phosphatase (VE-PTP) für Vorgänge im Endothel untersuchen.

Fachinger *et al.* isolierten 1999 eine Rezeptor-PTP, deren mRNA während der gesamten Entwicklung der Maus spezifisch in vaskulären Endothelzellen exprimiert wird. Sie ist das murine Homolog zur bereits 1990 beschriebenen humanen Typ III Phosphatase hPTP $\beta$  (Krueger *et al.*, 1990). hPTP $\beta$  ist nicht zu verwechseln mit RPTP $\zeta/\beta$ , bei der es sich um eine Typ V Phosphatase handelt. VE-PTP wurde als Interaktionspartner des

endothelspezifischen Angiopoietin-Rezeptors TIE-2 beschrieben, den es *in-vitro* dephosphoryliert. Die VE-PTP-TIE-2 Interaktion wird von den intrazellulären Domäne beider Proteine vermittelt. Im Gegensatz dazu war keine Interaktion zwischen VE-PTP und der ebenfalls endothelspezifischen Rezeptor-Tyrosin Kinase VEGFR-2 nachweisbar. Kürzlich wurde VE-Cadherin erstmalig als direkter Ligand der extrazellulären VE-PTP-Domäne beschrieben. Die jeweils membranproximale Cadherin- bzw. Fibronectin-III-Domäne der Moleküle sind für die Interaktion ausreichend. In transfizierten Zellsystemen konnte eine VE-PTP-abhängige Dephosphorylierung von VE-Cadherin gezeigt werden. Parallel hierzu wurde eine verminderte parazelluläre Permeabilität und verstärkte Aggregation transfizierter CHO-Zellen gemessen. Dies demonstriert eine erhöhte VE-Cadherin-vermittelte Stabilität des Zellkontaktes nach Induktion von VE-PTP (Nawroth *et al.*, 2002).

### 1.4 Die Adherens Junction und vaskuläre Permeabilität

Wie bereits erwähnt, kontrollieren Endothelzellen die Passage von Plasmaproteinen und zirkulierenden Blutzellen. Hierfür kommen der tanzelluläre Weg durch die Endothelzelle hindurch oder der parazelluläre Weg durch Lücken am endothelialen Zell-Zellkontakt in Frage. Allerdings wurde von den meisten Wissenschaftlern die parazelluläre Route als generelles Paradigma akzeptiert (Vestweber, 2000; Luscinikas *et al.*, 2002; Engelhardt & Wolburg, 2004).

Eine Studie, welche die Vorgänge bei der Transmigration von Leukozyten durch Endothel mittels Echtzeit-Mikroskopie unter Zuhilfenahme eines VE-Cadherin-GFP (Green Fluorescent Protein) Fusionsproteines untersuchte, etablierte die Beteiligung von VE-Cadherin für die Transmigration in Form der transienten und reversiblen Bildung einer Lücke im VE-Cadherin positiven Zellkontakt, die nach Durchtritt des Leukozyten wieder verschlossen wurde. Es konnte ausschließlich Transmigration auf parazellulärem Wege beobachtet werden (Shaw *et al.*, 2001).

Für VE-Cadherin wurde eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Permeabilität *in-vitro* und *in-vivo* demonstriert. Transfektion von humanem VE-Cadherin in CHO Zellen führt zu verminderter parazellulärer Permeabilität und Migration von Zellen (Breviario *et al.*, 1995). Die Blockierung der *trans*-Dimerisierung von VE-Cadherin und die Ausbildung von Zellkontakten durch monoklonale Antikörper führt zu einer verringerten elektrischen Resistenz endothelialer Zellschichten und der erhöhten Auswanderung von Neutrophilen in einem *in-vivo* Peritonitis-Modell (Gotsch *et al.*, 1997).

In einer Arbeit von Corada *et al.*, 1999 bewirkte die Injektion von Antikörpern gegen VE-Cadherin in Mäuse eine erhöhte vaskuläre Permeabilität im Herzen und in der Lunge und

veränderte selektiv die Lokalisation von VE-Cadherin am Zellkontakt. Andere Zellkontakt-Proteine wie PECAM-1 und JAM wurden nicht beeinflusst. Aufgrund der Variation des Effektes auf verschiedene Organe kann die Bedeutung von VE-Cadherin für die Kontrolle der vaskulären Permeabilität möglicherweise von der Struktur anderer Zellkontakte oder der Position innerhalb der Vaskulatur abhängen. Dies wird auch durch die Beobachtung gestützt, daß die Adherens Junction in schnell wachsenden Gefäßen andere Charakteristika besitzt als in ruhender Vaskulatur. So ist das Gefäßsystem von Tumoren besonders empfindlich gegenüber einigen VE-Cadherin blockierenden Antikörpern, die keinen Effekt auf die systemische Vaskulatur ausüben (Corada *et al.*, 2002; Liao *et al.*, 2002).

Ergebnisse von Huang *et al.* belegten 1993 die Abnahme des elektrischen Widerstandes einer Endothelzellschicht nach Bindung von Neutrophilen an die apikale Zellmembran. Die Bindung bewirkte die Freisetzung von intrazellulärem  $Ca^{2+}$ . Die Blockierung jener Freisetzung durch membrangängige Chelatoren verhinderte auch die Neutrophilen-induzierten Effekte im Endothel. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung der intrazellulären Freisetzung von Calcium durch Histamin, Thrombin und der antikörpervermittelten Stimulierung von Zelladhäsionsmoleküle von Interesse (Rotrosen & Gallin, 1986; Laposata *et al.*, 1983; Lorenzon *et al.*, 1998). In einer weiteren Studie demonstrierten Hixenbaugh *et al.*, 1997 die Phosphorylierung der leichten Myosinkette als Folge der Bindung von aktivierten Neutrophilen an Endothelzellen und dadurch bedingt den Aufbau von isometrischer Spannung.

### **1.4.1 Tyrosin Phosphorylierung**

Die Tyrosin-Phosphorylierung von Komponenten des endothelialen Zell-Zellkontaktes könnte einen wichtigen Mechanismus zur Kontrolle der vaskulären Permeabilität darstellen. Für Cadherin-Catenin Komplexe ist die Tyrosin-Phosphorylierung gut belegt, sie wird im Zusammenhang mit der Adhäsivität der Zellen gesehen (Daniel & Reynolds, 1997). In **Kapitel 1.3.2** wurde zudem die Bedeutung von PTPs für den Zellkontakt erläutert.

Die Zugabe von Substanzen, welche die Permeabilität von Endothel erhöhen, führte im Falle von Thrombin, VEGF und Histamin zu einer verstärkten Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin-assoziierten Proteinen oder VE-Cadherin selbst.

Für Thrombin ist der Effekt auf die Dissoziation der Phosphatase SHP-2 vom VE-Cadherin-Catenin Komplex zurückzuführen, obgleich nach Stimulierung nur die Tyrosin-Phosphorylierung der Catenine erhöht ist. Zusätzlich ist mikroskopisch eine veränderte

Lokalisierung von AJ-Komponenten in der Zelle und biochemisch ein Zerfall des VE-Cadherin-Catenin Komplexes zu verzeichnen. Die Wirkung von Thrombin auf die endotheliale Permeabilität und den VE-Cadherin Komplex wird durch Protein-Kinase C (PKC) Inhibitoren unterdrückt (Rabiet *et al.*, 1996; Ukropec *et al.*, 2000).

Histaminzugabe zu hoch konfluentem Endothel führt zu einer verstärkten Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin und assoziierten Cateninen, verbunden mit einer VE-Cadherin Dissoziation vom Cytoskelett. Der Effekt wurde nicht in Zellen beobachtet, die erst kurze Zeit konfluent waren. Allerdings führt Histamin unabhängig von der Zelldichte zu einer Erhöhung der parazellulären Permeabilität (Andriopoulou *et al.*, 1999).

Die Stimulierung von Endothel mit VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) führt *in-vitro* zu einer schnellen und transienten Phosphorylierung des Cadherin-Catenin-Komplexes, verbunden mit einer erhöhten Permeabilität und Umverteilung von VE-Cadherin von den Zell-Kontaktstellen (Esser *et al.*, 1998; Wright *et al.*, 2002). In einer aktuellen Studie wurde *in-vivo* der VEGF-abhängige Zerfall eines Komplexes aus VE-Cadherin, VEGFR-2 und  $\beta$ -Catenin demonstriert. Der Zerfall geht mit der erhöhten Phosphorylierung aller Komponenten des Komplexes einher. Die pharmakologische Inhibition von Src-Kinasen zeigte deren Notwendigkeit für den VEGF-vermittelten Effekt auf VE-Cadherin und seine assoziierten Partner (Weis *et al.*, 2004).

Ähnliche Effekte lassen sich nach Zugabe von aktivierten Neutrophilen zu venösem Endothel feststellen. Nach Inkubation erhöht sich die Permeabilität von coronaren Endothelzellen für Albumin. Des weiteren wurde in der Immunfluoreszenz eine Umverteilung von VE-Cadherin und  $\beta$ -Catenin festgestellt. Die Tyrosin-Phosphorylierung beider Moleküle war nach Stimulierung signifikant erhöht (Tinsley *et al.*, 1999).

Die Transformation von Hühner-Epithelzellen mit Src-Kinasen führt zu einer veränderten Zell-Morphologie mit spezifisch beeinträchtigten Adherens-Junctions. Weiterhin läßt die Behandlung dieser Zellen mit Pervanadat darauf schließen, daß Zell-Zellkontakte Orte mit sehr hoher Aktivität von Protein-Tyrosin Kinasen sind (Volberg *et al.*, 1991+1992). Verschiedene Mitglieder der Familie der Src-Kinasen sind am Zellkontakt konzentriert und können den Cadherin-Catenin-Komplex effektiv an seinen Tyrosin-Resten phosphorylieren (Tsukita *et al.*, 1992; Matsuyoshi *et al.*, 1992). Folge der Phosphorylierung ist, wie für E- und N-Cadherin gezeigt, eine reduzierte Adhäsion, die wahrscheinlich auf der verminderten Assoziation der Catenine mit dem Cytoskelett beruht (Behrens *et al.*, 1993; Hamaguchi *et al.*, 1993). Das Hauptsubstrat für Src Kinasen in dem Cadherin-Catenin-Komplex ist  $\beta$ -Catenin, und die Tyrosin-Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin korreliert mit einer N-Cadherin Dissoziation vom Aktin Cytoskelett (Balsamo *et al.*, 1996). Dies spricht für das Konzept der

Änderung des Zell-Zellkontaktes durch Phosphorylierung von Komponenten der Cadherin-Catenin Komplexe.

Durch *in-vitro* Daten ist inzwischen die Veränderung der Zusammensetzung der Adherens Junction mit steigender Zelldichte gut belegt. In subkonfluenten Zellen liegt VE-Cadherin stark Tyrosin-phosphoryliert vor und bindet vorwiegend an  $\beta$ -Catenin und p120. Dagegen ist in hoch konfluenten Zellen der Assoziationsgrad mit Plakoglobin ( $\gamma$ -Catenin) höher und p120 niedriger. Zudem ist eine geringere Tyrosin-Phosphorylierung des VE-Cadherin-Catenin Komplexes bei hoher Zelldichte zu verzeichnen (Lampugnani *et al.*, 1995 + 1997).

### **1.4.2 Assoziation mit dem Cytoskelett**

Die verringerte Tyrosin-Phosphorylierung bei hoher Zelldichte ist mit einer verstärkten Assoziation des VE-Cadherin-Catenin Komplexes mit dem Aktin-Cytoskelett korreliert (Bazzoni & Dejana, 2004). Dies wird generell über den Anteil der Proteine in der Detergens-unlöslichen Fraktion bestimmt. Die Transfektion der cytoplasmatischen VE-Cadherin-Domäne in Endothelzellen führt zu einer verminderten Bindung von VE-Cadherin an das Cytoskelett und erhöhter vaskulärer Permeabilität. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Konkurrenz des Konstruktes mit endogenem VE-Cadherin um die Bindung mit  $\beta$ -Catenin (Guo *et al.*, 2004). Zudem ist eine cytoplasmatische VE-Cadherin Deletionsmutante, der die  $\beta$ -Catenin Bindungsstelle fehlt, zwar noch Bestandteil des Zell-Zellkontaktes und zur Vermittlung von calciumabhängiger Zell-Zell Aggregation befähigt, jedoch weitaus weniger effektiv im Aufbau einer Permeabilitätsbarriere für hochmolekulare Substanzen. Dies läßt den Schluß zu, daß die Assoziation mit dem Aktin-Cytoskelett vermutlich nicht für die erste Etablierung von Zell-Zellkontakten, wohl aber für deren Verfestigung notwendig ist (Navarro *et al.*, 1995).

In allen beschriebenen Fällen ist die Zunahme der Permeabilität von Endothel durch exogene Substanzen mit der Dissoziation von VE-Cadherin vom Cytoskelett verbunden (Lampugnani *et al.*, 1997; Andriopoulou *et al.*, 1999). In Epithelzellen wurden ähnliche Beobachtungen für E-Cadherin gemacht (Kuroda *et al.*, 1998; Vasioukhin *et al.*, 2000). Diese Studien etablierten das Protein IQGAP1, einen Effektor für die GTPasen Rho, Cdc42 und Rac1, als Negativ-Regulator für die Cadherin-vermittelte Zell-Zell Adhäsion.

Der Mechanismus funktioniert bei Aktivierung von IQGAP1 über die Verdrängung von  $\alpha$ -Catenin von seinem Bindungspartner  $\beta$ -Catenin, was zur Dissoziation des Cadherin-Catenin Komplexes vom Aktin-Cytoskelett und letztlich der Zellen selbst führt. Cdc42 und Rac1 fördern die Cadherin-vermittelte Zell-Zell Adhäsion, indem sie IQGAP1 inhibieren.

Eine physiologische Bedeutung kommt dem System nach der Behandlung von MDCK-II Zellen mit Hepatocyte Growth Factor zu, die zur Separation der Zellen voneinander führt (Ho *et al.*, 1999; Fukata *et al.*, 2001) .

### **1.5 Transendotheliale Migration von Leukozyten**

Die Transmigration von Leukozyten durch das Endothel bei Entzündungsprozessen ist ein fein regulierter und aktiver Prozeß für alle beteiligten Zellen. Endothelzellen kommt hierbei eine besondere Bedeutung zu, da sie die Transmigration kontrollieren und fördern. Dieses Kapitel soll einen kurzen Überblick über die Adäsionskaskade geben und wird sich auf die parazelluläre Transmigration durch endotheliale Zell-Zellkontakte beschränken.

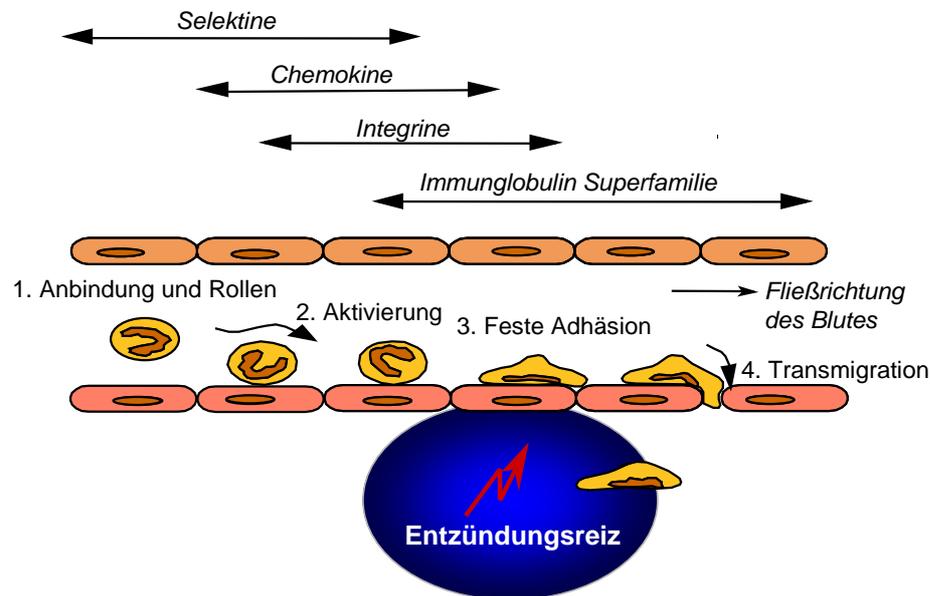
Das Immunsystem in Vertebraten dient dem Schutz des Organismus vor pathogenen Mikroorganismen, körperfremdem biologischen Material und entarteten körpereigenen Zellen. Zu diesem Zweck zirkulieren spezialisierte Zellen des Immunsystems im Blutstrom. Granulozyten und Makrophagen des angeborenen Immunsystems wandern, beispielsweise bei Bakterienbefall, in periphere Gewebe und lösen eine Entzündungsreaktion aus. Neben der Phagozytose der Krankheitserreger und Prozessierung derer Antigene für das adaptive Immunsystem werden von den Zellen Entzündungsmediatoren ausgeschüttet. Diese dienen als Botenstoffe für weitere Leukozyten und induzieren die Expression von Transmembranproteinen auf der Oberfläche von Endothelzellen, welche die Auswanderung von Leukozyten aus der Vaskulatur erleichtern.

Lymphozyten, zu denen T- und B-Zellen gehören, sind spezialisierte Zellen, die körperfremde Antigene über spezifische Rezeptoren erkennen. Tritt ein solcher Fall ein, vermehren sie sich durch Zellteilung und bekämpfen das fremde Antigen durch Aktivierung von Makrophagen oder B-Zellen, die wiederum Antikörper sezernieren. Zudem schütten auch Lymphozyten entzündungsfördernde Botenstoffe aus. Um ihrer Aufgabe gerecht zu werden, zirkulieren Lymphozyten ständig zwischen Blutbahn und lymphatischen Organen. Hierfür müssen sie die Gefäßwand der Vaskulatur oder des lymphatischen Systems überwinden

#### **1.5.1 Die Leukozyten-Adhäsionskaskade**

Die Auswanderung der Leukozyten aus dem Blut stellt somit einen der zentralen Schritte für die Funktion des Immunsystems dar. Er erfordert eine strenge Regulierung, um übermäßige Auswanderung zu verhindern und die Barrierefunktion der Blutgefäße aufrecht

zu erhalten. Diese Regulierung findet auf der Ebene der Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen statt (Panes & Granger, 1998). Die Interaktion wird in vier Schritte einer **Adhäsionskaskade** unterteilt, die in **Abbildung 1.5** schematisch dargestellt ist.



**Abbildung 1.5** : Schematische Darstellung der Leukozyten-Adhäsionskaskade

Im ersten Schritt vermitteln Selektine die schnelle Anheftung des Leukozyten an das Endothel, gefolgt vom "Rollen" auf der Endothelzelle. Selektine, von denen bislang drei Vertreter bekannt sind, binden an die Zuckerreste stark glykosylierter Selektin-Liganden auf Leukozyten. Dieser Prozeß ist schnell und erfolgt mit hoher Affinität, um das effektive Festhalten des Leukozyten im Blutstrom zu gewährleisten (Vestweber & Blanks, 1999). Nach dem ersten Kontakt mit der Endothelzelle rollen die Leukozyten in Fließrichtung des Blutstromes auf der Gefäßwand entlang.

Auf der Endothelzelle werden E- und P- Selektin exprimiert, auf Leukozyten L- Selektin. Als Liganden für Selektine dient die Zuckerstruktur Sialyl-Lewis<sup>x</sup> (S-Le<sup>x</sup>), welche auf Proteinen und Lipiden gefunden wird. S-Le<sup>x</sup> wird von Selektinen über eine Lectin-Domäne gebunden (Patel *et al.*, 2002).

Im zweiten Schritt findet die Aktivierung der rollenden Leukozyten statt, die von einer transienten zur festen Adhäsion ans Endothel führt und von Chemokinen vermittelt wird. Diese Botenstoffe sind kleine Moleküle, welche auf der Oberfläche von Endothelzellen präsentiert werden, z.B. durch Bindung an Proteoglykane (Tanaka *et al.*, 1993). Zur Zeit sind über 40 humane Chemokine bekannt, die in ihrer Wirkung zum Teil überlappende Funktionen besitzen (Ebnet & Vestweber, 1999). Ihnen gemeinsam ist die Interaktion mit G-Protein gekoppelten Chemokin-Rezeptoren auf den Leukozyten (Ward *et al.*, 1998;

Mantovani, 1999). Aktivierung der Rezeptoren führt zu einer morphologischen Veränderung der Leukozyten und der Aktivierung ihrer Integrine (Laudanna *et al.*, 2002).

Im dritten Schritt kommt es zu einer festen Adhäsion der Leukozyten mit der Gefäßwand. Hieran sind Zelladhäsionsmoleküle aus der Familie der Integrine und der Immunglobulin-Superfamilie beteiligt. Integrine sind transmembrane Glykoproteine, die aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit aufgebaut sind. Nach Aktivierung kommt es zur Konformationsänderung von einer gebogenen, inaktiven zu einer aufrechten, aktiven Form (Hynes, 2002). Die Leukozyten-Integrine  $\alpha_L\beta_2$  (LFA-1) und  $\alpha_M\beta_2$  (MAC-1) binden an ICAM-1 (Intercellular Cell Adhesion Molecule) auf der Endothelzelle, LFA-1 bindet auch an ICAM-2. Zahlreiche weitere Interaktionen von Leukozyten-Integrinen mit Liganden der Immunglobulin Superfamilie sind gezeigt worden (Stuiver & O'Toole, 1995; Panes & Granger, 1998).

Im vierten Schritt findet die Transmigration der Leukozyten durch das Endothel statt, die sehr zügig innerhalb weniger Minuten vollzogen wird. Zunächst bewegen sich die Leukozyten zu den endothelialen Zell-Zellkontakten. Voraussetzung hierfür ist eine dynamische, aber trotzdem feste Bindung durch die Integrine, damit die Zellen einerseits genug Bewegungsfreiheit für die Suche nach Zellkontakten haben, andererseits aber nicht immobilisiert werden. Für die parazelluläre Transmigration werden die Zellkontakte des Endothels transient geöffnet und nach Durchgang des Leukozyten wieder verschlossen, was ein komplexes Zusammenspiel zahlreicher Adhäsionsmoleküle erfordert (Vestweber, 2000; Engelhardt & Wolburg, 2004).

### **1.5.2 Der parazelluläre Weg durch den Zellkontakt**

Für die Migration von Leukozyten ist die Interaktion von LFA-1 und MAC-1 mit ICAM-1 von großer Bedeutung. Die Bindung von endotheliale ICAM-1 durch LFA-1 auf dem Leukozyt bewirkt die Ausbildung von Mikrovilli-artigen Ausstülpungen der Endothelzelle, welche jenen umgibt (Carman *et al.*, 2003). Eine ähnliche Struktur, in der die Moleküle ICAM-1 und VCAM-1 angereichert sind, wurde 2002 von Barreiro *et al.* beschrieben. Folglich scheint die Endothelzelle eine spezielle Plattform zum Andocken von Leukozyten zu bilden, in der zudem Komponenten des Cytoskeletts und dessen modifizierende Proteine akkumuliert sind. Für die Transmigration von Leukozyten ist die cytoplasmatische Domäne von ICAM-1 von Bedeutung, wohingegen der extrazelluläre Teil allein die Adhäsion von T-Zellen vermitteln kann (Greenwood *et al.*, 2003; Lyck *et al.*, 2003). Der intrazelluläre Teil von ICAM-1 aktiviert verschiedene Signaltransduktionswege in den Endothelzellen, die eine Veränderung des Cytoskeletts zur Folge haben (siehe **Kapitel 1.6**).

Die Zelladhäsionsmoleküle VE-Cadherin und PECAM-1 sind für die Extravasation von Leukozyten von Bedeutung. **Kapitel 1.4** befaßte sich bereits mit der Rolle von VE-Cadherin für die vaskuläre Permeabilität. PECAM-1, welches außerhalb der AJ lokalisiert ist, wurde als erstes Transmembranprotein des Zellkontaktes mit der Transmigration von Leukozyten in Verbindung gebracht. Seine Rolle für die Transmigration wurde in **Kapitel 1.1.5** angesprochen. Untersuchungen unter Einsatz des chronischen Entzündungsmodells EAE (Experimentelle Autoimmun Encephalitis) wiesen auf eine erhöhte zelluläre Infiltration in entzündetes Gewebe PECAM-1 defizienter Mäuse hin. Dies spricht für eine negative Regulierung der Leukozyten-Diapedese durch PECAM-1. Nach einem Entzündungsreiz zeigt PECAM-1 defizientes Endothel zudem eine verzögerte Wiederherstellung der Integrität des Zell-Zellkontaktes, wie durch Permeabilitätsmessungen beobachtet wurde (Grässer *et al.*, 2002; Tada *et al.*, 2003).

Weitere Zelladhäsionsmoleküle mit Funktionen für die Transmigration sind JAM-A und CD99. Antikörper gegen JAM-A inhibieren die Diapedese von Leukozyten *in-vitro* und *in-vivo* (Del Maschio *et al.*, 1999). Endotheliales JAM-A bindet LFA-1 auf aktivierten T-Zellen und vermittelt *in-vitro* die Transendotheliale Migration von Neutrophilen und Monozyten (Ostermann *et al.*, 2002; Martin-Padura *et al.*, 1998). Weitere Mitglieder der JAM Familie können ebenfalls an Integrine binden und unterstützen daher möglicherweise auch die Migration von Leukozyten (Ebnet *et al.*, 2004).

CD99 ist ein Zelladhäsionsmolekül, dessen Bedeutung bei der Transmigration erst kürzlich beschrieben wurde. Es ist in der Lage, homophile Interaktionen einzugehen. Antikörper gegen dieses Molekül inhibieren die Transmigration von Monozyten auf halbem Wege durch den Zellkontakt. Dies spricht für eine mögliche Funktion von CD99 bei der Migration durch die Junction selbst. Eine direkte Beteiligung von CD99 als Adhäsionsmolekül an der Transmigration ist allerdings fraglich, da offenbar eine Quervernetzung durch Antikörper stattfinden muß, was für einen Effekt durch Signalisierung spricht (Schenkel *et al.*, 2002; Bixel *et al.*, 2004). Im Gegensatz hierzu wird PECAM-1 eine Rolle bei der Passage der Leukozyten durch die perivaskuläre Basalmembran zugeschrieben (Wakelin *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 2001).

## **1.6 ICAM-1 Signalwege**

Bei der festen Adhäsion von Neutrophilen ist die Interaktion von  $\beta_2$ -Integrinen mit endotheliale ICAM-1 gut untersucht und von großer Bedeutung für die nachfolgenden Schritte (siehe auch **Kapitel 1.5**). Diese Interaktion führt, wie neuere Arbeiten belegen, zu Signalprozessen sowohl in Neutrophilen als auch in der Endothelzelle. In letzteren sind drastische Änderungen der Morphologie während der Leukozyten-Extravasation zu verzeichnen. In **Kapitel 1.4** wurden die Folgen der Zugabe von Leukozyten für die Integrität des Zellkontaktes erwähnt. Die Freisetzung von intrazellulärem Calcium und die Phosphorylierung von AJ- und Cytoskelett-Bestandteilen gelten als Voraussetzung für die Transmigration durch Endothel. In weiteren Studien wurden Calcium-unabhängige Mechanismen vorgeschlagen, welche den Umbau des endothelialen Cytoskelettes bereits nach der *Adhäsion* von aktivierten Neutrophilen an Endothel untersuchten. Jene Mechanismen beinhalten die Produktion von reaktiven Sauerstoff-Radikalen (ROS) und Intermediaten des Phosphatidyl-Inositol Signalweges (Wang & Doerschuk, 2000; Wang *et al.*, 2001).

In diesem Kapitel soll die Rolle von ICAM-1 als Signalmolekül dargestellt werden, welches für Vorgänge in der Endothelzelle nach der Adhäsion von Leukozyten von Bedeutung ist. ICAM-1 ist ein Transmembran-Glykoprotein der Immunglobulin Superfamilie. Es besitzt fünf extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen und einen kurzen cytoplasmatischen Teil (Simmons *et al.*, 1988). Die erste und dritte Ig-ähnliche Domäne sind verantwortlich für Dimerisierung des Moleküls und Bindung an die Leukozyten  $\beta_2$ -Integrine LFA-1 und MAC-1 (Marlin & Springer, 1987; Diamond *et al.*, 1999). ICAM-1 wird auf verschiedenen Zelltypen exprimiert, darunter Leukozyten und Endothelzellen. Seine konstitutive Expression auf der Zelloberfläche kann in Endothel durch eine Reihe proinflammatorischer Stimuli heraufreguliert werden, darunter Cytokine wie TNF- $\alpha$  oder LPS (Van de Stolpe & Van der Saag, 1996; Roebuck & Finnegan, 1999). Der intrazelluläre Teil von ICAM-1, der in der Ratte nur 27 Aminosäuren umfaßt, kann mehrere cytoplasmatische Proteine binden. Darunter sind Komponenten des Cytoskeletts wie  $\alpha$ -Actinin,  $\beta$ -Tubulin und ERM Proteine (Ezrin/Radixin/Moesin), die als Linker zwischen Aktin-Cytoskelett und integralen Membranproteinen fungieren. Die Bindung von Ezrin an ICAM-1 benötigt Phosphatidyl-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), was eine Regulierung der ICAM-1 Verankerung durch den Phosphatidyl-Inositol Signalweg nahelegt (Heiska *et al.*, 1998). Signalmoleküle könnten phosphorylierungsabhängig zum cytoplasmatischen Teil von ICAM-1 rekrutiert werden, der drei potentiell phosphorylierbare Tyrosine und eine (wenig homologe) ITIM Sequenz

enthält. Entsprechend wurde für phosphoryliertes ICAM-1 die Assoziation mit SHP-2 *in-vitro* gezeigt (Pluskota *et al.*, 2000).

Die ICAM-1 vermittelte Signalisierung kann über Ligation des Moleküls durch Antikörper, Fibrinogen oder der Zugabe von Leukozyten zu kultivierten Endothelzellen *in-vitro* untersucht werden. Mit Hilfe dieser experimentellen Systeme wurde die Beteiligung des Moleküls an einigen intrazellulären Signaltransduktionswegen gezeigt.

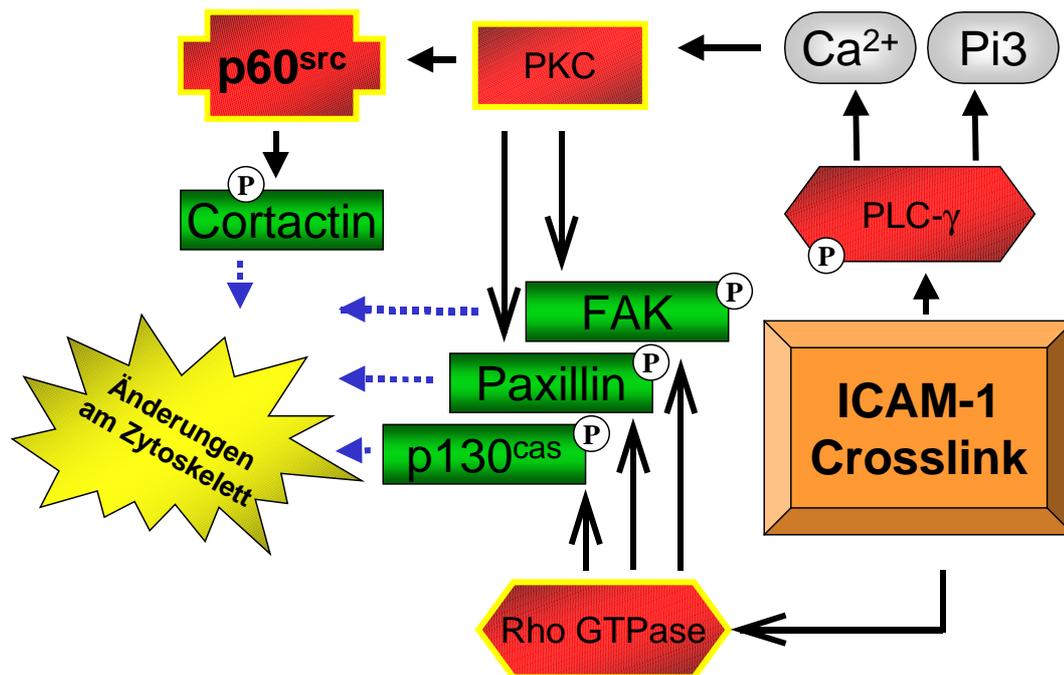
### **1.6.1 Der Rho-Signalweg**

Die Quervernetzung von ICAM-1 durch Antikörper oder Adhäsion von Lymphozyten führt zur Bildung von Aktin-Stressfasern in Gehirn-Endothelzellen (Adamson *et al.*, 1999). Damit in Einklang steht die Beobachtung der verstärkten Phosphorylierung der cytoskelett-assoziierten Proteine p130Cas, FAK (Focal Adhesion Kinase) und Paxillin (Etienne *et al.*, 1998). Aus früheren Studien an Fibroblasten ist eine sehr ähnliche Veränderung des Cytoskelettes nach Aktivierung der GTPase **Rho** bekannt (Nobes & Hall, 1995). Vorbehandlung von Endothelzellen mit dem Rho-spezifischen Inhibitor C3-Transferase verhindert in der Tat die Ausbildung von Stressfasern, sowie die Phosphorylierung der genannten Proteine nach ICAM-1 Quervernetzung. Ferner sind Endothelzellen nach Inhibition von Rho nicht mehr in der Lage, die Transmigration von Monozyten zu unterstützen (Strey *et al.*, 2002). Eine mögliche Funktion von Rho könnte hierbei die Aggregation von Rezeptoren auf der Oberfläche der Zelle sein, welche die Interaktion mit Monozyten vermitteln. Diese Aggregation wird sowohl durch Inhibitoren für Rho als auch für die Aktin-Polymerisation (Cytochalasin D) verhindert (Wojciak-Stothard *et al.*, 1999). Neben der offensichtlichen Bedeutung von Rho für die ICAM-1 abhängige Signalisierung und der Migration von Lymphozyten durchs Endothel ist auch in Epithelzellen eine Beteiligung für Rho an der Organisation des Aktin-Cytoskeletts und der Integrität der Junctions gezeigt worden (Nusrat *et al.*, 1995, siehe auch **Kapitel 1.2.2**).

### **1.6.2 Signalisierung durch PKC und p60<sup>src</sup>**

Der erste, nach T-Zell- oder antikörpervermittelter ICAM-1 Aktivierung gefundene Signalweg in Endothelzellen war die erhöhte Aktivität der cytosolischen Tyrosin Kinase **p60<sup>src</sup>**. Verbunden damit ist die verstärkte Phosphorylierung des Src-Substrates Cortactin, ebenfalls ein Aktin-bindendes Protein (Durieu-Trautmann *et al.*, 1994). Der Befund wurde entscheidend durch eine Arbeit erweitert, in der die ICAM-1 abhängige Aktivierung der Phospholipase-C<sub>γ1</sub> (PLC<sub>γ1</sub>) durch Phosphorylierung demonstriert wurde. PLC<sub>γ</sub> Aktivierung

führt in der Zelle zur Produktion von Inositolphosphat und der Freisetzung von Calcium. Die Freisetzung von intrazellulärem Calcium hat die Aktivierung von Protein-Kinase C (PKC) zur Folge, welche als direkter Aktivator von p60<sup>src</sup> identifiziert wurde. Weiterhin sind FAK und Paxillin PKC-Substrate (Etienne-Manneville *et al.*, 2000). FAK ist bereits seit längerem als mögliches Ziel der Phosphorylierung durch Src bekannt (Schaller *et al.*, 1994). **Abbildung 1.6** gibt einen schematischen Überblick über die ICAM-1 abhängige Signalisierung durch Rho und Src.



**Abbildung 1.6** : ICAM-1 Signalwege und deren zelluläre Ziele (grün).

Zusammengefaßt wirkt ICAM-1 offenbar über zwei unabhängige Mechanismen der Signaltransduktion. Der Rho-abhängige Weg ist exklusiv für die Phosphorylierung von p130<sup>cas</sup> verantwortlich, die PKC- und Calcium-abhängige Route vermittelt über die Aktivierung von p60<sup>src</sup> die Phosphorylierung von Cortactin. Für FAK und Paxillin scheint dagegen eine Konvergenz beider Signalwege vorzulegen, die den Umbau des Cytoskelettes in der Zelle begünstigt. Die Ligandierung von ICAM-1 könnte mitverantwortlich für die Erhöhung des intrazellulären Calcium-Spiegels in Endothelzellen sein, welche nach Adhäsion von Leukozyten beobachtet wurde (Huang *et al.*, 1993; Pfau *et al.*, 1995; Clayton *et al.*, 1998).

Diese komplexe Antwort des Endothels auf die Adhäsion von Leukozyten reflektiert deren aktive Rolle bei der Transmigration.

## **1.7 Zielsetzung der Dissertation**

Der VE-Cadherin-Catenin Komplex ist von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der endothelialen Barrierefunktion. Eine Regulierung des Zellkontaktes kann auf der Ebene der direkten Modifikation von Komponenten der endothelialen Adherens Junction stattfinden. Beispiel hierfür ist die Tyrosinphosphorylierung von VE-Cadherin oder assoziierten Partnern.

Unsere Arbeitsgruppe hat in Vorarbeiten gezeigt, daß die Protein-Tyrosin Phosphatase VE-PTP ein direkter Assoziationspartner von VE-Cadherin ist und in transfizierten CHO-Zellen die adhäsive Funktion von VE-Cadherin beeinflusst. Ungeklärt ist jedoch, ob eine derartige Regulierung unter physiologischen Bedingungen im Endothel stattfindet.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte daher die Bedeutung der VE-PTP - VE-Cadherin Interaktion für den endothelialen Zellkontakt untersucht werden. Vorrangiges Ziel war die Erforschung der Relevanz der endogenen Phosphatase in Endothelzellen für die Funktion von VE-Cadherin in Bezug auf die Stabilität der Adherens Junction. Versuche zur parazellulären Permeabilität und transendothelialen Migration von polymorphonukleären Neutrophilen dienten als Indikator für die Stabilität des Zellkontaktes.

Weiterhin wurde geplant, durch Immunocytoologie und Immunhistochemie Erkenntnisse über die subzelluläre Lokalisation von VE-PTP und Verteilung im embryonalen und adulten Gewebe der Maus zu gewinnen.

Zudem sollte die Suche nach neuen Interaktionspartnern für VE-PTP Aufschluß über ihre biologische Funktion geben. Als Teilprojekt der vorliegenden Dissertation sollte die Auswirkung der Leukozytenadhäsion an Endothel auf die Phosphorylierung von VE-Cadherin untersucht werden. Um einen Teilaspekt dieser Adhäsion zu betrachten, wurden Quervernetzungsexperimente mit Antikörpern gegen endotheliales ICAM-1 durchgeführt, das ein wichtiger Bindungspartner für Leukozyten  $\beta$ 2-Integrine ist.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Allgemeine Chemikalien und Reagenzien

<u>Artikel</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Nummer</u>
2-Propanol	J.T. Baker	8067
30 % Acrylamid/Bisacrylamidlösung	Roth	3029.1
3-Aminotriazol	Sigma-Aldrich	A-8056
AEC Tabletten (3-amino-ethylcarbazol)	Sigma-Aldrich	A-6926
Agarose	Biorad	162-0134
Ampicillin	Roche	835269
Aprotinin	Roche	1583794
APS	Bio-Rad	161-0700
Bacto-Agar	Becton-Dickinson	214030
Bacto-Pepton	Difco	0123-17
Benzamidin	Sigma-Aldrich	B-6506
Borsäure	Roth	6943
BPB	Sigma-Aldrich	B-7021
CaCl <sub>2</sub>	Merck	1.02382.1000
CHCl <sub>3</sub>	Roth	6340.1
Complete™-Proteaseinhibitoren, EDTA frei	Roche	1873580
Coomassie	Sigma-Aldrich	B-0149
Dextrose	Merck	1.08337
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich	D-4254
DMSO	Roth	4720.1
dNTP Mix	Stratagene	200415
DTT Dithiotreitol	Roche	708964
EDTA	Roth	8043.2
Essigsäure	Roth	3738.2
Ethanol	J.T.Baker	8006
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	E-1510
Glutaraldehyd, 25%-Lösung	Sigma-Aldrich	G5882
Glutathion	Sigma-Aldrich	G-6013
Glycerol	Merck	1.04092.1000
Glycin	J.T.Baker	4059-06
Harnstoff	J.T.Baker	0345
HCl 1M Lösung	Bernd Kraft GmbH	01041.3
HCl 37%	Roth	4625.2
Heparin	Sigma-Aldrich	H-3149
HEPES	Sigma-Aldrich	H-9136
IPTG Isopropyl-Thiogalactopyranosid	Sigma-Aldrich	I-6758
Isopropanol	J.T.Baker	8067
KCl	Merck	1.04936.1000
KHCO <sub>3</sub>	J.T.Baker	2940-01
Leupeptin	Roche	1034626

LiAc	Sigma-Aldrich	L-6883
Magermilchpulver	Ratio	
Methanol	J.T. Baker	8045
MgCl <sub>2</sub>	J.T. Baker	0162
MgSO <sub>4</sub>	Merck	5886.0500
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck	1.06586.0500
NaCl	J.T. Baker	0278
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	M.06346
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	1.06346.1000
NaHCO <sub>3</sub>	Biochrom	L-1703
NaOH	J.T. Baker	0288
NaOH 1M Lösung	Bernd Kraft GmbH	01030.3
Na-Orthovanadat	Sigma-Aldrich	S6508
Natriumacetat	J.T. Baker	0256
NH <sub>4</sub> Cl	Merck	A168345
Pepstatin A	Roche	1359053
Phenol/Chloroform	Roth	A156.2
PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich	P 7626
Ponceau S	Serva	33427
rATP	Pharmacia	27-2056-01
Saccharose	Merck	7654.1000
SDS	Calbiochem	428023
TEMED	Biorad	1610801
TRIS	Sigma-Aldrich	T-1503
Tryptonpepton	Becton-Dickinson	0230-15-5
Tween 20	Merck	8.22184.0500
X-Gal	Calbiochem	03-36-0001
Xylen Cyanol FF	Sigma-Aldrich	X-4126
Yeast Extrakt	Becton-Dickinson	212750
Yeast N <sub>2</sub> Base	Difco	0919-15-3

### **2.1.2 Spezielle Chemikalien, Reagenzien und Kits**

<b><u>Artikel</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>	<b><u>Nummer</u></b>
Abi <i>BigDye</i>	Applied Biosystems	4336697
AMAXA Cell Line Nucleofection Kit V	Amata	VCA-1003
AMAXA HUVEC Nucleofection Kit V2.0	Amata	VPB-1002
Amplify™	Amersham	NAMP100
BCA Protein Assay Kit zur Proteinbestimmung	Pierce	23227
BD CellFix	Becton Dickinson	340181
DAKO Biotin Blocking System	DAKO	X 0590
DAKO fluorescent Mounting Medium	DAKO	S 3023
DAKO Pen	DAKO	S 2002
<i>E.coli</i> TOP10 chemisch kompetente Zellen	Invitrogen	C 4040-03
FITC-Dextran, 40 kDa	Molecular Probes	D-1844
<i>Gene Jammer</i> transfection reagent	Stratagene	204131
Glutathion Sepharose	Amersham	175132-01
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche	1754 785
Hunde-Mikrosomenmembranen (Canine Microsomal Membranes)	Promega	Y4041

## **Material & Methoden**

Inhibitor für Rho-assoziierte Kinase ROCK-I	Calbiochem	688001
Inhibitor für Src-Kinasen SU-6656	Calbiochem	572635
Kaiser's Glyceringelatine	Merck	1.09242
Methionin, <sup>35</sup> S markiert	Amersham	AG 1594
PerfectPrep GelCleanup Kit für DNA-Fragmente	Eppendorf	0032-007.740
Pfu cloned DNA-Polymerase	Stratagene	6000159
Premix für DNA-Sequenzierung, enthält BigDye™ gekoppelte di-desoxyNTPs		
Protein A Sepharose CL 4 B	Amersham	170780-01
Protein G Sepharose 4 FastFlow	Amersham	170618-01
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen	12263
Qiagen DyeEx Spin columns	Qiagen	63206
Qiagen RNAlater	Qiagen	76104
Qiagen RNEasy Midi Kit	Qiagen	75142
Rinder-Serum Albumin lyophilisiert (BSA Fraction V)	Sigma-Aldrich	A9647-100g
Sakura Tissue-TEK	Vogel GmbH, Giessen	4583
Super Signal West pico chemiluminescent substrate	Pierce	34080
Superscript II RT Reverse Transkriptase	Invitrogen	I8064-071
T4 Quick Ligation Kit	New England Biolabs	M2200S
TNT T7 Quick coupled Transcription / Translation system	Promega	L1170
TOPO T/A cloning Kit pCR 2.1 - TOPO	Invitrogen	K4500-01
Triton X-100 10% in H <sub>2</sub> O	Roche	1332481
Vectastain ELITE ABC Kit für die Immunhistochemie	Vector Laboratories	P4-6102

### **2.1.3 Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur**

<b><u>Artikel</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>	<b><u>Nummer</u></b>
Transwell Filter 6,5 mm mit 0,4 µM Polycarbonat Membran	Corning Inc.	3413
Cell Lifter	Corning Inc.	3008
Zellkulturschale 6-Well	BD Falcon	353046
Zellkulturschale 24-Well		353047
Zellkulturschale 96-Well		353072
Zellkulturschale 60 mm		353002
Zellkulturschale 100 mm		353003
Zellkulturschale 15 cm		353025
15 ml Plastikröhrchen	Corning	
50 ml Plastikröhrchen	Corning	
Eppendorf-ReaktionsgeäÙe	Eppendorf	

**2.1.4 Kommerzielle Medien und Puffer für die Zellkultur**

<b><u>Artikel</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>	<b><u>Nummer</u></b>
DMEM	Gibco BRL	11971-025
M-199	Gibco BRL	31150-022
PBS	Biochrom	L 182-10
Trypsin-EDTA	Biochrom	L11-004
Penicillin / Streptomycin 100 x	PAA	P11-010
L-Glutamin 100 x	PAA	M11-004
Na-Pyruvat 100 x	Gibco BRL	11360-039
MEM non-essential Amino acids	Gibco BRL	11140-035
β-Mercaptoethanol für die Zellkultur	Gibco BRL	31350-010
HANK's balanced Salts (HBSS)	Gibco BRL	14170-088
Fötales Rinderserum FCS Lot # P217304	PAN	P30-1502
Fötales Rinderserum FCS Lot # S04073S1810	Bio West	S1810
Citratlösung 3,13 %	Apotheke	
Histopaque 1077	Sigma-Aldrich	1077-1
Histopaque 1119	Sigma-Aldrich	1119-1
Gelatine	Sigma-Aldrich	G-1393
Laminin	Sigma-Aldrich	L2020
TNF-α, human rekombinant	Sigma-Aldrich	T6674

**2.1.5 Häufig verwendete Puffer und Stammlösungen**

10 x PBS: 80 g NaCl und 1,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> wurden in 800 ml H<sub>2</sub>O bidest. gelöst, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und das Volumen auf 1000 ml aufgefüllt.

TBS: 10 mM Tris/HCL pH 7,4 + 150 mM NaCl

5 x TBE: 54 g TRIS, 27,5 g Borsäure und 5 ml 0,5 M EDTA wurden in 1 l H<sub>2</sub>O gelöst.

20% SDS: 20 g Natriumdodecylsulfat wurden in 100 ml H<sub>2</sub>O bidest. bei 65°C gelöst

0,5 M EDTA: 181,1 g Dinatriummethyldiaminotetraacetat x 2 H<sub>2</sub>O wurden in 800 ml H<sub>2</sub>O bidest. gelöst, der pH-Wert mit 20 g NaOH auf pH 8,0 eingestellt, das Volumen auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

10 x TE: 100 mM Tris/HCl (pH 7,6) und 10 mM EDTA

DEPC-H<sub>2</sub>O: Dest. H<sub>2</sub>O wurde auf 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) eingestellt, über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und autoklaviert.

**2.1.6 Spezielle Geräte**

**Mikroskope**

*Axiovert 25*  
*Axiovert 200M (CLSM)*  
*Axioskop 2 (Fluoreszenzmikroskop)*  
+ Digitalkamera: *Model 2.1.1*  
*Telaval 31*  
*TSC SP (CLSM)*

**Hersteller**

Zeiss, Göttingen  
Zeiss, Göttingen  
Zeiss, Göttingen  
Diagnostic Instruments, Inc., USA  
Zeiss Göttingen  
Leica, Mannheim

**Zentrifugen**

*Centrifuge 5417R*  
*Megafuge 1.0*  
*Optima™ TL*  
*Sorval RC5C plus*  
*Varifuge 3.0R*

Eppendorf, Hamburg  
Heraeus Instruments, Hanau  
Beckmann Coulter, München  
Sorval DuPont, Newtown, USA  
Heraeus Instruments, Hanau

**Proteinbiochemie/Molekularbiologie**

*ABI® Prism 377 Sequenator*  
*Gel Dryer, Model 583*  
*Gene Pulser II & Pulse Controller II*  
*Mini-Protean II Gelelektrophoresesystem*  
*PCR-Cycler T-Gradient*  
*PCR-Cycler UNO II*  
Netzadapter: *Power PAC1000*  
Netzadapter: *Phero-Stab 0652*  
„Semi dry blot“-Apparatur *TransBlot SD*  
„Wet blot“-Apparatur

Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA  
Bio-Rad, München  
Bio-Rad, München  
Bio-Rad, München  
Biometra, Göttingen  
Biometra, Göttingen  
Bio-Rad, München  
Biotec-Fischer, Reiskirchen  
Bio-Rad, München  
Bio-Rad, München

**Sonstige**

Bio-Imaging-Analyzer Fujix BAS1000  
*CASY™ TT SC1*  
Cell Harvester  
FACSCalibur  
Entwickler Curix 60  
Fluoromax-2  
French Pressure Cell Press  
Fuji Imaging Plate Type BASIIIIs  
Inkubator BB6060  
Inkubator Modell 600  
Innova 4300  
Lambda Fluoro 320  
LS6500 Scintillation Counter  
Millipore Q-Plus PF  
SpeedVac AES 1000  
UV-Spektrometer Gene Quant II  
VIS-Spektrometer UV-1202

Fuji Photo Film CO., LTD, Japan  
Schärfe-System GmbH, Reutlingen  
Inotech AG, Dottikon, Schweiz  
Becton Dickinson, SanJose, USA  
Agfa, Köln  
Jobin-Yvon, Grasbrunn  
SLM Instruments, Rochester, USA  
Fuji Photo Film CO., LTD, Japan  
Heraeus Instruments, Hanau  
Mommert, Schwabach  
Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen  
Bio-Tek Instruments, Winooski, USA  
Beckmann Coulter, München  
Millipore, Bedford, MA, USA  
Savant Instruments, Farmingdale, USA  
Pharmacia Biotech, Freiburg  
Shimadzu, Duisburg

## **2.1.7 Antikörper**

### **2.1.7.1 Primäre Antikörper**

<b><u>Antigen (Reaktivität)</u></b>	<b><u>Klon</u></b>	<b><u>Isotyp</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
Endomucin (murin)	7C7.1	Ratte IgG2a	Eigene, Nanotools
ESAM (murin)	1G8.2	Ratte IgG2a	Eigene, Nanotools
GPP130 (murin, human und andere)	GPP130 (polyklonal)	Kaninchen IgG	Covance PRB-144C
GPP130 (human)	GPP130 (monoklonal)	Maus IgG1	Hans-Peter Hauri, Basel
ICAM-1 (murin)	YNI-1	Ratte IgG2a	Nanotools
ICAM-1 (murin)	25ZC7	Ratte IgG2a	Nanotools
Mannosidase II (murin)	Mann.II (polyklonal)	Kaninchen IgG	Univ. of Georgia, CCRC
Phosphotyrosin (alle)	PY-20	Maus IgG2b	BD Transduction 610012
VE-Cadherin (human)	CD144	Maus IgG1 $\kappa$	BD Transduction 555661
VE-Cadherin (human)	Cadherin 5	Maus IgG1 $\kappa$	BD Transduction 610252
VE-Cadherin (murin)	C5 (polyklonal)	Kaninchen IgG	Eigene
VE-Cadherin (murin)	11D4.1	Ratte IgG2a	Eigene, Nanotools
VE-PTP (murin)	89.1	Ratte IgG2a	Eigene, Nanotools
VE-PTP (murin)	91.1	Ratte IgG2a	Eigene, Nanotools
VE-PTP (murin)	109, 109.1, 109.3	Ratte IgG2a	Eigene Aufreinigung
VE-PTP (murin, human)	VEPTPc (polyklonal)	Kaninchen IgG	Eigene Aufreinigung
$\beta$ -Catenin (murin, human)	14	Maus IgG1	BD Transduction 610193

### **2.1.7.2 Sekundäre Antikörper**

<b><u>Bezeichnung</u></b>	<b><u>Kopplung</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
F(ab') <sub>2</sub> Ziege anti Ratte	Peroxidase (PO)	Jackson Immunoresearch, Dianova, Hamburg
F(ab') <sub>2</sub> Ziege anti Maus		
F(ab') <sub>2</sub> Ziege anti Kaninchen		
[auch aus dem Esel]		
Streptavidin		
Schaf anti Ratte IgG (ab6847)	Keine	Biozol (Abcam)
F(ab') <sub>2</sub> Ziege anti Ratte	PE, Cy2, FITC / DTAF, Cy3, Texasrot TR	Jackson Immunoresearch, Dianova, Hamburg
F(ab') <sub>2</sub> Ziege anti Maus		
F(ab') <sub>2</sub> Ziege anti Kaninchen		
[auch aus dem Esel]		

## **2.1.8. 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.

**2.1.9 Verwendete Zelllinien**

<b><u>Zelllinie</u></b>	<b><u>Beschreibung</u></b>	<b><u>Bezugsquelle / Referenz</u></b>
bEnd.3	Endothelioma aus Gehirn-Mikrokappillaren, Polyoma Middle-T transformiert	Prof. Dr. Werner Risau, MPI Bad Nauheim
bEnd.5	Siehe bEnd.3	
MyEnd	Endotheliom aus Myokard, Polyoma Middle-T transformiert	Golenhofen <i>et al.</i> , 2002
HUVEC	Humane primäre Endothelzellen aus Nabelschnüren	Eigene Präparation
HEK293-A	Humane Nieren-Epithelzelllinie, infiziert mit SV-40 Virus	Graham <i>et al.</i> , 1977
COS-7	Primaten Nieren-Epithelzelllinie, infiziert mit SV-40 Virus	Gluzman <i>et al.</i> , 1981

**2.1.10 Verwendete Vektoren und DNA-Konstrukte**

<b><u>Name</u></b>	<b><u>Beschreibung</u></b>	<b><u>Bezugsquelle / Referenz</u></b>
pEF6/myc-His A	Expressionsvektor für eukaryotische Zellen	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pCDNA3	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
pCMV6-XL4	Klonierungsvektor und Expressionsvektor für eukaryotische Zellen	Origene Technologies Inc., Rockville, USA
pGEX-3T	Expressionsvektoren für Glutathion-S-Transferase Fusionsproteine	Amersham Biosciences, Freiburg
pRK5	Expressionsvektor für eukaryotische Zellen	Millauer <i>et al.</i> , 1993
GST-VE-PTP	C-Terminales 1058 bp cDNA Fragment in pGEX-3T	Fachinger <i>et al.</i> , 1995
GST-VE-PTP R/A	Wie pGEX3T-VE-PTP mit Substratbindungsmutation R/A	Fachinger <i>et al.</i> , 1995
GST-VE-PTP C/S	Wie pGEX3T-VE-PTP mit Substratbindungsmutation C/S	Fachinger <i>et al.</i> , 1995
VE-PTP full length (MG 37)	Die gesamte cDNA von VE-PTP wurden in eine EcoRI/Sall Schnittstelle des Vektors pCMV6-XL4 kloniert.	David Shima, ICRF London
GPP130 full length	Die gesamte cDNA von murinem GPP130 in pCDNA-3	Diese Arbeit
DCSIGN-GPP130	Konstrukt aus dem N-Term. von DC-SIGN R1 und der TM und C-Terminus von murinem GPP130 in pCDNA-3	Diese Arbeit

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Aufzucht und Lagerung von *E.coli***

Die Aufzucht von Bakterien erfolgte in der Flüssigkultur oder Petrischale bei 37°C, falls nicht anders angegeben. Als Nahrung diente Standard LB-Medium bzw. LB-Agar mit Selektionsantibiotika (100µg/ml Ampicillin). Zur langfristigen Lagerung der Bakterien bei –80°C wurde 1 ml über-Nacht Kultur mit 330 µl 100% Glycerin versetzt und gut gemischt.

#### **2.2.1.2 Fällung von DNA**

Plasmid-DNA wurde aus wässrigen Lösungen durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat pH 5,2 und dem 2,5-fachen Vol. 100 % Ethanol für 2 h bei –80°C gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C für 30 Min abzentrifugiert und das Pellet in 70 % Ethanol gewaschen. Nach Trocknen wurde die DNA in ddH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer resuspendiert.

#### **2.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA**

Zur Aufreinigung von Nukleinsäuren wurden Plasmid-Präparations Kits der Firmen Roche und Qiagen eingesetzt. Das Qiagen „QIAfilter Plasmid Maxi Kit“ wurde für Präparationen im großen (mg-) Maßstab verwendet, wie sie vor allem für Transfektionen benötigt werden. Das Protokoll des Herstellers wurde eingehalten.

Zur Sequenzierung von DNA fand das „High Pure Plasmid Isolation Kit“ von Roche Verwendung. Nach dem Herstellerprotokoll erhält man sehr reine Plasmid-DNA, die für Sequenzierungsreaktionen geeignet ist.

#### **2.2.1.4 Sequenzierung von DNA**

Plasmid-DNA, welche nach obigem (2.2.1.3) Protokoll präpariert wurde, konnte in folgender Reaktion zur Sequenzierung nach der Di-Desoxyribonukleotid-Methode (Sanger) im Uniklinikum eingesetzt werden :

200 - 400 ng Plasmid-DNA (in ddH<sub>2</sub>O)  
2 µl **Premix** (enthält BigDye™ Farbstoffe und DNA Polymerase)  
1 µl Primer (10 µM in ddH<sub>2</sub>O)  
ad 10 µl ddH<sub>2</sub>O

Die Elongations-Reaktion fand nach folgendem Protokoll in einem Standard-PCR Gerät statt :

Schritt 1 : 96°C 4 Min  
**Schritt 2** : 96°C 15 Sek  
**Schritt 3** : T<sub>AN</sub> 15 Sek  
**Schritt 4** : 60°C 2 Min → Schritt 2, 30 x  
Schritt 5 : 4°C ad infinitum

Nach Abschluß der Reaktion wurden 10 µl ddH<sub>2</sub>O zugegeben und überschüssiger Farbstoff mit Hilfe von „DyeEx Spin Columns“ (Qiagen) nach Herstellerprotokoll entfernt. Die Sequenzierung erfolgte auf einem „ABI PRISM Kapillar - Sequencer“ im Universitätsklinikum.

### 2.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

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

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

wobei  $c$  = Konzentration der Ausgangslösung, OD<sub>260</sub> = optische Dichte bei 260 nm Wellenlänge,  $V$  = Verdünnungsfaktor und  $F$  = Multiplikationsfaktor (50 für doppelsträngige DNA, 40 für RNA, 37 für einzelsträngige DNA, 20 für einzelsträngige Oligonukleotide) 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 Nukleinsäure-lösung weist ein Verhältnis von 1,8-2,0 auf. Für eine weitere Konzentrationsbestimmung bei Nukleinsäuren wurde eine Gelelektrophorese mit einem Konzentrationsstandard durchgeführt.

### **2.2.1.6 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen**

#### Benötigte Puffer :

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

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 Transilluminator ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ) visualisiert und mit Hilfe einer Videokamera dokumentiert.

### **2.2.1.7 Isolierung von RNA aus Organen oder Zellen (Qiagen RNEasy Kit)**

Von der Firma bereitgestellte Lösungen:

- Lysis-Puffer RLT
- Waschpuffer RW 1
- Waschpuffer RPE

Von den zur RNA - Entnahme vorgesehen Organen oder Zellen werden ca. 100 mg sofort in RNA*later* - Reagenz von Quiagen gelegt, was eine Stabilisierung der RNA für spätere Benutzung ermöglichte. Lagerung erfolgt bei RT bzw. 4°C. Die restlichen Gewebe werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gel agert.

Das Säulenmaterial der Qiagen-RNeasy-Säulen hat eine Kapazität für das Aufreinigen von RNA aus maximal 30 mg Mausgewebe. Zur RNA - Präparation werden dann ca. 30 mg Gewebe aus der RNA*later* Reagenz entnommen, sofort 600 µl RLT - Puffer hinzugefügt und mit dem Ultraturax 40 sec lang durchgängig zerkleinert. Nach diesem

Homogenisationsschritt sind die Proben bei RT zwar recht stabil, eine zügige Weiterverarbeitung ist aber ratsam. Es folgt eine dreiminütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in der Eppendorffzentrifuge bei RT, der Überstand wird in ein neues E - Cup überführt, 1 Vol RNase - freies 70%iges Ethanol hinzugefügt und durch Auf - und Abpipettieren untergemischt. Dabei bildete sich meist ein Präzipitat, das allerdings den folgenden Schritt, in welchem die Probe auf die Säule aufgetragen wurde, nicht stört. Durch 15 sec Zentrifugieren bei 8.000 x g (ca. 10.000 rpm) in der Eppendorf - Zentrifuge findet die Bindung der im Überstand befindlichen RNA an das Säulenmaterial statt. Bei einem Probenvolumen von über 700 µl muß dieser Schritt wiederholt werden.

Der Durchfluß wird verworfen und die Säule einmal mit 700 µl RW1 - Puffer gewaschen, die Säule in ein neues 2 - ml - Cup überführt und noch zweimal mit 500 µl RPE - Puffer gewaschen, wobei nach dem zweiten Mal 2 Min lang bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert wird, um die Membran der Säule von Ethanolresten zu befreien. Anschließend erfolgt die Elution der RNA in ein neues 1,5 ml - E - Cup 1 Min bei 8.000 x g mit 50 µl DEPC - Wasser. Diese RNA Lösung ist dann einige Tage bei 4<sup>0</sup>C oder mehrere Monate bei - 80<sup>0</sup>C haltbar.

### **2.2.1.8 Herstellung von cDNA-Pools durch Reverse Transkription von Maus RNA**

Messenger-RNA (mRNA) aus den Maus Endothelzelllinien bEnd.3 und MyEnd wurde mittels Reverser Transkriptase in cDNA transkribiert, welche als Ausgangsmaterial für PCR-Amplifikationen von murinen DNA Fragmenten diente. Die RT-Reaktion setzte sich folgendermaßen zusammen :

Reverse Transcriptase Puffer*	1 x
mRNA	5 µg
Oligo dT Oligonukleotide	40 µM
dNTPs	4 mM
DTT	1 mM
RNase Inhibitoren	20 U
Superscript II Reverse Transcriptase	25 U
DEPC H2O	ad 25 µl

\* Pufferzusammensetzung : 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 30 mM KCl, 8 mM MgCl<sub>2</sub>.

Die Reaktion fand bei 37°C für 1 h statt und wurde durch Hitzeinaktivierung bei 95°C für 5 Min beendet.

### **2.2.1.9 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.

### **2.2.1.10 Dephosphorylierung / Kinasierung von DNA**

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 derart behandelte DNA wurde jeweils bei 65°C für 15 Min Hitzeinaktiviert oder über eine Gelelektrophorese gereinigt.

### **2.2.1.11 Klonierung von GPP130 aus Maus cDNA-Pools**

In Pull-Down Experimenten wurde das Golgi-Protein GPP130 als Interaktionspartner von VE-PTP identifiziert. Zur näheren Untersuchung dieser Interaktion wurde GPP130 aus der Maus in den eukaryotischen Expressionsvektor pCDNA 3 kloniert. GPP130 ist aus der Ratte und dem Menschen bereits kloniert, jedoch nicht aus der Maus.

Hierfür wurde auf ENSEMBL eine "BLAST-Search" im Maus-Genom durchgeführt, um das murine Homolog des Ratten GIMPc Proteines zu finden. Ergebnis war ein vorhergesagtes Gen mit hoher Homologie zu GPP130 aus der Ratte, dessen Transkript 2049 Basenpaare umfaßt.

Strategie : Anhand dieses Transkriptes wurden spezifische Primer mit Restriktionsschnittstellen zur Amplifikation der Sequenz aus Maus cDNA-Pools entworfen. Das resultierende PCR-Produkt wurde direkt restriktionsverdaut und in den gleichermaßen geschnittenen Zielvektor ligiert.

<u>Primer</u>	<u>Sequenz 5' - 3'</u>	<u>Tm</u>
5' GPP130 full length	CGAGGATCCGCCACCATGGGAAACGGGATGT GCTCC	66°C
3' GPP130 full length	GCGGAATTCTTACTACATTTTCAGCTCTGCGAT GTGA	62°C

Der 5' Primer enthält eine Kozak-Sequenz und eine BamHI-Restriktionsschnittstelle, der 3' Primer zwei Stopcodons und eine EcoRI- Restriktionsschnittstelle. Folgende PCR-Reaktion wurde zur Amplifikation von murinem volle-Länge GPP130 durchgeführt.

Reaktion :	10 x Pfu Puffer	5 µl
	Primer 5' GPP130 full length (10 µM)	3 µl
	Primer 3' GPP130 full length (10 µM)	3 µl
	dNTP Mix (25 µM jedes Nukleotides)	0,6 µl
	0,1 M DTT	1µl
	Pfu-Polymerase	1µl (2,5 U)
	cDNA aus bEnd.3 Endothelioma	40 ng (1 µl)
	Nukleasefreies Wasser	35,4 µl

PCR-Programm :	Schritt 1	94°C	45 Sekunden	
	<b>Schritt 2</b>	94°C	45 Sekunden	
	<b>Schritt 3</b>	60°C	45 Sekunden	
	<b>Schritt 4</b>	72°C	3 Minuten	→ <b>Schritt 2, 38 x</b>
	Schritt 5	72°C	10 Minuten	
	Schritt 6	4°C	ad infinitum	

Das resultierende PCR-Produkt von ca. 2050 bp wurde auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und ausgeschnitten. Aufreinigung des Fragmentes mit dem "PerfectPrep Gel Cleanup Kit" von Eppendorf.

Anschließend **direkter Verdau** des Fragmentes mit BamHI und EcoRI Restriktionsendonukleasen. Das verdaute Fragment wurde erneut aus einem Agarosegel aufgereinigt und mit einem BamHI-EcoRI-geschnittenen pCDNA 3 Vektor ligiert .

Ligation :	pCDNA 3 Vektor, BamHI-EcoRI geschnitten	50 ng
	GPP130 full length, BamHI-EcoRI geschnitten	57 ng
		ad 10 µl H <sub>2</sub> O
	2 x T4 Quick Ligase Puffer	10 µl
	T4 Quick DNA-Ligase	1 µl

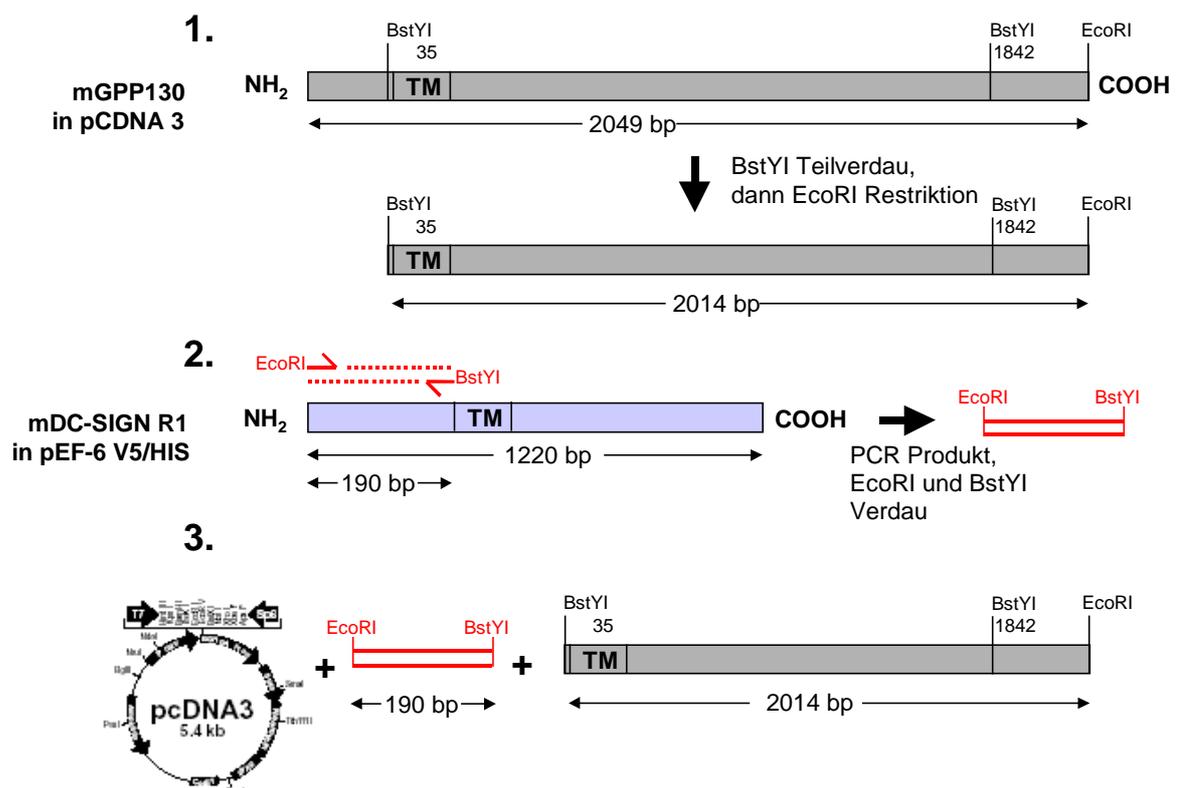
Ligation bei Raumtemperatur für 15 Minuten. Anschließend Transformation von *E.coli* TOP10 (Invitrogen) nach Herstellervorschrift. Von den gewachsenen Kolonien wurden DNA-Minipräparationen zur Kontrolle mit BamHI und EcoRI verdaut. Im positiven Fall ist ein DNA-Fragment bei ca 2 kb (Insert) und bei 5,4 kb (Vektor) sichtbar. Positive Klone wurden sequenziert.

Die Sequenz stimmte bis auf eine stille Punktmutation exakt mit der des vorhergesagten Genes aus ENSEMBL überein. Damit gilt das murine GPP130 als kloniert! Die Sequenz findet sich im **Anhang A**.

### 2.2.1.12 Klonierung einer DC-SIGN R1 - GPP130 Chimäre

Für weiterführende Untersuchungen zur Interaktion von GPP130 und VE-PTP wurde ein Konstrukt kloniert, welches den aminoterminalen, cytoplasmatischen Teil von DC-SIGN R1 und den carboxyterminalen Teil inklusive der Transmembrandomäne von GPP130 besitzt. DC-SIGN R1 ist, wie GPP130, ein Typ-2 Transmembranprotein.

Strategie : Zur Klonierung wurde eine BstYI-Restriktionsschnittstelle in der GPP130 Sequenz genutzt, durch welche der gesamten Aminoterminus bis auf ein Triplet entfernt werden kann. Carboxyterminal wurde die bereits vorhandene EcoRI - Schnittstelle der volle-Länge Sequenz genutzt (siehe **vorheriges Kapitel**). Das GPP130 BstYI-EcoRI Fragment wurde mit einem EcoRI-BstYI PCR-Fragment von DC-SIGN R1 in pCDNA 3 ligiert. Schema (nicht proportional !):



Die GPP130 cDNA Sequenz enthält zwei BstYI-Schnittstellen bei 35 bp und 1842 bp. Das gewünschte Stück wurde folglich im Teilverdau mit BstYI (30°C, 15 Min) und anschließend mit EcoRI als 2014 bp Fragment ausgeschnitten und über ein Gel gereinigt. Verdaut wurde das zuvor klonierte und sequenzierte GPP130 in pCDNA 3.

Der DC-SIGN Aminoterminus wurde über PCR mit spezifischen Primern amplifiziert :

<b><u>Primer</u></b>	<b><u>Sequenz 5' - 3'</u></b>	<b><u>Tm</u></b>
5' DCSIGN-GPP130	CGAGAATTCGCCACCATGCACCAGGGGACA GCG	60°C
3' DCSIGN-GPP130	TGGAAGATCCGGACTTGGCTGTGTCCCG	60°C

Der 5' Primer enthält eine EcoRI-Schnittstelle und Kozak-Sequenz, der 3' Primer eine BstYI-Schnittstelle. Folgende PCR-Reaktion wurde zur Amplifikation des DC-SIGN R1 Aminoterminus durchgeführt.

Reaktion :	10 x Pfu Puffer	5 µl
	Primer 5' DCSIGN-GPP130 (10 µM)	3 µl
	Primer 3' DCSIGN-GPP130 (10 µM)	3 µl
	dNTP Mix (25 µM jedes Nukleotides)	0,6 µl
	0,1 M DTT	1µl
	Pfu-Polymerase	1µl (2,5 U)
	DC-SIGN R1 in pEF-6 V5/His	20 ng (2 µl)
	Nukleasefreies Wasser	34,4 µl

PCR-Programm :	Schritt 1	94°C	45 Sekunden	
	<b>Schritt 2</b>	94°C	45 Sekunden	
	<b>Schritt 3</b>	55°C	45 Sekunden	
	<b>Schritt 4</b>	72°C	20 Sekunden	→ <b>Schritt 2, 30 x</b>
	Schritt 5	72°C	10 Minuten	
	Schritt 6	4°C	ad infinitum	

Anschließend Zugabe von 1 µl TAQ-Polymerase, 10' bei 72°C. Durch die Anheftung von 3' Adenin-Nukleotiden ist eine Zwischenklonierung in den pCR2.1 TOPO - Vektor (Invitrogen) möglich. Dies ermöglicht eine schnelle "Sicherung" des Fragmentes zur Sequenzierung und Amplifikation in Bakterien.

Das PCR-Produkt von ca. 190 bp wurde auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und ausgeschnitten. Aufreinigung des Fragmentes mit dem "PerfectPrep Gel Cleanup Kit" von Eppendorf, Ligation in pCR2.1 TOPO und Transformation in *E.coli* TOP10 nach

Herstellerangaben. Das Fragment wurde im TOPO-Vektor erfolgreich sequenziert und anschließend mit BstYI und EcoRI Restriktionsendonukleasen verdaut. Erneute Aufreinigung aus einem Agarosegel. Ligation mit dem GPP130 Fragment und einem EcoRI-geschnittenen pCDNA 3 Vektor.

Ligation :	pCDNA 3 Vektor, EcoRI geschnitten	50 ng
	GPP130 BstYI - EcoRI geschnitten	50 ng
	DC-SIGN R1 EcoRI - BstYI Fragment	6 ng
		ad 10 µl H <sub>2</sub> O
	2 x T4 Quick Ligase Puffer	10 µl
	T4 Quick DNA-Ligase	1 µl

Ligation bei Raumtemperatur für 15 Minuten. Anschließend Transformation von *E.coli* TOP10 (Invitrogen) nach Herstellervorschrift. Von den gewachsenen Kolonien wurden DNA-Minipräparationen zur Kontrolle mit HindIII verdaut. Bei richtiger Orientierung des Inserts sind Fragmente bei 6661 bp, 713 bp und 225 bp sichtbar. Positive Klone wurden zur Kontrolle EcoRI verdaut, um die Größe von Insert (2,2 kb) und Vektor (5,4 kb) zu überprüfen. Sequenzierung der Klone ergab eine korrekt fusionierte DC-SIGN - GPP130 Chimäre !

### **2.2.2 Biochemische Methoden**

#### **2.2.2.1 Herstellung von Gewebehomogenaten**

Zur Herstellung von Totallysaten aus Mausgeweben werden die entsprechenden Organe aus der Maus entnommen und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Lagerung bei -80°C.

Für Harnstoff-Lysate werden gefrorene Gewebestückchen auf Eis im Kühlraum in 8 M Harnstoff in H<sub>2</sub>O direkt sonifiziert, bis sie zerstört sind. Das Gewebevolumen sollte 100 µl nicht überschreiten, das Puffervolumen sollte das 3-5-fache des Gewebevolumens betragen. Das Homogenat wird 15 Min bei >20.000 x g abzentrifugiert und vom Überstand eine Proteinbestimmung durchgeführt.

Vom Überstand wird bei Bedarf ein Aliquot mit 3 x SDS Probenpuffer (siehe **2.2.2.3**) versetzt, 5 Min bei 95°C gekocht und auf ein Gel aufgetragen.

Für Triton X-100 Lysate wird von den Organen die gewünschte Menge entnommen und mindestens 9 Vol Lysispuffer zugegeben.

Lysispuffer :            1 x TBS (100 mM NaCl, 20 mM Tris HCl pH 7,4)  
                              5 mM EDTA  
                              1 mM PMSF, Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin  
                              1 % vol Triton X – 100

Die Gewebe werden mechanisch im Puffer mit einer spitzen Schere zerkleinert und mit dem Ultra - Turrax homogenisiert. Der Ultra - Turrax sollte in TBS + Proteinaseinhibitoren vorbehandelt und zwischen den Geweben gespült werden. Sollte das Lysat nicht hinreichend homogenisiert werden können, wird ein Sonicator-Schritt (3 x 20 Sekunden) hinzugefügt. Zentrifugation zur Klärung des Lysates 15 Min. bei >20.000 x g, sowie ggf. 1 h bei > 100.000 x g (bei Einsatz des Lysates in einer IP). Werden kleine Lysatvolumina für Analysen auf SDS-Gelen benötigt, wird nach einer Proteinbestimmung die gewünschte Menge Lysat mit 3 x SDS-Probenpuffer versetzt, gekocht und aufgetragen.

### **2.2.2.2 Proteinbestimmung im Mikroansatz mit dem "Pierce BCA Protein Assay Reagent"**

Diese Methode zur Bestimmung der Konzentration von Proteinproben beruht auf dem Prinzip der Bildung eines violetten Komplexes aus Bicinchonin-Säure und Kupfer in alkalischer Umgebung. Hierfür werden in einer Biuret-Reaktion  $\text{Cu}^{2+}$  Ionen durch Proteine in Gegenwart von Natronlauge zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduziert. Bicinchonin-Säure bildet mit  $\text{Cu}^{1+}$  den o.g. Komplex. Da sich die Konzentration von Kupfer-I-Ionen proportional zur Proteinkonzentration in der Lösung verhält, liefert der Assay eine verlässliche und sensitive Methode zur Proteinbestimmung. Die Extinktion der Lösung wird nach Abschluß der Reaktion bei 562 nm im Photometer gemessen.

Der Versuch wird mit einem von Pierce unter der Katalognummer 23227 angebotenen Kit nach Herstellerangaben auf der Mikrotiterplatte durchgeführt.

### **2.2.2.3 SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) zur Auftrennung von Proteinen**

Die SDS PAGE trennt Proteine nach ihrem Gewicht auf. Dazu werden die Proteine vollständig denaturiert und mit SDS beladen, damit ein konstantes Masse / Ladung - Verhältnis entsteht, das es ermöglicht, innerhalb eines Geles bei gegebener elektrischer

Feldstärke verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten einzelnen Molekulargewichten zuzuordnen. Diese Geschwindigkeit ist zum Logarithmus des Molekulargewichtes umgekehrt proportional.

Gele bestehen aus Sammel - und Trenngel, ersteres erlaubt die Konzentrierung der Proteine in schärferen Banden, letzteres die eigentliche Auftrennung.

Apparatur : "Mini-Protean II" von BioRad

Elektrodenpuffer : 25 mM Tris/HCl pH 6,8  
192 mM Glycin  
in ddH<sub>2</sub>O

3 x SDS-Probenpuffer : 375 mM Tris/HCl pH 6,8  
6 % SDS  
30 % Glycerin  
0,01 % Bromphenolblau  
50 mM DTT

Benötigte Puffer/Lösungen für Gele verschiedener Prozentigkeit :

<u>Lösung</u>	<u>Trenngel 6 %</u>	<u>Trenngel 12 %</u>	<u>Sammelgel 4 %</u>
H <sub>2</sub> O	5,45 ml	3,45 ml	3,05 ml
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid	2 ml	4 ml	0,65 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8 + 0,4 % SDS	2,5 ml	2,5 ml	---
0,5 M Tris/HCl pH 6,8 + 0,4 % SDS	---	---	1,25 ml
10 % APS	50 µl	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl
Totalvolumen	10 ml	10 ml	5 ml

Zuerst wird das Trenngel gemäß der Tabelle gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Sobald es polymerisiert ist, wird das Isopropanol entfernt und das Sammelgel über das Trenngel gegossen. Ein Kamm wird eingesteckt und nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels gezogen, die Taschen werden mit H<sub>2</sub>O gespült. Die gewünschte Proteinmenge wird in Solubilizer 5 Min bei 95°C gekocht, kurz anzentrifugiert und auf das Gel geladen. Nach Auffüllen der Gelkammer mit Laufpuffer wird das Gel 10 Min bei 85V, dann bis zum Ende bei 175 V gefahren.

#### **2.2.2.4 Coomassie - Färbung von SDS - Gelen**

Färbelösung :           0,5 % (w/v) Coomassie Blau R  
                              50 % (w/v) Ethanol  
                              10 % (w/v) Essigsäure  
                              in H<sub>2</sub>O

Entfärber :             50 % Methanol  
                              10 % Essigsäure  
                              in H<sub>2</sub>O

Die Gele werden über Nacht in Färbelösung auf der Wippe geschwenkt, anschließend in Entfärber entfärbt. Anschließend können die Gele in H<sub>2</sub>O rehydriert und in einem Geltrockner getrocknet werden.

#### **2.2.2.5 Silberfärbung von Proteinen im SDS Gel**

Für den sehr sensitiven Nachweis von elektrophoretisch separierten Proteinen wurde eine nach Blum abgewandelte Silberfärbung eingesetzt.

##### Benötigte Lösungen :

Fixierer:                50 % Methanol  
                              10 % Essigsäure

Natriumthiosulfat-Stock:   0,43 g Natriumthiosulfat pro 5 ml H<sub>2</sub>O

Natriumthiosulfat-Lösung:   75 µl vom Natriumthiosulfat-Stock in 50 ml H<sub>2</sub>O

Silbernitrat-Lösung:        0,1 g AgNO<sub>3</sub> in 50 ml ddH<sub>2</sub>O

Entwickler:             3 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>+ 25 µl Formaldehyd (37%) + 3µl vom  
                              Natriumthiosulfat-Stock in 50 ml ddH<sub>2</sub>O

Für 1 Gel reichen 50 ml Lösung. Das Gel wird für 0,5 h in den Fixierer eingelegt, 3 mal für 30 Minuten mit 50% Ethanol gewaschen und dann für genau eine Minute in Natriumthiosulfatlösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Aqua bidest. für exakt 20 Sekunden wird das Gele für 20 Minuten mit der Silbernitratlösung behandelt. Nach

nochmals zweimaligem Waschen in ddH<sub>2</sub>O für je 20 Sekunden erfolgt die Entwicklung für 2 - 5 Minuten in Entwicklerlösung. Die Reaktion wird mit Fixierer für 10 Minuten abgestoppt, wenn die Flecken dunkel genug sind. Nach mehrmaligem Waschen in Aqua bidest. verblieben die Gele bis zum Trocknen in Wasser + 2% Glycerin.

### **2.2.2.6 Nachweis von Proteinen mit Antikörpern (Westernblot)**

#### Benötigte Puffer :

TBS-Tween : 1 x TBS + 0,1 % Tween-20 (v/v)

Blockierungspuffer : TBS-Tween + 5 % Magermilchpulver (w/v)  
oder TBS-Tween + 2 % BSA (w/v)

Standardmäßig wurden Membranen nach dem Transfer der Proteine vor der eigentlichen Blockierung für 30 Min in TBS-Tween inkubiert. Dies führt zu deutlich weniger Hintergrund. Blockiert wird anschließend für 1 h in Blockierungspuffer.

Zugabe der Antikörper erfolgte ebenfalls in Blockierungspuffer. Primäre Antikörper wurden in einer Konzentration von 1 µg / ml eingesetzt. Die Membran wurde für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in der Lösung belassen. Dreimaliges Spülen mit TBS-Tween für 5 Min entfernt ungebundene primäre Antikörper. Peroxidasegekoppelte sekundäre Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1 : 10000 für 30 Min bei Raumtemperatur eingesetzt. Danach wurde die Membran gründlich 6 x für 10 Min mit TBS-Tween gewaschen. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch Chemilumineszenz mit dem „Super Signal ECL Reagent“ von Pierce nach Herstellerangaben.

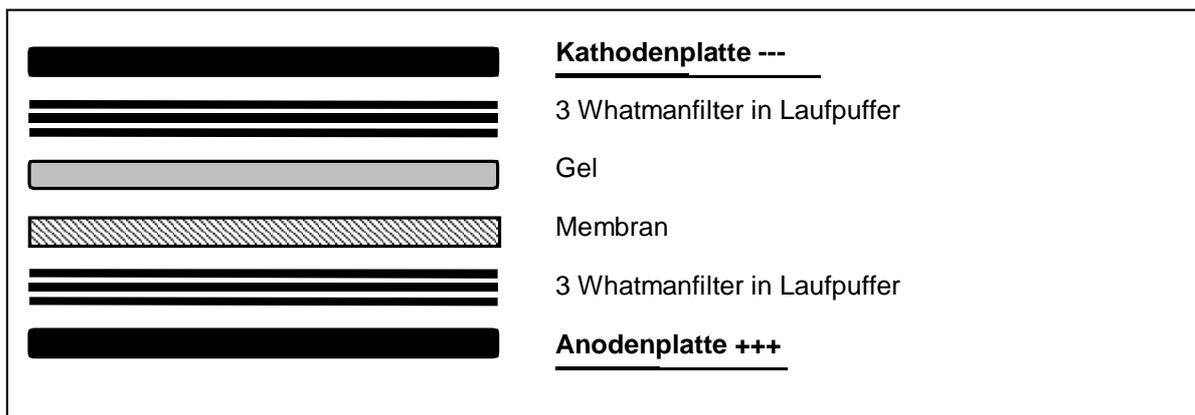
### **2.2.2.7 Elektrotransfer von Proteinen ("Semidry"-Westernblot)**

Um die in der SDS - PAGE (2.2.2.3) getrennten Proteine für immunologische Nachweisverfahren auf eine Nitrocellulose - oder PVDF - Membran zu überführen, wurden sowohl das "Semidry" Verfahren als auch das Tank - Blotten durchgeführt. "Semidry"-Transfer erwies sich als vorteilhaft für Phosphotyrosinblots.

Elektrodenpuffer : 48 mM Tris  
39 mM Glycin  
0,37 % SDS  
10 % Methanol  
in ddH<sub>2</sub>O

Hierzu werden drei dünne Whatman-Filterpapiere und die Nitrozellulose - Membran in der Größe des zu blottenden Gels kurz in Elektrodenpuffer äquilibriert, dann luftblasenfrei auf die "Semidry"-Apparatur gelegt. Das Gel wird vom Sammelgel befreit und ebenfalls kurz in Puffer äquilibriert und auf die Membran gelegt. Den Abschluß bilden drei weitere Whatman - Filter, welche in Puffer getränkt auf das Gel gelegt werden. Es folgt die Kathodenplatte. Der Blotvorgang erfolgt mit einer Stromstärke von 2 mA/cm Gelfläche für 30 Min und höchstens 25 V.

Das Schema illustriert den Vorgang :



### 2.2.2.8 Nasstransfer von Proteinen ("Tankblot")

Das Blotten von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen durch das Tankblot Verfahren hat bei relativ hohem Zeitaufwand den Vorteil, einen vollständigeren Transfer und saubere Membranen zu gewährleisten. Daher kam diese Methode vor allem bei Ko-Immunoprecipitationsexperimenten zum Einsatz.

Elektrodenpuffer : 14,4 g Glycin  
3 g Trizma-Base  
400 ml Methanol  
ad 2000 ml ddH<sub>2</sub>O

Der Aufbau der Apparatur erfolgte im Prinzip wie beim "Semi-dry" Blot, allerdings unter Verwendung jeweils eines dicken Whatman-Filters statt dreier dünner.

Nach Auffüllen des Tankes mit Elektrodenpuffer wurden die Proteine für 2 h bei 250 mA geblottet.

### **2.2.2.9 Dehybridisierung der Antikörper von Blotmembranen**

Um gebundene Antikörper von einer Blotmembran zu entfernen, wurde sie folgendermaßen behandelt:

5 Min spülen in ddH<sub>2</sub>O

**5 Min Inkubation in 0,2 N NaOH + 1 % SDS**

5 Min spülen in ddH<sub>2</sub>O

Alles bei RT unter sanftem Wippen. Bei dieser Prozedur bleiben die Proteine auf der Membran erhalten und können zur erneuten Inkubation mit einem anderen Antikörper verwendet werden.

### **2.2.2.10 Phosphotyrosinblot**

Um die zelllichteabhängige Phosphorylierung von VE-Cadherin in Endothelzellen zu untersuchen, wurde VE-Cadherin immunpräzipitiert und die Tyrosin-Phosphorylierung mit Antikörpern nachgewiesen.

#### Benötigte Lösungen :

Erntepuffer für adhärente Zellen : 1x PBS mit 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin A

1 ml Pervanadat-Stock 10 mM : 100 µl 10 x PBS  
200 µl Na-Orthovanadat (50 mM)  
200 µl ddH<sub>2</sub>O  
500 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stock 37% in 50 ml ddH<sub>2</sub>O)  
→ 15 Min RT, Lösung wird gelb



Waschen der Beads : Nach der IP werden die Beads abzentrifugiert, ggf. in E-Cup überführt und 3 x mit Lysispuffer gewaschen. Elution in 40 µl 1 x SDS Samplepuffer + DTT, 95°C für 5 Min.

Western Blot : Auftrag der Proben auf 6% PAA Gele, Transfer auf Nitrozellulose mit Semidry-Westernblot Apparatur (2.2.2.7).

Blockieren der Membran findet in **1 % BSA** in TBS-Tween + 1/500 Vol. Pervanadat-Stock für **1 h** bei RT statt. Magermilchpulver ist ungeeignet, da es Phosphatasen enthält, die einen Nachweis von Tyrosin-Phosphat unmöglich machen !!

Antikörperinkubation : Anti Phosphotyrosin-AK **PY-20** wird 1 : 1000 in Blockierungs-Puffer verdünnt, Membran wird **60 Min** bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3 x 5 Min Waschen mit TBS-T : Zugabe des Sekundärantikörpers Ziege anti Maus-Peroxidase 1 : 10.000 für 30 Min. Waschen für 5 x für 10 Min In TBS-Tween + 1/500 vol Pervanadat-Stock. Anschließend ECL-Reaktion und Film-Exposition.

### **2.2.2.11 Ko-Immunopräzipitation**

Um die Interaktion zweier oder mehrerer Proteine biochemisch zu untersuchen, wurden Ko-Immunopräzipitationen durchgeführt. Hierfür wird ein Protein mit Hilfe von Antikörpern präzipitiert und geblottet. Der mutmaßliche Interaktionspartner wird im Westernblot nachgewiesen.

Dieses Protokoll wurde für den Nachweis der Interaktion von VE-PTP und VE-Cadherin in bEnd.3 und HUVEC erstellt, aber kann nach Modifikation natürlich auch für andere Interaktionen benutzt werden.

#### Benötigte Lösungen :

Lysispuffer "klassisch" :	20 mM Imidazol pH 6,8
	100 mM NaCl
	5 mM EDTA
	1 % v/v Triton X-100
	1 Complete™ Tablette auf 50 ml Puffer

Die Kultivierung, Ernten und Lyse erfolgt analog zum Protokoll " **Phosphotyrosinblot 2.2.2.10**". Die Zellen wurden für mindestens 2 h in Lysispuffer "klassisch" lysiert. Lysate wurden für 20 Min bei 30.000 x g und 4°C zentrifugiert, anschließend für mindestens 1 h bei 100.000 x g und 4 °C in der Ultrazentrifuge. Einstellen der gleichen Proteinmenge pro

IP über einen BCA-Test. Die eigentliche Präzipitation erfolgt für mindestens 1 h mit 5 µg Antikörper und 30 µl Protein G Sepharose bei 4°C auf dem End-over-End Schüttler.

Waschen der Beads 5 x mit Lysispuffer, gefolgt von Standard-Gelelektrophorese und Transfer der Proteine im Tankblot (**2.2.2.8**).

Blockieren der Membran mit 5 % Magermilchpulver in TBS-Tween, Inkubation mit 1 µg / ml primärem Antikörper für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Nach 3 x 5 Min Waschen mit TBS-T : Zugabe des peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpers 1 : 10.000 für 30 Min. Waschen für 5 x für 10 Min In TBS-Tween Anschließend ECL-Reaktion und Film-Exposition.

### **2.2.2.12 Transiente Transfektion von eukaryontischen Zellen**

Zur heterologen Expression von Proteinen in eukaryontischen Zellen wurde das "GeneJammer" Transfektionsreagenz von Stratagene (#204131) eingesetzt. Das System basiert auf der Bildung von Komplexen aus Plasmid-DNA und kationischen Lipiden, welche von der Zelle aufgenommen werden. Im Zellkern erfolgt dann die Transkription vom transfizierten Plasmid, welches das Zielgen unter der Kontrolle eines starken viralen Promoters enthalten sollten.

Für eine erfolgreiche Transfektion sollte die optimale Konzentration von GeneJammer-Reagenz und DNA für jedes Konstrukt und jede Zelllinie individuell bestimmt werden. Für die Transfektion von COS-7 und 283A Zellen auf 100 mm-Zellkulturplatten erwies sich folgendes Protokoll als erfolgreich :

Die Zellen sollten für die Transfektion ca. 70 % konfluent sein.

24µl GeneJammer Reagenz wurden in 750 µl DMEM für 10 Min in einem Polystyrolröhrchen inkubiert. Insgesamt 4 µg steriler Plasmid DNA in H<sub>2</sub>O (Maxi-Präparation) wurden zugefügt und sanft geschüttelt, 10 Min inkubieren. Diese Lösung wurde tropfenweise und unter Schwenken zu einer 100 mm Zellkulturplatte mit 6 ml serumhaltigem Medium gegeben. Expression der Proteine für 48 h.

Die Zellen konnten dann lysiert oder für die Immunfluoreszenz fixiert werden.

### **2.2.2.13 ICAM-1 Quervernetzung auf bEnd.5 Endothelioma**

ICAM-1 ist ein kostimulatorisches Immunglobulin-ähnliches Zelladhäsionsmolekül, welches bei der Extravasation von Leukozyten eine wichtige Rolle spielt. Seine Interaktionspartner auf Leukozytenseite sind die  $\beta$ 2-Integrine LFA-1( $\alpha_L\beta_2$ ) und MAC-1 ( $\alpha_M\beta_2$ ). Antikörpervermittelte Ligation von ICAM-1 führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von zellulären Signaltransduktionsproteinen (p60<sup>src</sup> und Rho), welches die Phosphorylierung von Cytoskelettkomponenten und einer Lockerung von Zellkontakten zur Folge hat. Dies unterstützt die Leukozytenextravasation.

Aufgrund der Auswirkungen auf den Zellkontakt wurde die Phosphorylierung von VE-Cadherin nach ICAM-1 Crosslinking untersucht.

#### Benötigte Puffer und Reagenzien:

bEnd.5 Medium (+/- Serum) : siehe **2.2.3.1**. Serum-freies Medium enthält kein FCS.

PBS (Dulbecco)

Humanes TNF- $\alpha$ , 5 nM in serumfreiem Medium

Antikörper : Ratte anti ICAM-1 **YNI-1** und **25ZC7** monoclonal, **Schaf anti Ratte** polyclonal (von Biozol). Dieser Antikörper wird 3 x gegen 500 ml PBS dialysiert, da er Azid und Thimerosal als Konservierungsmittel enthält.

Inhibitoren (optional): Src-Inhibitor **SU-6656** (5  $\mu$ M)  
Rho-Inhibitor **Y-27632** (10  $\mu$ M)

1 x Lysispuffer : 20mM Tris-HCl pH 7,4 + 150mM NaCl + 1 % Triton X-100 + 1mM CaCl<sub>2</sub> + **50  $\mu$ M Na-Orthovanadat** + 1 Complete-Proteaseinhibitor - Tablette

Für ein Crosslinking – Experiment werden fünf konfluente 60mm Platten bEnd.5 benötigt. Diese Zellen werden 16-18 h vor Beginn des Experimentes TNF- $\alpha$  stimuliert und Serumgehungert. Beides wird in einem Arbeitsgang durch Absaugen des Standard-Mediums und Zugabe von **2 ml serumfreiem Medium mit 5 nM TNF- $\alpha$**  erledigt. Dies führt bei bEnd.5 zu einer verstärkten Oberflächenexpression von ICAM-1.

Zum eigentlichen Crosslink werden je **10 µg/ml YNI-1 und 25ZC7** in serumfreiem Medium verdünnt (1,5 ml pro Platte) und für **30 Min** auf die Zellen gegeben. Die Zugabe von **Inhibitoren** ist an dieser Stelle optional. Eine Platte (Zweitantikörper-Kontrolle) wird ohne Antikörper inkubiert.

Nach Ablauf der 30 Minuten werden die Antikörper 2 x kurz mit warmem PBS heruntergespült. Nach kurzem Abtropfen auf einem nassen Tuch werden auf jede Platte 1,5 ml serumfreies Medium mit **20 µg / ml Sheep-anti Rat Polyclonal** (Biozol) gegeben. Auf eine der Erstantikörper-behandelten Platten wird nur Medium gegeben (Erstantikörper Kontrolle).

Nun werden die Platten in den Brutschrank gestellt und zu den angegebenen Zeiten (5 Min, bis 30 Min) entnommen und lysiert. Die Lyse erfolgt durch dreimaliges Spülen der Platte mit warmem PBS, kurzem Abtropfen und anschließender Zugabe von **1 ml eiskaltem Lysispuffer**. Unmittelbar darauf werden die Zellen in Lysispuffer mit einem Cell-Lifter von der Platte gekratzt und mit der Pipette in ein Eppendorf-Gefäß auf Eis überführt. Dort verbleiben die Zellen, bis alle Proben nach 30 Min entnommen sind. Die eigentliche Lyse erfolgt auf dem End-over-End Schüttler im Kühlraum für 1h.

Nach einer 30-minütigen **Zentrifugation** bei ca. 20.000xg (14.000 rpm in der Eppendorf-Zentrifuge) und 4°C wird VE-Cadherin mit 3 µg C5-Se rum und 30 µl Protein A – Sepharose für **1 h immunpräzipitiert**.

Der Blot und Nachweis von VE-Cadherin sollte nach dem Protokoll für **Phosphotyrosinblots (2.2.2.10)** erfolgen!

### **2.2.2.14 Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen in *E.coli***

Das Glutathione-S-Transferase (GST) Fusionsprotein System dient der 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.

GST-Fusionsproteine der cytoplasmatischen Phosphatasedomäne von VE-PTP wurden für biochemische Interaktionsstudien eingesetzt. Hierfür wurden die Proteine in *E.coli BL-21* exprimiert und an Glutathion-Sepharose gekoppelt. Der *BL21*-Stamm zeichnet sich durch eine reduzierte proteolytische Aktivität aus, die auch die Reinigung größerer Proteinmengen ermöglicht.



Plasmid-DNA einbgesetzt, die vorher durch Ethanol-Fällung und Aufnahme in DEPC-H<sub>2</sub>O RNasefrei gereinigt wurde. Eine *in-vitro* Transkription wurde folgendermaßen angesetzt :

TNT-Quick Mastermix :	40 µl	
<sup>35</sup> S Methionin :	2µl	
Plasmid-DNA :	1µg (1µl)	
Hunde-Mikrosomenmembranen :	2 µl	
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 50 µl	2h Reaktion bei 30°C (Wasserbad).

### 2.2.2.16 Fluorographie

Nach Standard Gelelektrophorese wurden die gele für 30 Min in Amplify™ Lösung + 2 % (v/v) Glycerin eingelegt und getrocknet. Exposition auf Röntgenfilm oder Phosphorimager™.

## 2.2.3 Zellbiologische Methoden

### 2.2.3.1 Standardbedingungen für die Zellkultur

Eukaryontische Zellen wurden stets unter der Sterilbank gehandhabt und im Brutschrank bei 37°C und 100% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Abhängig vom Zelltyp wurden der CO<sub>2</sub> Gehalt und Mediumzusammensetzung variiert. Alle Zellen wurden bei Konfluenz mit Trypsin-EDTA abgelöst und für 5 Min bei 180 x g zentrifugiert. Nach Aufnahme in Medium konnten die Zellen in der gewünschten Dichte passagiert werden. Zellkulturplatten wurden gegebenenfalls für mindestens 30 Min gelatinisiert. Zellkulturmedien, PBS und alle weiteren Lösungen und Puffer für die Zellkultur wurden grundsätzlich vor Benutzung im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

<u>Zellen</u>	<u>Medium</u>	<u>CO<sub>2</sub></u>	<u>Handhabung</u>
MyEnd	DMEM + 10 % FCS (Bio West) + 1 % Penicillin / Streptomycin + 1 % L-Glutamin		
bEnd.3	Wie MyEnd, aber zusätzlich + 1 % nicht-essentielle Aminosäuren + 1 % Na-Pyruvat + 1 ‰ β-Mercaptoethanol	10 %	0,2 % Gelatine
bEnd.5			
HUVEC	M-199 + 20 % FCS (PAN) + 1 % Penicillin / Streptomycin + 1 ‰ ECGS (8%) + 1‰ Heparin (10%)	5 %	0,5 % Gelatine
COS-7	DMEM + 10 % FCS (PAN) + 1 % Penicillin / Streptomycin + 1 % L-Glutamin		
HEK293-A	Wie COS-7		

### **2.2.3.2 Einfrieren von Zellen**

Einfriermedium: 10% DMSO + 50 % FCS + 40 % DMEM bzw. M199

Die Zellen werden trypsiniert, in Medium aufgenommen und in der Megafuge bei 500 x g für 5 Min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wird das Zellpellet in 1 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert, schnell in vorgekühlte Kryoröhrchen (-80°C) überführt und in einem Metallblock einen Tag lang langsam auf -80°C abgekühlt. Die endgültige Lagerung erfolgt in flüssigem Stickstoff.

### **2.2.3.3 Auftauen und Revitalisieren von Zellen**

Nach der Entnahme des Kryoröhrchens aus dem N<sub>2</sub> - Tank wird es etwa 1 Min bei RT gehalten und dann im 37°C warmen Wasserbad unter Schwenken aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern vorhanden ist. Die Zellsuspension wird entnommen, in 5 ml Medium überführt und die Zellen in der Zentrifuge pelletiert (500 x g, 5 Min). Der Überstand wird schnell und sorgfältig abgesaugt, die Zellen in warmem Medium aufgenommen und ausplattiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um Reste von DMSO zu entfernen.

### **2.2.3.4 Immuncytochemie durch indirekte Immunfluoreszenz**

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz lassen sich die Expression und Verteilung von Proteinen in fixierten Zellen oder Geweben nachweisen. Dazu wird das Protein von einem spezifischen Erstantikörper gebunden, welcher wiederum durch einen Fluoreszenzgruppen - gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen wird.

#### Immuncytologie an bEnd.3 Endothelioma verschiedener Dichte :

Alle Schritte werden bei Raumtemperatur ausgeführt, falls nicht anders angegeben.

Um eine möglichst gute Morphologie der Zellen zu gewährleisten, wurden die Immunfärbungen auf Transwell-Filtern (Corning # 3413) durchgeführt. Diese wurden für 30 Min nach Herstellerangaben im Brutschrank mit Laminin (Sigma-Aldrich # L2020) beschichtet und anschließend für 1 h unter der Sterilbank getrocknet. In die obere Kammer der Filter wurden **1 x 10<sup>4</sup> Zellen bEnd.3** in 100µl Medium ausgesät, in die untere Kammer wurden 600 µl Medium gegeben, um hydrostatischen Druck zu verhindern. Kultivierung im Brutschrank, Medienwechsel alle 2 Tage. Unter diesen Bedingungen erreichen bEnd.3

nach vier Tagen Konfluenz. Je nach Experiment wurden Zellen nach zwei Tagen (subkonfluent), fünf Tagen (24 h konfluent) und acht Tagen (96 h konfluent) betrachtet.

Die Filter wurden am Tag der Immunfärbung 3 x kurz in PBS gespült (Becherglas) und direkt für 10 Minuten in eiskaltem Methanol (-20°C) im Gefrierschrank fixiert. Danach wurden die Zellen für 20 Min in PBS rehydriert und mit 1 % BSA in PBS (w/v) für mindestens 1 h blockiert. Primäre Antikörper für die Immunfärbung wurden in angegebener Konzentration für 1 h in Blockierungslösung auf die Filter gegeben.

<b><u>Antigen</u></b>	<b><u>Antikörper</u></b>	<b><u>Verdünnung</u></b>
VE-PTP	Ratten-mAk 109.1 / 109.3	10 µg / ml
	Polyklonales Kaninchenserum VEPTPc	2 µg / ml
VE-Cadherin	Ratten-mAk 11D4.1	10 µg / ml
	Polyklonales Kaninchenserum C5	5 µg / ml
GPP130	Maus-mAk anti GPP130	1 : 1000
	Polyklonales Kaninchenserum GPP130	
Mannosidase II	Polyclonales Kaninchenserum Mann. II	

Filter wurden 3 x für 5 Min in PBS gewaschen und erneut für 20 Min blockiert. Zugabe des sekundären Antikörpers für 30 Min. Fluoreszenzgruppen-gekoppelte Antikörper wurden grundsätzlich in einer Verdünnung von 1:300 eingesetzt. Eine Liste findet sich unter **2.1.7.2**. Die Inkubation sollte bei Dunkelheit stattfinden; es empfiehlt sich vorher eine fünfminütige Zentrifugation des Antikörpers bei 14.000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge). Die Filter werden dann 5 x für 5 Min in PBS gewaschen und kurz in ddH<sub>2</sub>O eingelegt. Dann werden die Membranen aus den Filtern ausgestanzt und auf einen Objektträger überführt (Zellen nach oben). Eindeckeln mit DAKO fluorescent Mounting Medium, über Nacht aushärten.

Die Präparate sollten im konfokalen Laserscanning-Mikroskop betrachtet werden, da die Filtermatrix eine starke Eigenfluoreszenz besitzt und im normalen Fluoreszenzmikroskop die Zellen überstrahlt.

### **2.2.3.5 Immunhistologie am Kryoschnitt**

Alle Schritte werden bei Raumtemperatur ausgeführt, falls nicht anders angegeben.

#### Benötigte Lösungen :

PBS + Azid :	150 ml PBS + 1 M NaN <sub>3</sub> (Endkonz.) + 500 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (37%)
Lösung A :	0,2 M Essigsäure in dd H <sub>2</sub> O
Lösung B :	0,2 M Natrium Acetat in dd H <sub>2</sub> O
Acetatpuffer :	74 ml Lösung A + 176 ml Lösung B pro Liter H <sub>2</sub> O. pH 4,7 einstellen !

Immunhistochemische Färbungen wurden an Gefrierschnitten von Maus Embryonen und adultem Gewebe durchgeführt. Zur Verstärkung des Signals wurde ein Biotin-Streptavidin-Peroxidasekomplex System der Firma Vector Laboratories eingesetzt.

Dafür wurden Verpaarungen von C57 Bl/6 Mäusen angesetzt und Embryonen der Stadien E7.5, E10.5, E12.5 und E14.5 entnommen. Zusätzlich wurden die Organe Leber, Niere, Gehirn und Herz präpariert. Sämtliche Gewebe wurden zum Ausbluten in eine Petrischale mit eiskaltem PBS gelegt. Anschließend wurden sie in ein Aluminium-Töpfchen überführt, welches zur Hälfte mit Tissue-TEK™ Cryo-matrix gefüllt war. So lassen sich die Gewebe, vor allem Embryonen, gut für die späteren Schnitte positionieren. Das Töpfchen wird dann vorsichtig mit Tissue-TEK aufgefüllt und auf einen Trockeneis Block gestellt. Das Präparat gefriert dann zügig von unten nach oben und kann bei -80°C gelagert werden.

Eingebettete Gewebe werden am Cryo-Mikrotom in etwa 7 µM dicke Scheiben geschnitten und auf einen warmen Objektträger gelegt, was zum sofortigen Schmelzen der Sektionen führt. Diese Objektträger können entweder sofort fixiert oder weiterhin bei -80°C gelagert werden.

Die Fixierung der Objekte erfolgte, nach Auftauen und Umranden des Gewebes mit einem DAKO-Pen, für 10 Min in eiskaltem Methanol (-20°C). Dazu sollten die Objektträger in eine Glasküvette im Gefrierschrank gestellt werden. Nach Fixierung werden die Präparate für einige Minuten in 1 x PBS rehydriert.

Zur irreversiblen Hemmung der endogenen Peroxidase werden die Präparate für 15 Min in PBS + Azid getaucht. In Geweben mit sehr hoher endogener Peroxidase Aktivität, wie der Leber, kann dieser Schritt auf 30 Min verlängert werden. In jedem Fall sollte die Lösung frisch angesetzt werden.

Die Objekte werden für mindestens 30 Min mit 2 % BSA in PBS blockiert. Hierfür werden etwa 100 µl der Lösung in den mit dem DAKO-Pen markierten Kreis pipettiert. Die Flüssigkeit kann sich so nicht unkontrolliert verteilen.

Der primäre Antikörper wird, nach Abklopfen der Blockierungslösung, in 1 % BSA in PBS verdünnt auf das Gewebe pipettiert. Inkubation für 1 h in einer feuchten Kammer . Die Tabelle gibt Aufschluß über die eingesetzten Antikörper und ihre Verdünnung.

<u>Antigen</u>	<u>Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>
VE-PTP	Ratten-mAk 89.1	Überstand unverdünnt
	Ratten-mAk 109.1	100 µg / ml oder Überstand unverd.
	Polykl. Kaninchenserum VEPTPc	2 µg / ml
ESAM	Ratten-mAk 1G8.2	2 µg / ml
Endomucin	Ratten-mAk 7C7.1	Überstand 1:10 verd.

Daraufhin wurden die Objektträger 1 x kurz und 3 x 5 Min in PBS gewaschen (Küvette). Um unspezifische Bindungsstellen für Streptavidin im Gewebe zu blockieren, wurde das "DAKO Biotin Blocking System" nach Anleitung eingesetzt.

Die Sekundäntikörper anti Ratte-Biotin bzw. anti Kaninchen-Biotin wurden 1 : 800 in 1 % BSA verdünnt und 30 Min mit dem Gewebe hybridisiert. Präparate dann 1 x 5 Min in PBS waschen. Nun wird die nach Anleitung hergestellte Vectastain Streptavidin-Peroxidasekomplexlösung für 30 Min auf die Schnitte gegeben. . Präparate 1 x kurz und 3 x 5 Min in PBS waschen.

Für die Substratreaktion werden je 150 ml kalter (4°C) und warmer (37°C) Acetatpuffer benötigt. Die AEC-Substratlösung, welche von der Peroxidase zu einem roten, unlöslichen Farbstoff umgesetzt wird und SEHR GIFTIG ist, wird vorbereitet, indem 3 Tabletten AEC in 7,5 ml N,N-Dimethylformamid gelöst werden (vor Licht schützen). Die Lösung wird zu 150 ml warmem Acetatpuffer gegeben und in eine Küvette faltenfiltriert. Unmittelbar vor der Reaktion werden 75 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (37%) zugegeben. Dann werden die Objektträger für 10 Min im Dunklen in die Substratlösung gestellt. Die Reaktion wird für 5 Min in kaltem Acetatpuffer gestoppt. Präparate zum Neutralisieren kurz in PBS stellen.

Gegenfärbung für 8 - 10 Sekunden (!) in filtrierter Meyer's Hämalaunlösung. Präparate sofort für 10 Min in Leitungswasser (!) bläuen und in Kaiser's Glyceringelatine eindecken. Auswertung der Objekte im Lichtmikroskop.

### **2.2.3.6 Durchflußcytometrie (FACS) an bEnd.3 Endothelioma**

Die Durchflußcytometrie ermöglicht die Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen auf Zellen. Die zu untersuchenden Proteine werden mit primären Antikörpern markiert, welche durch Fluoreszenzgruppen-gekoppelte Sekundäntikörper gebunden werden. Diese ermöglichen einen Nachweis über Excitation mit und Emission von Licht einer bestimmten Wellenlänge.

Während der Analyse werden die Größe und die Granularität der Zellen sowie die Intensität der Fluoreszenzemission ermittelt. Anhand dieser Daten läßt sich einer definierten Zell-Population ein Fluoreszenzsignal zuordnen, welches Aufschluß über den Expressionsgrad eines bestimmten Moleküles an der Oberfläche gibt. Zudem können verschiedene Zelltypen in einer gemischten Population anhand der Expression bestimmter Markerproteine getrennt voneinander analysiert werden.

### Benötigte Lösungen:

Zum Ablösen :            PBS + 5 mM EDTA Endkonzentration

FACS-Puffer :            PBS + 3 % FCS (PAN) + 0,04 % Natriumazid

bEnd.3 Endothelioma verschiedener Dichte wurden für 30 Min mit PBS-EDTA von der Zellkulturschale abgelöst und in kaltem (4°C) FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellzahl wurde durch Zählen mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. An dieser Stelle konnten die Zellen durch Zugabe von BD CellFix™ für 20 Min auf Eis fixiert werden. Nach Fixierung werden die Zellen 1 x mit FACS-Puffer gewaschen. Ca.  $6 \times 10^5$  Zellen wurden jeweils in den Rundboden-Napf einer 96-Well Zellkulturplatte gegeben und in der Heraeus-Zentrifuge bei 1400 rpm für 3 Min abzentrifugiert. Resuspendieren der in 100 µl FACS-Puffer, welcher den primären Antikörper enthält und Inkubation für 1 h auf Eis. Die Tabelle gibt die eingesetzten Antikörper und deren Verdünnung an.

<u>Antigen</u>	<u>Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>
VE-PTP	Ratten-mAk 109.3	10 µg / ml
VE-Cadherin	Ratten-mAk 11D4.1	
Isotypkontrolle	Ratten-mAk IgG2a	

Nach zweimaligem Waschen mit 200 µl FACS-Puffer wurde die Zellen in 100 µl FACS Puffer + 1 µl Esel Anti Ratte-PE Zweitantikörper resuspendiert und 30 Min auf Eis (dunkel) inkubiert. Nach weiteren drei Wäschen mit 200 µl FACS Puffer wurden die Zellen mit einem FACS-Calibur Gerät analysiert.

### 2.2.3.7 siRNA vermittelter "Knock-Down" der Expression von Proteinen

Um die Expression von Proteinen durch siRNA Technologie auszuschalten, wurden spezifische doppelsträngige RNA-Oligonukleotide mit Homologie zur mRNA des Zielproteins bei AMBION bestellt. Die Oligonukleotide werden als doppelsträngige RNA getrocknet in 20 nmol Aliquots geliefert, und können bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Bei Bedarf wird die RNA mit (mitgeliefertem) nukleasefreiem Wasser rekonstituiert. Im vorliegenden Fall werden 20 nmol RNA in 266 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen, was eine Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ergibt.

Folgende Oligonukleotide kamen in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz:

<u>Oligo</u>	<u>Sequenz 5' - 3'</u>
<b>hPTP-<math>\beta</math></b> sense	5' - GACAGUAUGAGGUGGAAGUtt - 3'
<b>hPTP-<math>\beta</math></b> antisense	5' - ACUUCCACCUCAUACUGUCTt - 3'
<b>mVE-Cadherin</b> sense	5' - CUGUGAAUUCACCCAGGGAtt - 3'
<b>mVE-Cadherin</b> antisense	5' - UCCUGGGUGAAUUCACAGtt - 3'
<b>Kontrolle</b> sense	5' - GGCCCAACGCCCAAGAAGtt - 3'
<b>Kontrolle</b> antisense	5' - CUUCUUGGGCGUUGGGGCCtt - 3'

#### Silencing von hPTP- $\beta$ in HUVEC :

Die Transfektion der HUVECs erfolgt mit dem AMAXA Nucleofector nach Protokoll mit dem AMAXA "HUVEC Nucleofection Kit V2.0". Für anfängliche Experimente wurden den Herstellerangaben entsprechend  $1 \times 10^6$  Zellen mit 5  $\mu\text{g}$  dsRNA transfiziert. Noch bessere Ergebnisse lassen sich mit  **$2 \times 10^6$  HUVEC Zellen und 6  $\mu\text{g}$  dsRNA** erzielen.

Die Zellen werden nach Transfektion auf gelatinisierter (30' mit 0,5% Gelatine in PBS) Zellkulturware ausplattiert, welche vorgewärmtes HUVEC-Medium enthält (**siehe 2.2.3.1**). Diese Bedingungen führen zu einer starken Reduzierung der VE-PTP Expression bis 48 h nach Transfektion.

#### Silencing von VE-Cadherin in bEnd.3 :

bEnd.3 Endothelioma, welche generell schwer transfizierbar sind, können sehr effizient mit siRNA unter Verwendung des AMAXA "Cell Line Nucleofection Kit V" transfiziert werden. Hierfür sollte mit  **$1,1 \times 10^6$  bEnd.3 Zellen und 3  $\mu\text{g}$  dsRNA** nach Vorschrift vorgegangen werden.

Die bEnd.3 werden anschließend auf gelatinisierter Zellkulturware (1 h mit 0,2% Gelatine in PBS) ausplattiert.

### **2.2.3.8 Präparation von humanen Granulozyten aus Vollblut**

Für Transmigrationsversuche (TMA) auf HUVEC werden frische humane Granulozyten (mit Neutrophilen) benötigt. Man nehme daher **ca. 20 ml Blut vom Menschen** für die Präparation.

#### Benötigte Lösungen :

Isotonische 0,9 % (w/v) NaCl – Lösung mit 10% (v/v) Citratpuffer

Histopaque 1077 & Histopaque 1119 (Sigma-Aldrich)

PMN – Medium : HBSS + 25 mM HEPES (Invitrogen)

ACK – Lösung : 0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA

TMA – Medium : 10 % (v/v) FCS (PAN), 1 % Glutamin, 25 mM HEPES in DMEM

#### **Alles bei RT !!! Nur Polypropylen verwenden, KEIN Polystyrol, KEIN Glas !!!**

Nach der Entnahme wird das Blut in den Citratpuffer-Röhrchen für 10 Min gewippt, dann in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt.

Zentrifugation bei 180 x g (1000 rpm) für 20 Min, ohne Bremse auslaufen lassen. Der Plättchen-haltige Überstand wird bis ca. 1 cm über dem Buffy-Coat abgesaugt, das Blut mit NaCl-Citratpuffer auf das Original-Volumen aufgefüllt.

Nochmal Zentrifugation bei 180 x g (1000 rpm) für 20 Min, ohne Bremse auslaufen lassen. Der Plättchen -haltige Überstand wird wieder bis ca. 1 cm über dem Buffy-Coat abgesaugt, das Blut mit NaCl-Citratpuffer auf das doppelte Original-Volumen aufgefüllt (am besten im 50 ml Tube). Beginn man mit 20 ml Vollblut, sollte man jetzt 40 ml Plättchen-depletiertes Blut+Citratpuffer haben.

In zwei 50ml Tubes werden Histopaque-Gradienten gegossen : Pro Gradient wird 10 ml Histopaque 1077 ins Tube gegeben und mit 10 ml Histopaque 1119 unterschichtet. Hierfür 10ml-Spritze und lange Kanüle benutzen. Auf einen Gradienten werden jetzt VORSICHTIG 20ml des plättchen-depletierten Blutes aufgelagert (mit einer Pipette).

Zentrifugation bei 750 x g (1800 rpm) für 30 Min, ohne Bremse. Der Überstand wird bis kurz vor die Granulozyten-Schicht abgesaugt. Die Granulozyten-Schicht wird mit einer Plastikpipette abgenommen (ca. 5 ml), in ein neues 15 ml Falcon überführt und mit PMN Medium auf 10 ml aufgefüllt. Zentrifugieren bei 1200 rpm, 10 Min. Waschen bei zu viel

Histopaque ggf. wiederholen. Das Pellet erscheint klein und rot. Zur Erythrozytenlyse wird das Pellet in 2 ml ACK-Lösung resuspendiert und 3' bei RT stehengelassen. Sofortige Zentrifugation bei 1200 rpm, 5 Min. Pellet in PMN-Medium aufnehmen und Zellen zählen. Zentrifugieren 1200 rpm, 10 Min, Zellen in passendem Volumen TMA-Puffer aufnehmen. OPTIONAL : Färbung der Zellen mit 2 µl CellTracker Orange / ml Medium für 45' im Brutschrank vor TMA !

### **2.2.3.9 Transmigrationsversuch auf Deckgläschen**

Der Transmigrationsversuch dient bietet ein Mittel, um Effekte auf die Integrität der endothelialen Adherens Junction zu quantifizieren. Hierbei lässt man humane polymorphonukleäre Neutrophile (PMNs) durch eine HUVEC-Zellschicht transmigrieren.

#### Benötigte Lösungen :

0,5 % Gelatine in PBS

HUVEC-Medium : Med.199 + Earle's salts (Invitrogen) + 20 % (v/v) FCS (PAN) + 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) + 1/1000 vol. 10% Heparin-Lsg + 1/1000 vol. 8% ECGS lsg.

PMN – Medium : HBSS + 25 mM HEPES (Invitrogen) auf Raumtemperatur

PBS + 1 mM MgCl<sub>2</sub> + 1 mM CaCl<sub>2</sub>

13mm Deckgläschen werden in eine 24 Well-Zellkulturschale mindestens 30 Min gelatinisiert. Hernach wird die Gelatine abgesaugt und 400 µl HUVEC-Medium / Well zum Äquilibrieren im Brutschrank zugegeben.

24 h vor dem eigentlichen Versuch werden die HUVECs nach Protokoll Si-RNA behandelt. Von diesen Zellen werden  $3 \times 10^5$  auf ein Coverslip gegeben. Hierfür empfiehlt es sich, den AMAXA Transfektionsansatz ( $2 \times 10^6$  Zellen + 6 µg dsRNA) in 3,9 ml warmem HUVEC-Medium aufzunehmen, was  $4 \times 10^5$  Zellen / 100µl entspricht. Davon werden dann 600 µl / Well (=  $3 \times 10^5$  Zellen) ausgesät. Eine hTNF- $\alpha$  Stimulation mit 5 nm TNF- $\alpha$  Endkonzentration (1/100 Stock) sollte für 16-20 h vor dem Assay durchgeführt werden.

**Eigentlicher TMA** : Nach etwa 24 h sollten die Si-RNA transfizierten HUVECs eine konfluente Zellschicht auf den Deckgläschen gebildet haben. Zu dieser Zeit ist der Silencing-Effekt von VE-PTP am größten.

Humane Granulozyten wurden nach dem obigen Protokoll präpariert. Währenddessen wird das Medium von den HUVECs auf den Coverslips durch 300µl frisches (ohne TNF- $\alpha$ ) ersetzt.  $4 \times 10^5$  Granulozyten werden in 100 µl TMA – Medium zu einem Well + Deckglas pipettiert. Nach **10-20 Min** sind zahlreiche Neutrophile durch das Monolayer migriert und als graue, lichtundurchlässige Ovale zu erkennen.

Die Deckgläser werden jetzt 3 x mit PBS + Mg + Ca gewaschen & die Zellen für 30 Min mit 2 % Glutaraldehyd in PMN-Medium auf Eis fixiert. Nach weiteren 3 x Waschen werden die Gläser mit Glyceringelatine eingedeckt und im Phasenkontrast betrachtet. Der Versuch kann auch gestaffelt durchgeführt werden, um verschiedene Migrationszeiten anzusehen.

### **2.2.3.10 Untersuchung der parazellulären Permeabilität von Endothelzellen**

Um die Integrität der endothelialen Adherens Junction experimentell zu untersuchen, können Endothelzellen auf Transwell-Filtern ausgesät werden, welche die Diffusion von niedermolekularen Farbstoffen durch die Zellschicht hindurch erlauben. Nach Zugabe des Farbstoffes in die obere Kammer der Filter findet, abhängig von der Festigkeit der Zell-Zellkontakte, eine unterschiedlich starke Diffusion der Farbe in die untere Kammer statt. In dieser Arbeit wurden Permeabilitätsversuche mit HUVEC und bEnd.5 durchgeführt.

#### HUVEC nach siRNA von VE-PTP :

Nach Transfektion mit siRNA (**2.2.3.7**) wurden  $5 \times 10^4$  Zellen auf einen Transwell-Filter (Costar #3413) ausgesät. Die Transwell-Filter wurden für mindestens 30 Min mit 0,5 % Gelatine in PBS gelatinisiert. Die Zellen werden in 100 µl Medium in die obere Kammer des Filters pipettiert und etwa 15 Min bei Raumtemperatur unter der Sterilbank belassen. Dies führt zu einem gleichmäßigen Absetzen der Zellen, was für den Versuch essentiell ist ! Danach wurden die Filter in den Brutschrank überführt, um die Zellen für einige Stunden anwachsen zu lassen. Dann werden 600 µl HUVEC-Medium in die untere Kammer des Filters gegeben und die Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert. 24 h nach der Transfektion haben die HUVECs eine konfluente Zellschicht gebildet. Nun werden 10 µl einer 2,5 mg/ml 40 Kilodalton FITC-Dextran-Lösung (Molecular Probes) in die obere Kammer gegeben. Hierzu sollte die Lösung als Tropfen von der Spitze einer feinen Pipette

auf die Oberfläche des Mediums "aufgesetzt" werden. So werden mechanische Irritationen der Zellen vermieden. Die Diffusionszeit beträgt **30 Minuten bei 37°C**.

### bEnd.5 nach ICAM-1 "Crosslinking" :

Die Versuche mit bEnd.5 Endothelioma wurden im Prinzip ähnlich wie mit HUVECs durchgeführt. Konfluente bEnd.5 wurden von 100 mm Zellkulturplatten abgelöst und auf Transwell-Filtern (Costar # 3413) ausgesät. Dabei wurde schlicht ein Teilungsverhältnis von 1 : 1,2 eingehalten, damit die Zellen möglichst schnell konfluent wurden. Die Zellen wurden wieder in 100 µl Medium zur oberen Filterkammer gegeben und 15 Min absetzen gelassen. Nach einigen Stunden im Brutschrank wurden 600 µl Medium in die untere Kammer gegeben. Die Zellen erhielten 7-8 Tage Zeit, um eine konfluente Zellschicht zu bilden. Medienwechsel alle 2 Tage.

17 h vor dem eigentlichen Versuch wurde in die untere Kammer frisches serumfreies Medium mit 5 nm TNF- $\alpha$  gegeben, wie für die ICAM-1 Quervernetzung erforderlich (siehe **2.2.2.13**). Nach Absaugen der oberen Kammer wurden sofort 100 µl serumfreies Medium mit je 10 µg/ml primären ICAM-1 Antikörpern zugefügt und 30 Min inkubiert. Nach Umsetzen der Filter in eine untere Kammer mit frischen 600 µl Medium wurde die obere kammer absaugen und 100 µl serumfreies Medium mit 20 µg/ml sekundärem Antikörper und 0,5 mg/ml 40 kDa FITC-Dextran (Molecular Probes) für **1 h bei 37 °C** zugegeben.

Nach Beendigung der Diffusionszeit werden die Filter aus der unteren Kammer entnommen und dabei einmal an der Wand des Wells abgestreift. Nach etwa 10 Min in einer dunklen Box zum Äquilibrieren auf Raumtemperatur wird die Fluoreszenz jedes Wells in einem Fluorimeter gemessen.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Untersuchungen zu VE-PTP und VE-Cadherin**

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden die in der Arbeitsgruppe Vestweber begonnenen Studien zur Vaskulären Endothelialen Protein Tyrosin Phosphatase VE-PTP fortgeführt. Die Assoziation mit VE-Cadherin und die biologische Funktion des Moleküls sollten weiter charakterisiert werden. Zusätzlich wurde die gewebespezifische Verteilung der Phosphatase untersucht.

#### **3.1.1 VE-PTP Lokalisation im Endothel**

In Vorarbeiten wurde durch in-situ Hybridisierung eine endotheliale Expression von VE-PTP sowohl im Embryo als auch in neugeborenen Mäusen gezeigt (Fachinger *et al.*, 1999). Um diesen, auf die Transkriptionsebene beschränkten Befund zu bestätigen und zu erweitern, wurden immunhistologische Untersuchungen am Embryo und an adulten Organen der Maus durchgeführt. Weitere Vorarbeiten beschrieben die Interaktion von VE-PTP mit dem endothelialen Zelladhäsionsmolekül VE-Cadherin über die extrazellulären Domänen beider Proteine (Nawroth *et al.*, 2002). Voraussetzung hierfür ist die zumindest zeitweise räumliche Nähe der Moleküle in der Zelle. Daher wurde in immuncytologischen Studien die subzelluläre Lokalisation von VE-PTP untersucht.

##### **3.1.1.1 Untersuchung der gewebespezifischen Verteilung von VE-PTP mittels Immunhistochemie**

Zum Zeitpunkt der vorhergehenden Studien waren noch keine Antikörper gegen VE-PTP vorhanden, welche erfolgreich in Immunfärbungen einsetzbar gewesen wären. Mit der Herstellung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen VE-PTP durch Roman Nawroth und Ute Ipe sind jetzt Voraussetzungen geschaffen, welche die immunhistochemische Untersuchung der Verteilung der Phosphatase erlauben. Der mAk 109 und Subklone reagiert mit der murinen VE-PTP und ist für Immunfluoreszenz, Immunhistochemie und Westernblot / Immunpräzipitation sehr gut geeignet. Das polyklonale Serum VE-PTPc reagiert mit dem murinen sowie humanen Protein und ist effektiv für biochemische Anwendungen einsetzbar.

Für die Untersuchung wurden Embryonen und Organe von Wildtyp Mäusen des Stammes C57 BL/6 in eine Cryo-Matrix eingebettet. Gefrierschnitte der Gewebe wurden wie in

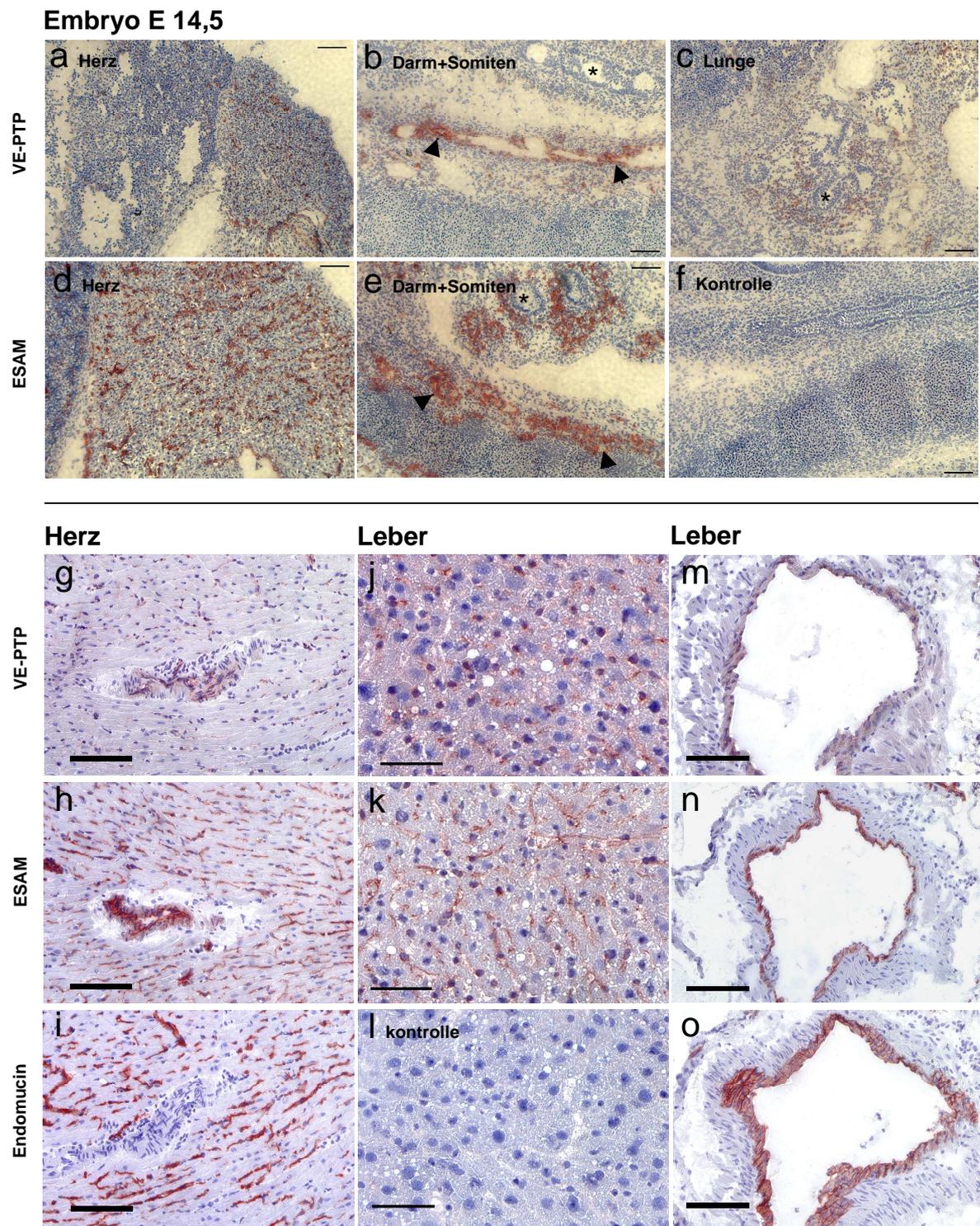
**2.2.3.5** beschrieben fixiert und mit primären und sekundären Antikörpern inkubiert und angefärbt. Untersucht wurden Sagittalschnitte von Embryonen der Stadien **E 7,5**; **E 10,5**; **E 12,5** und **E 14,5**, sowie die Organe **Herz**, **Leber**, **Niere** und **Gehirn** von adulten Mäusen.

**Abbildung 3.1** zeigt eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse. Von den untersuchten Embryonalstadien und adulten Organen sind **E 14,5** (**Abb. 3.1 a-f**) und Schnitte vom Herz und der Leber (**Abb. 3.1 g-o**) abgebildet.

Im Embryo fällt die intensive Färbung von großen Gefäßen auf, wie in **Bild 3.1 b**. Das Bild zeigt den Verlauf der dorsalen Aorta. Die das Gefäß auskleidenden Endothelzellen deutlich VE-PTP positiv. Kleinere Gefäße sind meist schwächer gefärbt, wie im Herz (**Bild 3.1 a**) und in der Lunge (**Bild 3.1 c**) zu sehen ist. Die Verteilung von VE-PTP wurde in Serienschnitten mit den endothelialen Markerproteinen ESAM (Nasdala *et al.*, 2002) und Endomucin (Samulowitz *et al.*, 2002) verglichen. Das Verteilungsmuster von ESAM, obwohl der eingesetzte Antikörper deutlich stärkere Signale produziert, stimmt stets mit dem von VE-PTP überein. Dadurch kann auf eine endotheliale Expression der Phosphatase geschlossen werden. Auf Epithelien des Darmes und der Lunge (**Bild 3.1 b+c**, Sternchen), welche anhand ihrer kolumnaren Morphologie erkennbar sind, läßt sich hingegen kein VE-PTP nachweisen. **Bild 3.1 f** zeigt ein Kontrollpräparat, welches ohne primären Antikörper gefärbt wurde. Darauf sind keine unspezifischen Signale sichtbar.

In adulten Organen verhält sich die Expression von VE-PTP analog zur Situation im Embryo. Kleinere Gefäße, welche im Herz zwischen den Kardiomyozyten (**Bild 3.1 g**) und in der Leber zwischen den Hepatozyten (**Bild 3.1 j**) verlaufen, sind schwach VE-PTP positiv. ESAM als endothelialer Marker zeigt ein vergleichbares Verteilungsmuster wie VE-PTP (**Bilder 3.1 h+k**). Große Gefäße zeigen wiederum vergleichsweise deutliche VE-PTP Signale, wie in der Leber (**Bild 3.1 m**) dargestellt. Hier stimmt die VE-PTP- Lokalisation mit der von ESAM und auch Endomucin überein (**Bild 3.1 n+o**).

Ein interessanter vorläufiger Befund ergibt sich im direkten Vergleich der Verteilungsmuster von VE-PTP und Endomucin. In einigen Fällen wurde deutlich, daß große ESAM-positive Gefäße stets VE-PTP, aber häufig kein Endomucin exprimieren. Ein Beispiel ist auf **Abb. 3.1 g-i** im Herz zu sehen. Kleine Gefäße sind positiv für alle drei Proteine, das große Gefäß hingegen exprimiert kein Endomucin. In der Leber findet sich ein Beispiel für ein großes Gefäß, welches positiv für VE-PTP, ESAM *und* Endomucin ist (**Abb. 3.1 m-o**). Hierbei könnte es sich um die dorsale Aorta handeln. Endomucin wird präferentiell auf venösem Endothel exprimiert, wobei eine arterielle Expression auf der dorsalen Aorta nachgewiesen wurde (Brachtendorf *et al.*, 1999; Samulowitz *et al.*, 2002). Eine differentielle Expression von VE-PTP und Endomucin könnte einen Hinweis auf die arterielle Lokalisation der Phosphatase geben (S. Bäumer, persönliche Mitteilung). Nähere Untersuchungen zu diesem Thema sind im Gange.



**Abb. 3.1 : VE-PTP wird im Endothel exprimiert. (a-f) : Lokalisation auf Cryoschnitten von Mausembryonen.** Schnitte von C57Bl/6 Embryonen im Stadium E 14,5 wurden mit einem Antikörper gegen VE-PTP (a-c) oder gegen ESAM (d+e) angefärbt. (f) : Kontrolle ohne primären Antikörper. Die Pfeilspitzen markieren den Verlauf der dorsalen Aorta, der Stern markiert kolumnares Epithel aus der Lunge (c) und dem Darm (b+e) Balken : 50  $\mu$ m

**(g-o) : Lokalisation auf Cryoschnitten von adulten Organen.** Schnitte von Organen adulter C57Bl/6 Mäuse wurden mit Antikörpern gegen VE-PTP (g, j, m), gegen ESAM (h, k, n) oder gegen Endomucin (i + o) gefärbt. Zur Kontrolle ist ein Präparat ohne ersten Antikörper abgebildet (l). Dargestellt sind Schnitte aus dem Herz (g-i) und aus der Leber (j-o). Balken : 250  $\mu$ m

Zusammenfassend bestätigen die Experimente den ursprünglichen Befund einer endothelialen Lokalisation von VE-PTP auf Proteinebene. Nicht gezeigt sind Aufnahmen, welche unter Verwendung der mAbs 89.1 und 91.1 sowie des polyklonalen Antikörpers VEPTPc gegen VE-PTP entstanden und die gezeigten Daten bestätigen. Die immunhistologischen Untersuchungen ergaben keinen Hinweis auf eine epitheliale Expression von VE-PTP.

Weiterhin wurden Versuche an Paraffinschnitten von adulten Organen und Embryonen durchgeführt. Diese führten jedoch mit den verfügbaren VE-PTP Antikörpern, die nicht paraffingängig sind, zu keinem Ergebnis.

### 3.1.1.2 Untersuchung der subzellulären Verteilung von VE-PTP mittels Immuncytologie

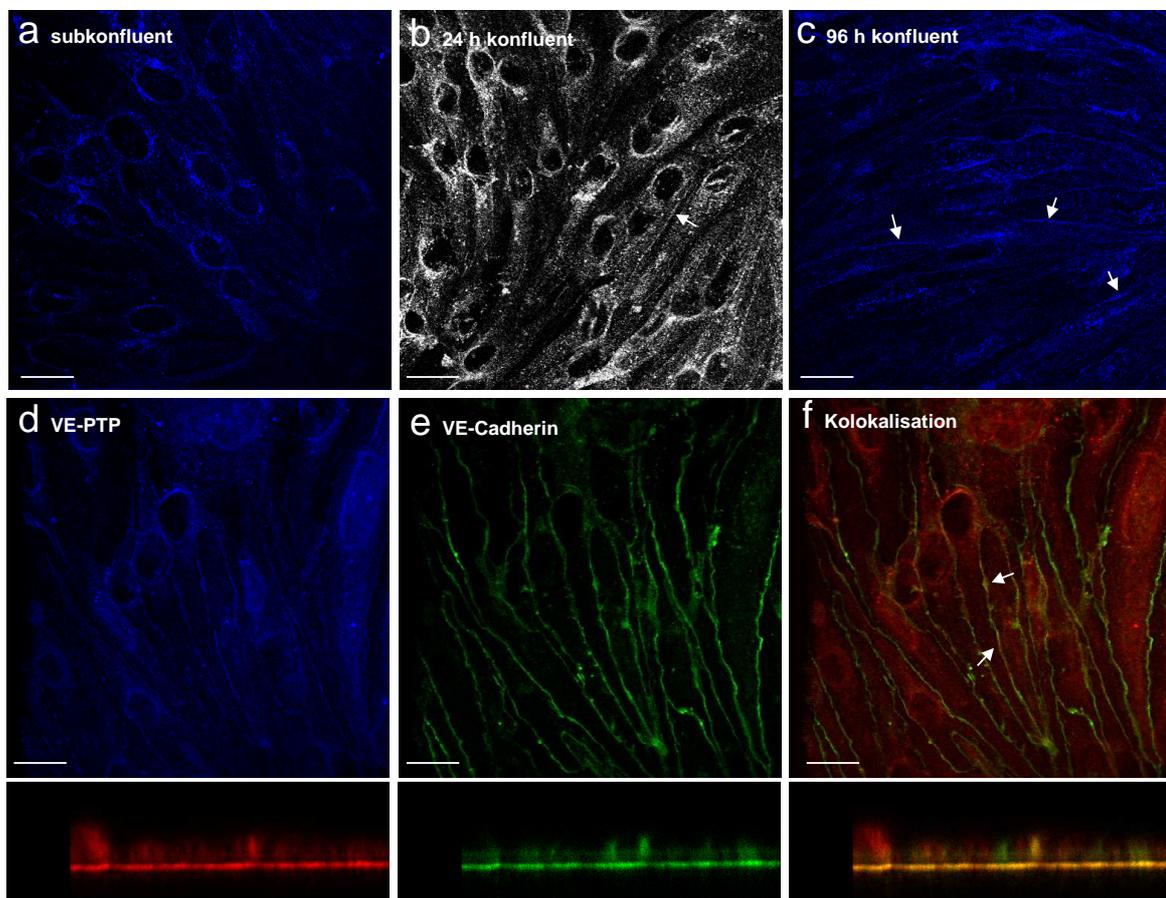
Die in Vorarbeiten begonnenen Untersuchungen zur Funktion von VE-PTP in CHO-Zellen lassen eine Expression der Phosphatase an der Zelloberfläche erwarten. Dort kann sie mit dem Adherens Junction Protein VE-Cadherin interagieren und die beschriebenen Effekte auf den Zellkontakt ausüben (Nawroth *et al.*, 2002).

Um die subzelluläre Lokalisation von VE-PTP zu untersuchen, wurden bEnd.3 Endothelioma wie in **2.2.3.4** beschrieben fixiert und mit dem monoklonalen Antikörper 109.1 angefärbt, der gegen die extrazelluläre VE-PTP-Domäne gerichtet ist (**Abb. 3.2 a-c**). Dabei fiel eine zelldichteabhängige Veränderung der Lokalisation von VE-PTP auf. In subkonfluenten Endothelioma ist VE-PTP nur in intrazellulären Kompartimenten nachweisbar, nicht jedoch an der Zelloberfläche (**Bild 3.2 a**). bEnd.3, welche ca. 24 h vor Fixierung Konfluenz erreichten, zeigen schwache und unregelmäßige VE-PTP-Signale an Zell-Zellkontakten (**Bild 3.2 b**). Allerdings ist VE-PTP im Großteil der Zellen dieses Dichtestadiums weiterhin vorwiegend intrazellulär nachweisbar. Erst in hoch konfluenten Endothelioma ist VE-PTP deutlich an Zellkontakten zu sehen. Die Zellen in **Bild 3.2 c** erreichten Konfluenz 96 h vor Fixierung. In solchen Präparaten weist der überwiegende Teil der Zellen deutliche VE-PTP-Signale am Zell-Zellkontakt, jedoch kaum noch in intrazellulären Kompartimenten auf. Kolokalisationsexperimente mit Golgi- und frühen endosomalen Markern ergaben keinen schlüssigen Hinweis auf die Identität des intrazellulären Bereiches, der in weniger dichten bEnd.3 positiv für VE-PTP ist (Daten nicht gezeigt, siehe aber auch **Kapitel 3.3.3**).

In feiner abgestuften Experimenten wurde der Zeitpunkt der beginnenden Lokalisation von VE-PTP am Zellkontakt etwa parallel zur einsetzenden Konfluenz bestimmt. Deutliche Signale am Zellkontakt finden sich etwa 48 h nach Erreichen der Konfluenz in einer signifikanten Zahl von Zellen des Präparates (nicht gezeigt). Im direkten Vergleich

zwischen **Abb. 3.2 c**, welche mit dem mAk 109.1 gegen VE-PTP entstand und **Abb. 3.2 d**, für die das polyklonale VEPTPc Serum eingesetzt wurde, fällt die deutlich höhere Qualität der unter Verwendung des mAbs entstandenen Aufnahmen auf. Dennoch zeigen beide Antikörper eine Lokalisation von VE-PTP im Zellkontakt hoch konfluenten Endothelioma.

Zur Klärung der Frage, ob VE-PTP und VE-Cadherin miteinander kolokalisieren, wurden sehr dichte bEnd.3 Zellen untersucht, welche 72 h vor Fixierung konfluent wurden. Für die Immunfärbung wurden das polyklonale Serum VE-PTPc und der VE-Cadherin mAk 11D4.1 eingesetzt. Obwohl die VE-Cadherin-Signale deutlich stärker sind als die VE-PTP Färbung, läßt sich in der Doppelfluoreszenz eine gute Kolokalisation beider Proteine zeigen (**Abb. 3.2 d-f**).



**Abb. 3.2 (a-c) : VE-PTP lokalisiert verstärkt in Zellkontakten auf bEnd.3 Endothelioma steigender Dichte.** Die Zellen wurden auf Transwell-Filtern ausgesät und waren zum Zeitpunkt der Immunfärbung mit dem mAk 109.1 gegen VE-PTP subkonfluent (a), 24 h konfluent (b) oder 96 h konfluent (c). Der Pfeil markiert VE-PTP an Zellkontaktstellen.

**(d-f) : VE-PTP und VE-Cadherin kolokalisieren in hoch konfluenten bEnd.3 Endothelioma.** 72 h konfluente Zellen auf Transwell-Filtern wurden mit einem polyklonalem Antikörper gegen VE-PTP (d) und mAk 11D4.1 gegen VE-Cadherin gefärbt (e). (f) zeigt die Doppelfärbung. Unter (d-f) sind Z-scans von Präparaten abgebildet. Pfeile weisen auf Bereiche mit VE-PTP und VE-Cadherin Kolokalisation. Der Balken entspricht 20 µm.

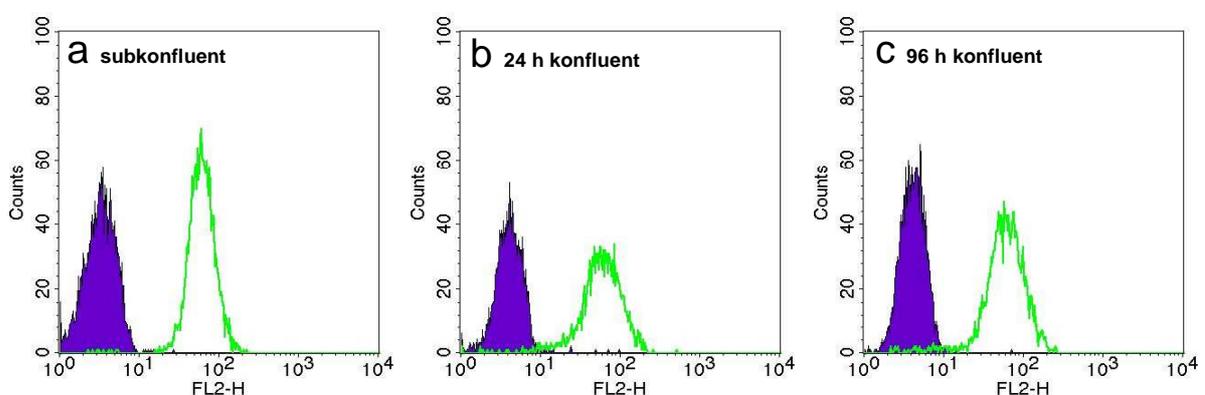
Die Experimente ergaben, daß VE-PTP in bEnd.3 Endothelioma mit steigender Dichte zunehmend am Kontakt zwischen benachbarten Zellen lokalisiert ist. Erste Signale werden mit Erreichen der Konfluenz sichtbar. Subkonfluenten Zellen zeigen VE-PTP in der Immunfluoreszenz nur in einem intrazellulären, perinukleären Kompartiment. In konfluenten Zellen ist VE-PTP mit VE-Cadherin im Zell-Zellkontakt kolokalisierbar.

Experimente mit humanen primären Endothelzellen (HUVEC) ergaben vergleichbare Ergebnisse. Der einzig verfügbare Antikörper gegen humanes VE-PTP ist ein polyklonales Kaninchenserum, welches in der Immunfluoreszenz Bilder von nur mäßiger Qualität liefert (vgl. auch **Kap. 3.3.3**). Daher wurde auf eine grafische Darstellung der Daten verzichtet.

### 3.1.1.3 Untersuchung der dichteabhängigen Zelloberflächenexpression von VE-PTP mittels Durchflußcytometrie

Die verstärkte Lokalisation von VE-PTP am Zell-Zellkontakt mit steigender Zelldichte könnte mehrere Ursachen haben : Zum einen wäre die Hochregulierung der VE-PTP Synthese auf Transkriptionsebene möglich. Auch eine Umverteilung von intrazellulär gespeichertem VE-PTP an die Zelloberfläche wäre denkbar. In beiden Fällen sollte die Oberflächenexpression der Phosphatase mit steigender Zelldichte zunehmen. Alternativ wäre eine konstante Oberflächenexpression von VE-PTP mit einer gezielten Rekrutierung der Phosphatase zum Zellkontakt bei steigender Zelldichte möglich.

Daher wurde die Zelloberflächenexpression von VE-PTP auf bEnd.3 Endothelioma verschiedener Dichte mittels Durchflußcytometrie (FACS, **2.2.3.6**) untersucht. Hierfür wurden Zellen, welche zum Zeitpunkt der FACS-Färbung bis zu 96 h konfluent waren, entweder mit Antikörpern gegen VE-PTP (mAk 109.3) oder mit einer Ratte-IgG2a Isotypkontrolle gefärbt. Das Ergebnis ist in **Abb. 3.3** dargestellt.



**Abb. 3.3 : VE-PTP Oberflächenexpression auf bEnd.3 Endothelioma steigender Dichte bleibt unverändert.** bEnd.3 Zellen, welche (a) subkonfluent, (b) 24 h konfluent und (c) 96 h konfluent waren, wurden fixiert und im FACS auf Oberflächenexpression von VE-PTP (grün) hin untersucht. Blaue Fläche : Isotypkontrolle.

In mehreren unabhängigen Experimenten wurde deutlich, daß VE-PTP bei steigender Zelldichte konstant an der Zelloberfläche exprimiert bleibt. Dieses Ergebnis wurde sowohl mit fixierten als auch mit unfixierten Zellen bestätigt. Zusammen mit dem Befund der verstärkten dichteabhängigen Kontaktlokalisation von VE-PTP (siehe **3.1.1.2**) spricht es für eine zelldichteabhängige Konzentrierung von VE-PTP am Zellkontakt.

Zusätzliche Untersuchungen zur VE-PTP Lokalisation an der Zelloberfläche durch Oberflächenbiotinylierung sowohl von adhärenenten als auch in Suspension befindlichen Zellen lieferten keine schlüssigen Ergebnisse (nicht gezeigt).

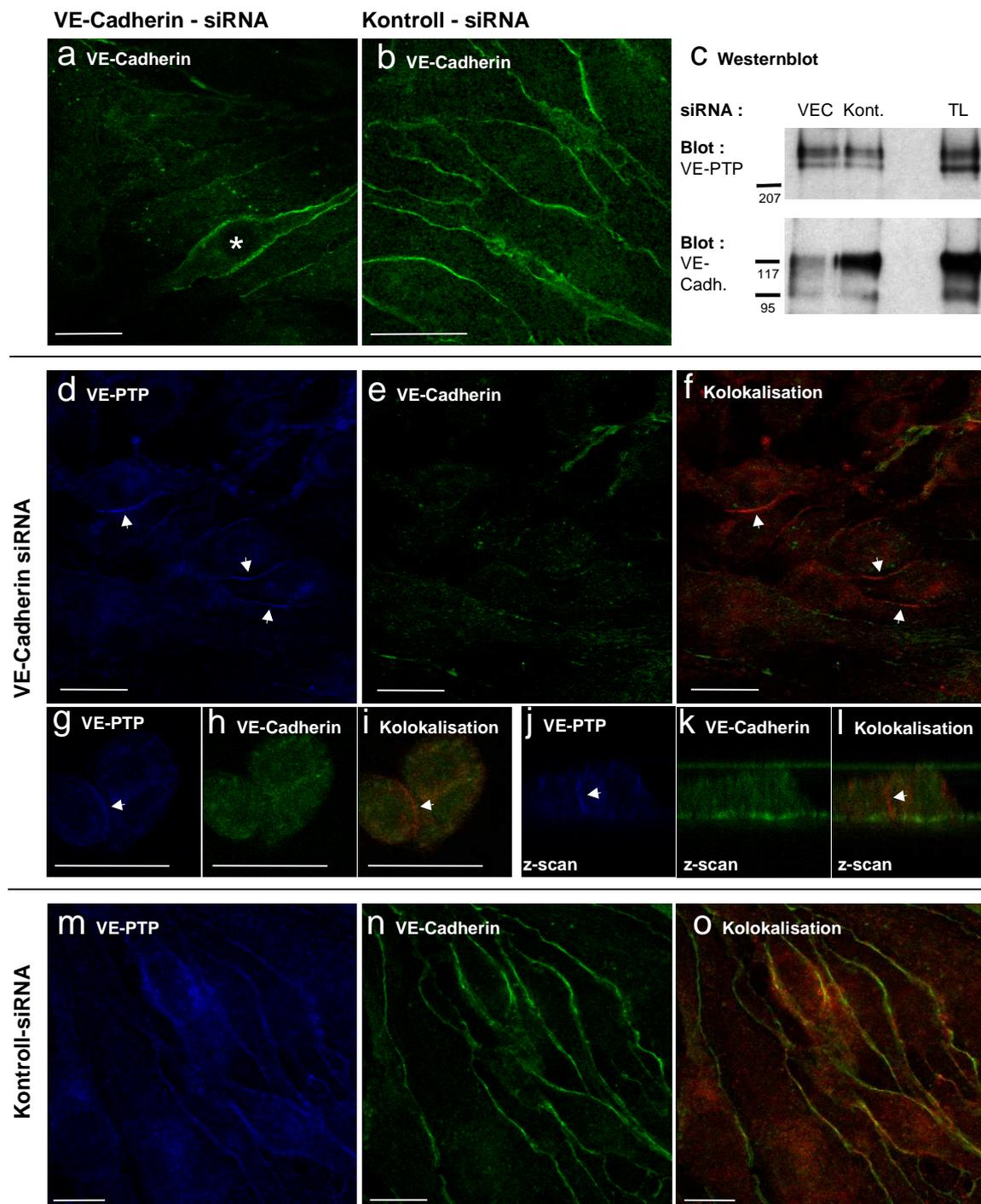
Die Ergebnisse der Versuche deuten auf eine konfluenz-unabhängige Gesamtoberflächenexpression von VE-PTP hin. Bei steigender Zelldichte scheint die in subkonfluenten Zellen diffus auf der Zelloberfläche verteilte VE-PTP gezielt in den Zellkontakt umgelagert zu werden. Die Bedeutung der intrazellulären Akkumulation der Phosphatase in Endothelioma geringer Dichte ist in diesem Zusammenhang unklar.

### **3.1.1.4 siRNA-induzierter "Knock-down" von VE-Cadherin hat keinen Einfluß auf die Lokalisation von VE-PTP**

VE-Cadherin als Interaktionspartner von VE-PTP ist bereits bei der Ausbildung der frühesten Zellkontakte ein essentieller und ständiger Bestandteil der endothelialen Adherens Junction. Auch in subkonfluenten Zellen ist es im Zell-Zellkontakt lokalisiert (Lampugnani *et al.*, 1995). Die in den beiden vorangegangenen Kapiteln beschriebene dichteabhängige Umlagerung von VE-PTP an den Zellkontakt könnte daher mechanistisch über eine Rekrutierung durch VE-Cadherin erklärt werden.

Um die Bedeutung von VE-Cadherin für die VE-PTP Lokalisation zu überprüfen, wurde VE-Cadherin in bEnd.3 Endothelioma mittels siRNA inhibiert (siehe **2.2.3.7**). Ein eventueller Effekt auf die Verteilung von VE-PTP sollte anschließend in immuncytologischen Studien überprüft werden. **Abbildung 3.4** faßt die Ergebnisse zusammen.

**Abb. 3.4 a-c** demonstriert die deutlich verminderte Expression von VE-Cadherin nach siRNA in der Immunfluoreszenz (**Bilder 3.4 a-b**) und im Westernblot (**Bild 3.4 c**). In der Immunfluoreszenz wurde VE-Cadherin mit einem polyklonalen Kaninchenserum (C5) nachgewiesen, VE-PTP mit dem mAk 109.3. 24 Stunden nach Transfektion von bEnd.3 Zellen mit dsRNA Oligonukleotiden wurden Totallysate mit dem mAk 11D4.1 auf die VE-Cadherin Proteinexpression hin untersucht. Die sichtbare stark verringerte VE-Cadherin Expression nach RNA-Interferenz erholt sich nach 48 h jedoch wieder auf Kontrollniveau (nicht gezeigt). Dadurch kann auf einen hohen Turn-Over des Cadherins geschlossen werden.



**Abb. 3.4 : Knock-Down von VE-Cadherin in bEnd.3 durch siRNA hat keinen Einfluß auf die Lokalisation von VE-PTP in den Zellkontakten. (a-c) :** VE-Cadherin spezifische siRNA führt zu verringerter Expression des Proteinies in bEnd.3 endothelioma. VE-Cadherin Immunfärbung in (a+b). Der Stern kennzeichnet eine untransfizierte Zelle mit normaler VE-Cadherin Expression. (c) zeigt einen Westernblot 24 h nach Transfektion des VE-Cadherin spezifischen Oligonukleotids (VEC) und Kontroll-Oligonukleotid (Kont.). TL ist bEnd.3 Totallysat. **(d-o) :** Lokalisation von VE-PTP, VE-Cadherin und Kolokalisation (siehe Bildüberschriften) 24 h nach Transfektion von VE-Cadherin siRNA (d-l) oder Kontroll siRNA (m-o). (j-l) zeigen Z-scans der in (g-i) gezeigten Präparate. Pfeile verweisen auf Regionen mit VE-PTP, aber ohne VE-Cadherin Expression. Balken = 20 µm.

Die Experimente mußten folglich innerhalb von 24 h nach der Transfektion durchgeführt werden. Daher wurden die Endothelioma in sehr hoher Dichte ( $1 \times 10^5$  Zellen pro Transwell-Filter) ausgesät, um bereits nach 24 h eine gut sichtbare Kolo-kalisation von VE-PTP und VE-Cadherin im Zellkontakt zu erreichen. **Abb. 3.4 m-o** zeigt, daß dies möglich ist. Auch nach dem gezielten Ausschalten von VE-Cadherin durch siRNA bleibt VE-PTP deutlich am Zellkontakt lokalisiert, wie in **Abb. 3.4 d-l** zu sehen. Die VE-PTP Signale markieren den Verlauf der Zell-Zellkontakte, welche im Vergleich zur Kontrolle fast kein VE-Cadherin mehr aufweisen. In den Z-scans der Präparate **3.4 j-l** wird deutlich, daß VE-PTP entlang des gesamten parazellulären Spaltes lokalisiert ist.

Dieser Versuch zeigt, daß siRNA vermitteltes Ausschalten von VE-Cadherin keinen Einfluß auf die Lokalisation von VE-PTP am Zellkontakt hat.

### **3.1.2 Die VE-PTP - VE-Cadherin Interaktion**

VE-PTP und VE-Cadherin sind biochemische und funktionelle Interaktionspartner, wie von Nawroth *et al.*, 2002 gezeigt wurde. In Endothelzellen kommt es allerdings erst nach Erreichen einer hohen Zelldichte zu einer Kolo-kalisation der beiden Proteine. Daher stellt sich die Frage, ob die konfluenzabhängige Umlagerung von VE-PTP an den Zellkontakt die Assoziation der Phosphatase mit VE-Cadherin beeinflußt.

#### **3.1.2.1 VE-PTP und VE-Cadherin assoziieren verstärkt mit steigender Zelldichte**

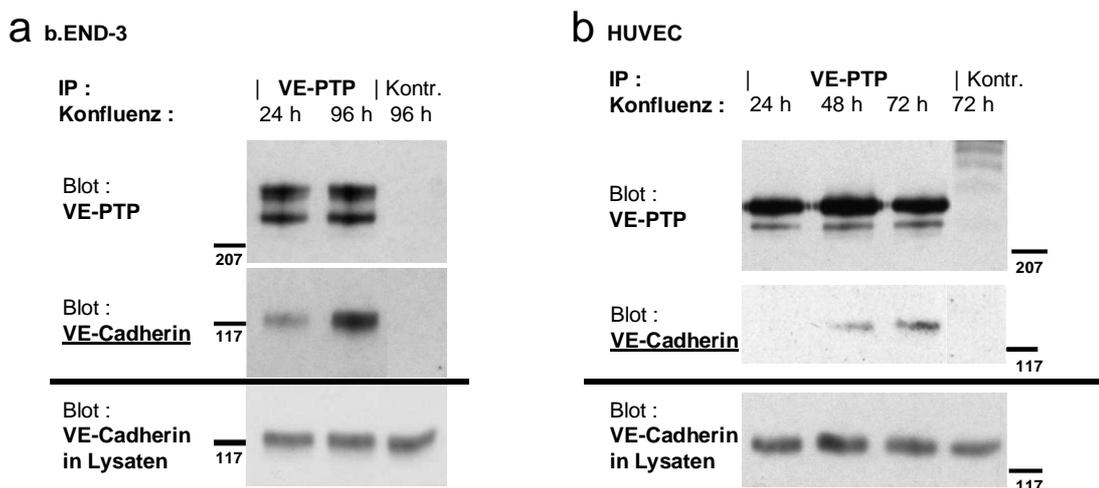
Um eine mögliche Dichteabhängigkeit der VE-PTP - VE-Cadherin Interaktion zu unteruchen, wurden Ko-Immünpräzipitationsexperimente (IP) an bEnd.3 Endothelioma und HUVEC verschiedener Konfluenz durchgeführt (**2.2.2.11**).

Als Material dienten ca.  $2,5 \times 10^7$  Zellen bEnd.3 beziehungsweise ca.  $5 \times 10^7$  Zellen HUVEC pro IP. Nach Lyse der Zellen wurden für jede Präzipitation gleiche Mengen zellulärer Proteine über das Lysatvolumen eingestellt, um den Assoziationsgrad beider Proteine in unterschiedlich konfluenten Zellen vergleichen zu können. VE-PTP wurde jeweils mit einem polyklonalen Kaninchenserum (VEPTPc) immunpräzipitiert und assoziiertes VE-Cadherin mit dem mAk 11D4.1 (bEnd.3) beziehungsweise mAk CD-144 (HUVEC) nachgewiesen. Zur Kontrolle erfolgte der Nachweis von VE-PTP anschließend auf der gleichen Membran mit dem mAk 109.3 (bEnd.3) oder dem Serum VEPTPc (HUVEC). VE-Cadherin wurde zusätzlich in den Triton-Zelllysaten der verschieden konfluenten Kulturen detektiert.

**Abb. 3.5 a** zeigt die Ko-IP von VE-PTP und VE-Cadherin in bEnd.3. Untersucht wurden Zellen, welche die Konfluenz 24 h beziehungsweise 96 h vor der Lyse erreicht hatten. Wie in **Kapitel 3.1.1.2** beschrieben, findet erst bei hoher Zelldichte eine nachweisbare Lokalisation von VE-PTP im Zellkontakt statt. Im Vergleich zu Zellen, die erst kurz vor der Lyse Konfluenz erreichten, weist VE-PTP in den schon längere Zeit konfluenten Zellen eine sichtbar erhöhte Assoziation mit VE-Cadherin auf, welches in der Maus als 120 Kilodalton Bande sichtbar ist. Die VE-Cadherin Expression in der Zelle bleibt jedoch unverändert (siehe Blot im Lysat).

Die gleiche dichteabhängige Zunahme der Assoziation von VE-PTP und VE-Cadherin kann ebenfalls in HUVEC demonstriert werden (**Abb. 3.5 b**). In diesem Fall wurde das Experiment zeitlich feiner abgestuft. hPTP- $\beta$ , das humane Ortholog von VE-PTP, wurde aus Zellen, welche 24 h, 48 h und 72 h vor der Lyse Konfluenz erreichten, immunpräzipitiert. 72 h Konfluenz stellt die höchstmögliche Dichte dar, die unter Standard-Zellkulturbedingungen bei HUVEC erreicht werden kann. Zur Kontrolle wurde jeweils eine IP mit Kaninchen-IgG durchgeführt.

In den kürzlich konfluenten Zellen kann unter den gegebenen Bedingungen kein VE-PTP-assoziiertes VE-Cadherin nachgewiesen werden. Erst mit steigender Dichte wird ko-immunpräzipitiertes humanes VE-Cadherin als Bande bei 130 Kilodalton detektierbar. Dagegen bleibt auch in HUVEC Triton-Zelllysaten die VE-Cadherin Expression mit zunehmender Dichte unverändert.



**Abb. 3.5 : VE-PTP und VE-Cadherin assoziieren verstärkt mit zunehmender Zelldichte in bEnd.3 und HUVEC.** VE-PTP wurde mit einem polyklonalen Kaninchenserum aus Zellen immunpräzipitiert, welche die Konfluenz 24h bis 96h vor der Lyse erreicht hatten. VE-Cadherin mit einem apparenten Molekulargewicht von 120 kDa (Maus) bzw. 130 kDa (Mensch) wurde im Westernblot mit mAbs nachgewiesen. **(a)** : bEnd.3 Endothelioma, **(b)** : HUVEC. Als Kontrolle für die Immunpräzipitation diente Kaninchen-IgG.

Zusammenfassend demonstrieren die Ko-Immünpräzipitationsexperimente in zwei verschiedenen Zellsystemen eine mit steigender Zelldichte verstärkte Assoziation von VE-PTP und VE-Cadherin. Die VE-Cadherin Expression in der Zelle bleibt dagegen mit zunehmender Konfluenz unverändert.

### 3.1.2.2 Untersuchung der VE-Cadherin Phosphorylierung bei steigender Zelldichte

Die Dephosphorylierung von VE-Cadherin und anderen Komponenten der endothelialen Adherens Junction wird in der Literatur im Zusammenhang mit einer Verfestigung der Zellkontakte bei steigender Konfluenz gesehen (Daniel & Reynolds, 1997). Lampugnani *et al.* zeigten 1997 eine zelldichteabhängige Abnahme der VE-Cadherin Phosphorylierung in HUVEC. Allerdings wurden in dieser Publikation die Zellen mehrere Minuten mit Pervanadat, einem membrangängigen, sehr starken Inhibitor von Protein-Tyrosin Phosphatasen vorbehandelt, um die Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin überhaupt nachweisen zu können.

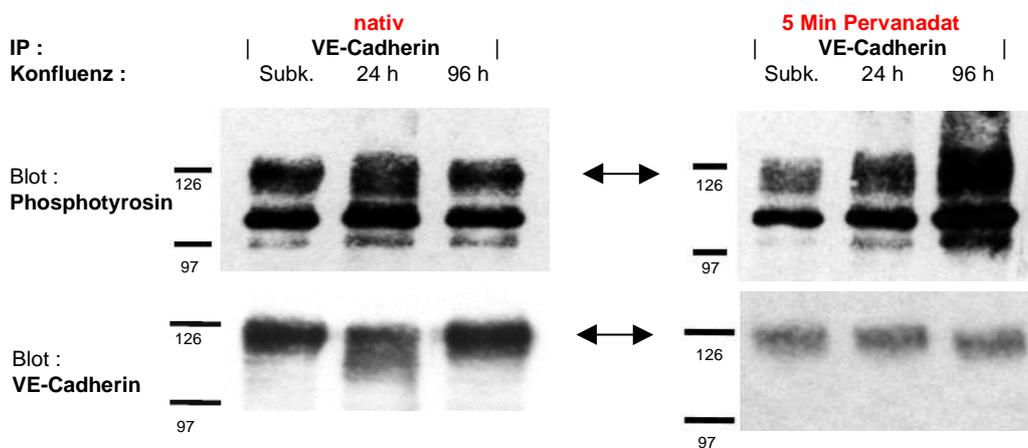
Für die vorliegende Arbeit wurde auf die Inhibition von PTPs in lebenden Zellen verzichtet, um die Phosphorylierung von VE-Cadherin bei steigender Zelldichte im nativen Zellkontext zu untersuchen. Um die bereits publizierten Ergebnisse zu reproduzieren, wurden aber auch Pervanadat-behandelte Zellen eingesetzt. VE-Cadherin wurde wie in **2.2.2.10** beschrieben aus unterschiedlich konfluenten bEnd.3 und HUVEC-Kulturen immunpräzipitiert und auf Nitrozellulose transferiert. Analysiert wurde die VE-Cadherin Phosphorylierung in subkonfluenten, sowie in kürzlich- (24 h) und hoch-konfluenten (72 bzw. 96 h) Zellen. Als Material für die IPs dienten jeweils ca.  $5 \times 10^6$  Zellen HUVECs, sowie ca.  $1 \times 10^7$  Zellen bEnd.3. Der Proteingehalt pro IP wurde nach Proteinbestimmung über das Lysatvolumen angeglichen. Die Analyse der VE-Cadherin Phosphorylierung erfolgte im Westernblot mit einem gegen phosphorylierte Tyrosine gerichteten mAk (PY-20), der Nachweis des präzipitierten Cadherins erfolgte auf einem separaten Gel oder nach Dehybridisierung mit den mAbs Cadherin-5 und 11D4.1.

**Abb. 3.6 a** zeigt das Ergebnis der Experimente für **bEnd.3**. In unbehandelten Zellen ist keine Änderung der VE-Cadherin Phosphorylierung mit zunehmender Zelldichte feststellbar (linke Seite). Nach Vorbehandlung der Zellen mit Pervanadat für 5 Min ist eine steigende Phosphorylierung von VE-Cadherin mit zunehmender Konfluenz der Zellen sichtbar (rechte Seite). Dies gilt auch für ein assoziiertes Protein bei ca. 100 kDa, welches sich in seiner Phosphorylierung wie VE-Cadherin verhält. Murines VE-Cadherin läuft im Gel als Bande

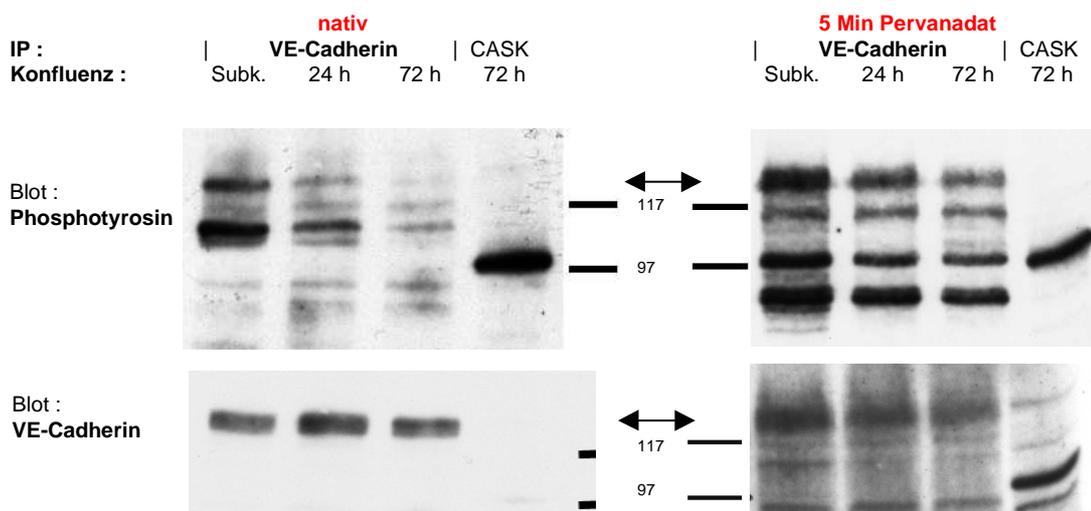
bei ca. 120 kDa und wurde jeweils in einem parallelen Blot mit dem mAk 11D4.1 nachgewiesen.

bEnd.3 Endothelioma sind zur Immortalisierung mit dem "Polyoma Middle-T" Antigen transfiziert (PyM-T). Hierbei handelt es sich um ein virales Protein, welches unter anderem mit der Kinase pp60<sup>src</sup> assoziiert vorliegt (Courtneidge & Smith, 1983). Transformation der Zellen mit PyM-T greift stark in das zelluläre Gleichgewicht aus Phosphorylierung und Dephosphorylierung ein. Zur Betrachtung der endogenen VE-Cadherin Tyrosin-Phosphorylierung wurden daher humane Primärzellen (HUVECs) untersucht.

**a b.END-3**



**b HUVEC**



**Abb. 3.6 : VE-Cadherin Phosphorylierung nimmt mit steigender Zelldichte ab.** VE-Cadherin wurde aus bEnd.3 (a) oder HUVEC (b) immunpräzipitiert, welche die Konfluenz bis zu 96 h vor der Lyse erreicht hatten. Dargestellt sind IPs aus Zellen, welche mit (rechts) oder ohne (links) Pervanadat behandelt wurden. Tyrosin-Phosphorylierung und die VE-Cadherin Proteinmenge wurden im Blot nachgewiesen. Der Pfeil gibt die Position von VE-Cadherin an. Als Kontrollantikörper für die IPs diente ein monoklonaler CASK Antikörper.

**Abb. 3.6 b** zeigt in **HUVEC** eine verringerte VE-Cadherin-Phosphorylierung bei zunehmender Dichte der Zellen. VE-Cadherin läuft als Bande bei 130 Kilodalton. In Pervanadat-unbehandelten Zellen (linke Seite) sind zusätzlich phosphorylierte Assoziationspartner von VE-Cadherin zu sehen: Ein Protein bei 110 Kilodalton (vermutlich  $\alpha$ -Catenin), dessen Phosphorylierung ebenfalls mit steigender Zelldichte abnimmt, sowie Proteine bei ca. 90, 95 und 115 Kilodalton, deren Phosphorylierung sich nicht ändert. Der zugehörige VE-Cadherin Westernblot demonstriert nach Dehybridisierung der Phosphotyrosinmembran vergleichbare präzipitierte Mengen VE-Cadherin in jeder IP.

Das Ergebnis in unbehandelten Zellen wird sogar nach Vorbehandlung der Zellen mit Pervanadat erhalten (**Abb. 3.6 b** rechte Seite): Selbst nach Inhibition von Tyrosin-Phosphatasen nimmt die Phosphorylierung von VE-Cadherin mit steigender Konfluenz ab.

Allerdings weicht die Phosphorylierung der ko-präzipitierten Proteine deutlich von der Situation in unbehandelten Zellen ab : Die Proteine, welche in nativen Zellen bei 95 und 115 kDa sichtbar sind, ändern in Pervanadat-behandelten Zellen, sofern nachweisbar, ihre Phosphorylierung nicht. An der Position von  $\alpha$ -Catenin bei 110 kDa ist kein Phosphotyrosin-Signal sichtbar. Zusätzlich erscheinen bei ca. 90 kDa und 100 kDa Proteinpartner, deren Tyrosin-Phosphorylierung ebenfalls mit steigender Konfluenz abnimmt. Bei diesen Proteinen handelt es sich höchstwahrscheinlich um  $\gamma$ -Catenin und  $\beta$ -Catenin, deren Tyrosinphosphorylierung ohne Pervanadat-Vorbehandlung der HUVECs in der Zelle kaum oder gar nicht nachweisbar ist. In den Spuren der Kontroll-IPs, für die ein Maus-monoklonaler CASK-Antikörper zum Einsatz kam, läuft ein Protein bei ca. 100 kDa : CASK.

Insgesamt steht das Ergebnis, obwohl auf eine Inhibition von Phosphatasen mit Pervanadat verzichtet wurde, im Einklang mit den bereits publizierten Daten von Lampugnani *et al.*, welche in HUVEC ebenfalls eine Dephosphorylierung von VE-Cadherin bei steigender Zelldichte beschrieben. In PyM-T transfizierten Endothelioma ist der Effekt nicht zu beobachten.

Die Experimente demonstrierten weiterhin den starken Eingriff der Pervanadat-Behandlung in die Grundphosphorylierung zellulärer Proteine über eine bloße Amplifikation des Phosphotyrosin-Signales, wie von Lampugnani *et al.* behauptet, hinaus. Durch die Störung des empfindlichen Gleichgewichtes zwischen Kinasen und Phosphatasen in der Zelle läßt die Vorbehandlung mit Pervanadat keinen objektiven Rückschluß auf die Phosphorylierung von Proteinen im nativen Zellkontext zu. Im Falle von VE-Cadherin ist die Phosphorylierung mit und ohne Pervanadat vergleichbar, für assoziierte Proteine gilt dies nicht.

### **3.1.3 Untersuchung der VE-PTP Funktion mittels siRNA**

Aufgrund der in den beiden vorherigen Kapiteln dargestellten Daten ergibt sich eine Koinzidenz zwischen der Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin und seiner Assoziation mit der Tyrosin-Phosphatase VE-PTP, da beide Effekte verstärkt bei steigender Zelldichte auftreten. Es kann daher eine Beteiligung von VE-PTP an der Regulierung der VE-Cadherin Funktion über dessen Phosphorylierung in Betracht gezogen werden.

Die experimentelle Prüfung dieser Hypothese erfordert Methoden zur direkten Manipulierung der VE-PTP Expression in der Zelle. Endothelioma, welche aus homozygot defizienten Mäusen (Knock-Out Mäusen) gewonnen wurden, befinden sich im Stadium der Charakterisierung, und werden ein wichtiges Werkzeug zur Aufklärung der VE-PTP Funktion sein. Zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit waren diese Zellen jedoch noch nicht verfügbar. Daher wurde die relativ neue, aber bereits weit verbreitete Technologie der RNA-Interferenz (siRNA) zum Ausschalten der VE-PTP Expression in Endothelzellen eingesetzt (siehe Einleitung).

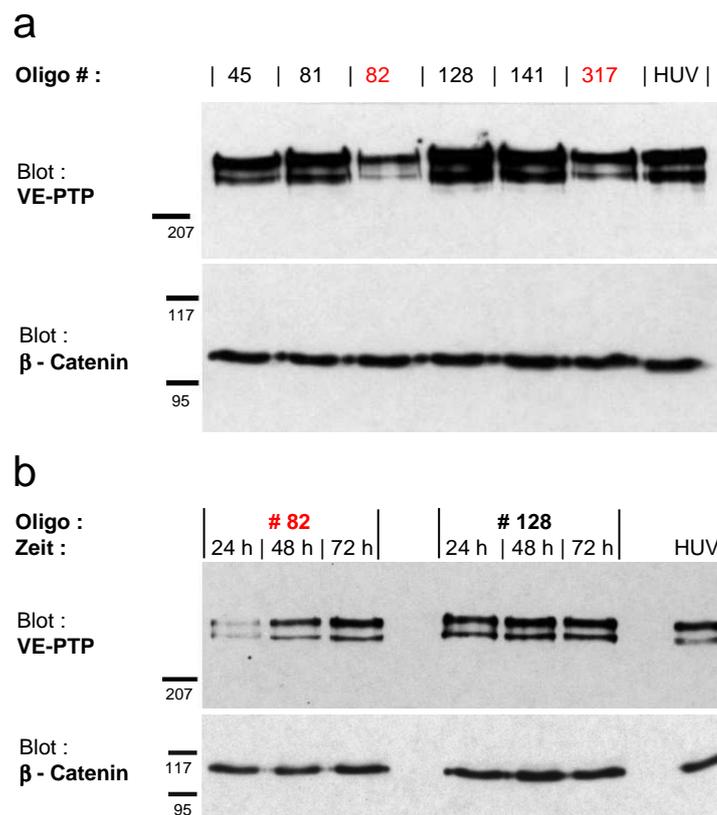
#### **3.1.3.1 Etablierung von siRNA für VE-PTP in HUVEC**

Um die Bedeutung von VE-PTP für die VE-Cadherin Phosphorylierung zu testen, wurde ein siRNA System zum selektiven Ausschalten der VE-PTP-Expression in HUVEC etabliert. HUVEC wurden mit dem AMAXA Transfektionssystem mit doppelsträngigen RNA-Oligonukleotide transfiziert, wie in **2.2.3.7** beschrieben. Zu verschiedenen Zeiten nach dem Ausplattieren der Zellen wurden Totallysate hergestellt, von denen nach einer Proteinbestimmung gleiche Proteinmengen auf ein Gel aufgetragen und geblottet wurden. **Abb. 3.7 a** zeigt Westernblots mit Antikörpern gegen VE-PTP (polyklonales Serum VEPTPc) und  $\beta$ -Catenin (mAk anti  $\beta$ -Catenin). Von den sechs getesteten Oligonukleotiden führen zwei (# 82 und # 317) zu einer sehr deutlichen Reduktion der VE-PTP Proteinexpression nach 24 h. Die Expression von  $\beta$ -Catenin ist dagegen nicht betroffen.

Der siRNA Effekt auf die VE-PTP Expression ist allerdings relativ kurzlebig, wie in **Abb. 3.7 b** dargestellt. Hier wurden Totallysate zu drei Zeitpunkten nach der Transfektion hergestellt und auf VE-PTP und  $\beta$ -Catenin Expression hin analysiert. 48 h nach Transfektion des aktivsten Oligonukleotides #82 hat sich der VE-PTP Proteingehalt bereits deutlich erhöht; 72 h nach Transfektion liegt er wieder auf Kontrollniveau. Das inaktive Oligonukleotid # 128 zeigt zu keiner Zeit einen Effekt auf die Expression von VE-PTP oder  $\beta$ -Catenin. Eine

Optimierung der Transfektionsbedingungen führt zu einer weiteren Verbesserung des siRNA induzierten Knock-downs der VE-PTP Expression in HUVEC (siehe folgendes Kapitel **3.1.3.2**).

siRNA bietet in HUVEC die Möglichkeit, die Expression von VE-PTP für 24 - 48 h zu verringern. Der Effekt ist nach einem Tag am ausgeprägtesten.



**Abb. 3.7 : Knock-Down von VE-PTP mittels doppelsträngiger RNA-Oligonukleotide in HUVEC.** Doppelsträngige RNA Oligonukleotide wurden mit dem AMAXA System in HUVEC transfiziert. Der Nachweis von VE-PTP erfolgte im Westernblot mit einem polyklonalen Serum, von  $\beta$ -Catenin mit einem mAk. **(a) : Test der sechs Oligonukleotide.** Totallysate der Zellen wurden nach 24 h hergestellt und gleiche Proteinmengen (BCA-Test) auf ein Gel aufgetragen. Die Oligonukleotide Nr. 82 und 317 führen zu einer deutlich verringerten Expression von VE-PTP, nicht jedoch von  $\beta$ -Catenin. **(b) : Zeitkinetik des siRNA induzierten Knock-Downs von VE-PTP.** 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion mit dem inhibierenden Oligonukleotid # 82 und dem inaktiven Oligonukleotid # 128 wurden die Zellen lysiert und gleiche Proteinmengen auf ein Gel aufgetragen. Nach 48 h ist der siRNA-Effekt des Oligonukleotids # 82 bereits deutlich vermindert. Zur Kontrolle der Protein-Expression wurde Lysat von nicht-transfizierten HUVECs mit untersucht (HUV).

### **3.1.3.2 Knock-down von VE-PTP mittels siRNA führt zu einer erhöhten VE-Cadherin Phosphorylierung in HUVEC**

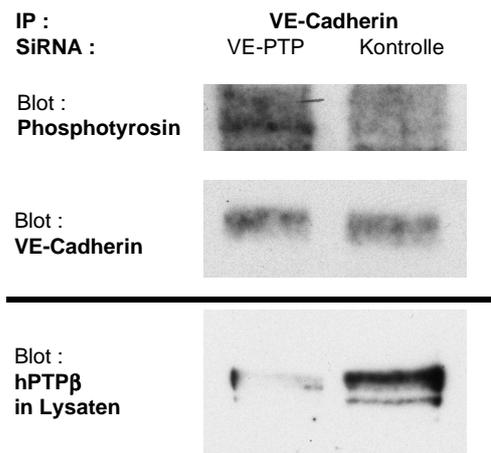
Im Folgenden wurde untersucht, ob VE-PTP in Endothelzellen VE-Cadherin dephosphoryliert und als Kandidaten-Phosphatase zur Regulierung von dessen Funktion in Betracht kommt. Sollte zwischen der verstärkten VE-PTP - VE-Cadherin Assoziation und der verringerten VE-Cadherin Phosphorylierung in konfluenten Zellen ein Zusammenhang bestehen, müßte das selektive Ausschalten von VE-PTP bei hoher Zelldichte eine erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin zur Folge haben.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde VE-PTP in HUVECs mittels siRNA inhibiert und VE-Cadherin mit dem mAk CD-144 immunpräzipitiert. Die Tyrosinphosphorylierung von VE-Cadherin wurde im Westernblot mit dem mAk PY-20 detektiert und das präzipitierte Protein auf der gleichen Membran nach Dehybridisierung mit dem mAk Cadherin-5 nachgewiesen. Die VE-PTP Expression nach siRNA wurde in den Lysaten mit dem polyklonalen Serum VEPTPc überprüft. **Abb. 3.8** zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes.

Die VE-PTP-Expression im Triton-Lysat ist nach siRNA gegen das humane Ortholog der Phosphatase (hPTP- $\beta$ ) im Vergleich zur Kontrolle stark verringert. Die VE-Cadherin Tyrosinphosphorylierung nimmt nach siRNA gegen VE-PTP deutlich zu. Es wurden gleiche Mengen Protein immunpräzipitiert, wie der Blot gegen VE-Cadherin zeigt.

Problematisch für das Experiment gestaltete sich der Diskrepanz zwischen dem Assoziationsgrad von VE-PTP und VE-Cadherin, welcher in HUVEC erst bei hoher Zelldichte gut nachweisbar wird (siehe **Kapitel 3.1.2.1**), und dem relativ kurzlebigen siRNA Effekt auf VE-PTP (siehe **Kapitel 3.1.3.1**). Die experimentellen Bedingungen mußten daher so gewählt werden, daß innerhalb von maximal 48 h ein möglichst hoher Assoziationsgrad von VE-PTP und VE-Cadherin erreicht wird. Daher wurden für jede einzelne IP zwei Transfektionen zu einer Zelldichte von über  $3 \times 10^6$  Zellen / 60mm Zellkulturschale zusammengelegt, wodurch die Zellen sofort zu einem konfluenten Zellrasen wuchsen. 48 h nach der Transfektion und bei sehr hoher Zelldichte wird der Effekt von VE-PTP auf die VE-Cadherin Tyrosinphosphorylierung biochemisch analysierbar.

Zusammengefaßt sprechen die Ergebnisse für eine VE-PTP-abhängige Dephosphorylierung von VE-Cadherin in HUVECs. Damit kommt VE-PTP als Kandidaten-Phosphatase für die Regulierung der VE-Cadherin Phosphorylierung in Frage.



**Abb. 3.8 : Inhibition von VE-PTP mittels siRNA führt zu verstärkter VE-Cadherin Phosphorylierung in HUVEC.** VE-Cadherin wurde aus HUVEC immunpräzipitiert, welche mit siRNA-Oligonukleotiden gegen VE-PTP oder Kontroll-Oligonukleotiden transfiziert wurden. Tyrosin-Phosphorylierung und die präzipitierte VE-Cadherin Proteinmenge wurden im Blot nachgewiesen. Die siRNA bewirkt eine stark verminderte Expression von VE-PTP in den Lysaten, wie anhand des Blots gezeigt.

### 3.1.3.3 siRNA-induziertes Ausschalten von VE-PTP in HUVECs führt zu erhöhter transendothelialer Migration von Polymorphonukleären Neutrophilen

Die herrschende Meinung in der Literatur favorisiert das Modell einer relativ aufgelockerten Adherens Junction in subkonfluenten Endothelzellen, welche durch stark phosphorylierte VE-Cadherin Moleküle aufgebaut wird. Mit steigender Zelldichte kommt es zu einer Verfestigung der Zell-Zellkontakte, die mit einer verringerten VE-Cadherin Phosphorylierung einhergeht (Bazzoni & Dejana, 2004, siehe auch **Einleitung**). Die in **Kapitel 3.1.2.2** gezeigten Daten zur endogenen Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin in HUVEC stehen hiermit im Einklang.

Als eventuelle Erweiterung dieses Modells sprechen die in den letzten Kapiteln vorgestellten Daten für eine physiologisch regulierte Assoziation von VE-PTP und VE-Cadherin, welche mit höherer Zelldichte zunimmt und möglicherweise durch Dephosphorylierung von VE-Cadherin zu einer Festigung der endothelialen Zell-Zellkontakte beiträgt.

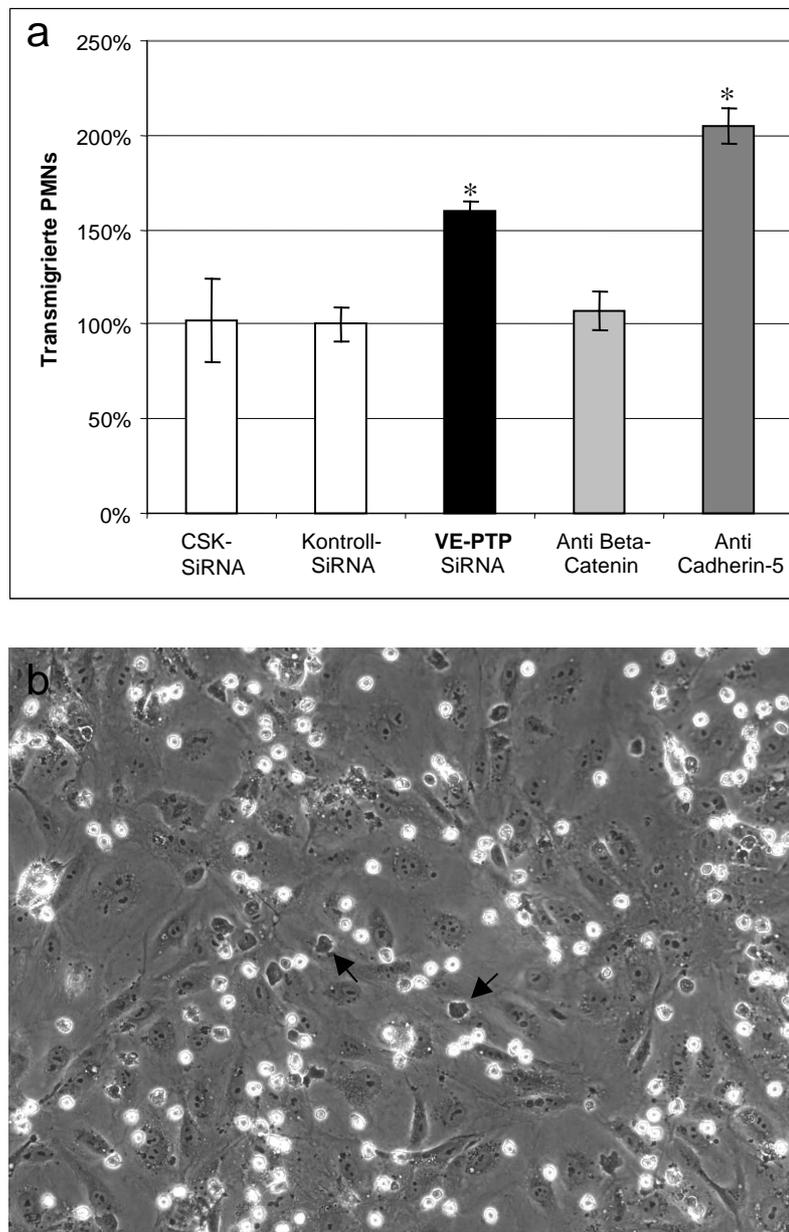
Um die Bedeutung von VE-PTP für die VE-Cadherin Funktion zu untersuchen, wurden Versuche zur transendothelialen Migration (TEM) von Neutrophilen mit HUVEC durchgeführt. Der TEM-Versuch dient hierbei als Indikator für die Integrität des Zellkontaktes. Sollte VE-PTP bei der VE-Cadherin-abhängigen Etablierung von festen Zellkontakten eine Rolle spielen, müsste das Ausschalten der Phosphatase bei hoher

Zelldichte zu einer Auflockerung des Zellkontaktes und damit zur verstärkten TEM von Neutrophilen durch eine Endothel-Zellschicht führen.

Für den Versuch wurden HUVECs mit siRNA Oligonukleotiden gegen VE-PTP oder Kontroll-Oligonukleotiden transfiziert und in sehr hoher Dichte in 24-well Zellkulturschalen ausgesät, welche ein Deckgläschen enthielten (**2.2.3.9**). Die Zellen konnten so auf dem Deckglas anwachsen und nach Fixierung mikroskopisch untersucht werden. 24 h nach Transfektion wurden zu den Zellen humane Granulozyten gegeben, welche polymorphonukleäre Neutrophile (PMNs) enthalten. Nach Transmigration durch die HUVEC Zellschicht sind diese lichtmikroskopisch von adhärenenten, nicht transmigrierten PMNs gut unterscheidbar (siehe **Abb. 3.9 b**). Zusätzlich wurden in den Versuchen HUVECs eingesetzt, welche vor Zugabe der Neutrophilen für 2 h mit einem monoklonalen Antikörper gegen VE-Cadherin oder  $\beta$ -Catenin behandelt wurden. Beide Antikörper besitzen den gleichen Isotyp und Hersteller. Der verwendete mAk Cadherin-5 beeinträchtigt die Stabilität der Adherens Junction, indem er an die extrazelluläre Domäne von VE-Cadherin bindet und die parazelluläre Permeabilität von HUVECs erhöht (Corada *et al.*, 2001).

**Abb. 3.9 a** zeigt die Auswertung eines repräsentativen Experimentes. Das siRNA vermittelte Ausschalten von VE-PTP hat einen signifikanten Anstieg der TEM von Neutrophilen zur Folge (schwarzer Balken). Zwei zur Kontrolle transfizierte unverwandte Oligonukleotide, darunter ein gegen die cytosolische Kinase CSK gerichtetes, haben keinen Effekt auf die Transmigration (weiße Balken). Die Destabilisierung der endothelialen Adherens Junction durch Vorinkubation der HUVECs mit Cadherin-5 Antikörpern führt zu einem starken Anstieg der TEM (dunkelgrauer Balken). Die Kontrollantikörper gegen  $\beta$ -Catenin bewirken dagegen keine veränderte Transmigration (hellgrauer Balken).

Die Experimente argumentieren für eine wichtige Rolle von VE-PTP bei der transendothelialen Migration von Neutrophilen. Dieser Effekt ist über eine verstärkte Phosphorylierung von VE-Cadherin nach Ausschalten von VE-PTP und eine damit verbundene Abnahme der Stabilität des Zell-Zellkontaktes in HUVEC erklärbar.

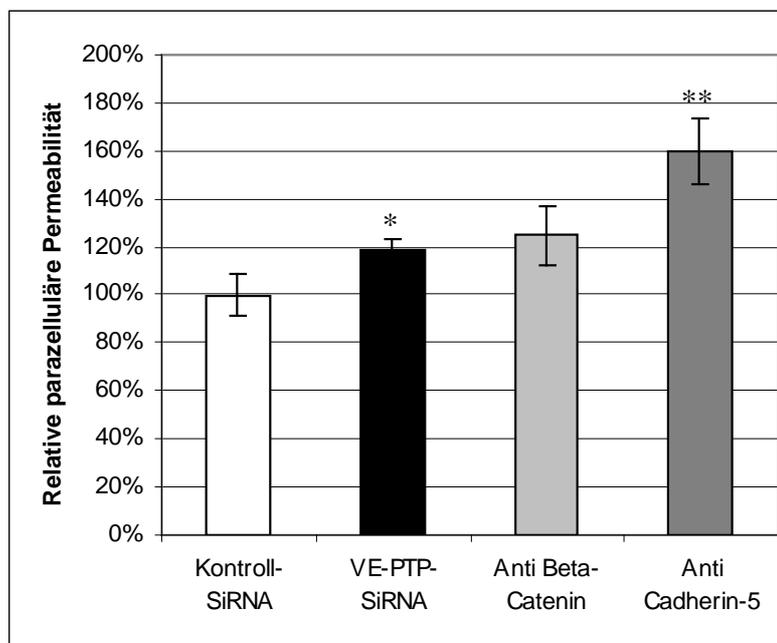


**Abb. 3.9 : Inhibition von VE-PTP mittels siRNA in HUVEC führt zu erhöhter Transmigration von Neutrophilen.** HUVEC wurden mit verschiedenen dsRNA Oligonukleotiden transfiziert (schwarze und weiße Balken), bzw. mit Antikörpern gegen VE-Cadherin und Beta-Catenin behandelt (graue Balken) und auf Deckgläschen ausgesät. Humane Neutrophile wurden zu den HUVEC gegeben, und der Prozentsatz der transmigrierten Zellen bezogen auf die Kontrolle dargestellt. **(a)** : Auswertung eines repräsentativen Experimentes. \* =  $p < 0.001$ . Phasenkontrast-Bilder nach 21-minütiger Transmigration von PMNs. Pfeile markieren transmigrierte Neutrophile, die wie dunkle Ovale aussehen. Adhärente Zellen erscheinen als lichtbrechende Kugeln.

### 3.1.3.4 siRNA-induziertes Ausschalten von VE-PTP in HUVECs führt zu veränderter parazellulärer Permeabilität

Um einen weiteren Hinweis auf die funktionelle Beteiligung von VE-PTP an der Integrität des endothelialen Zellkontaktes zu erhalten, wurden Permeabilitätsversuche an HUVEC durchgeführt. Diese Versuche fanden auf Transwell-Filtern statt. In Abhängigkeit von der Zellkontaktstärke kann FITC-Dextran auf parazellulärem Wege mehr oder weniger effizient durch die Zellschicht diffundieren.

Hierfür wurden HUVECs mit siRNA Oligonukleotiden gegen VE-PTP oder Kontroll-Oligonukleotiden transfiziert und in hoher Dichte auf Transwell-Filter ausgesät (2.2.3.10). Als Kontrolle wurden auch HUVECs mit den in 3.1.3.3 verwendeten Antikörpern gegen VE-Cadherin und  $\beta$ -Catenin vorinkubiert.



**Abb. 3.10 : Knock-Down von VE-PTP mittels siRNA führt zu veränderter parazellulärer Permeabilität in HUVEC.** HUVEC wurden mit verschiedenen dsRNA Oligonukleotiden transfiziert (schwarze und weiße Balken), bzw. mit Antikörpern gegen VE-Cadherin und Beta-Catenin behandelt (graue Balken) und auf Transwell-Filtern ausgesät. Die relative parazelluläre Permeabilität von 40 kDa FITC-Dextran im Vergleich zur Kontrolle ist dargestellt. \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,001$

Das Ergebnis eines repräsentativen Versuches ist in **Abb. 3.10** gezeigt. Die siRNA gegen VE-PTP führt im Vergleich zur Kontrolle zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Permeabilität um ca. 20 %. Sie hebt sich jedoch nicht gegen den Effekt des Kontroll-Antikörpers ab, der einen vergleichbaren Effekt bewirkt. Die Inkubation der Zellen mit

Cadherin-5 Antikörpern führt zu einem stark erhöhten Anstieg der parazellulären Permeabilität.

HUVECs sind nur schlecht für Diffusionsversuche auf Transwell-Filtern geeignet, da sie sehr empfindlich z.B. auf Änderungen des pH-Wertes im Medium oder mechanische Störung durch Zupipettieren von Lösungen reagieren. Die TEM-Versuche auf Deckgläschen boten die Möglichkeit, den HUVEC Zellrasen direkt zu beurteilen und beispielsweise Löcher von der Auswertung auszuschließen. Eine vergleichbare Beurteilung des Zellrasens auf Transwell-Filtern ist durch Gegenfärbung der Zellen beispielsweise mit Filipin möglich. Allerdings kommt es bei der Färbeprozedur selbst aufgrund der zahlreichen notwendigen Waschschrirte bereits zu Löchern im Zellrasen, die eine objektive Bewertung des Experimentes erschweren.

Die Ergebnisse der Permeabilitätsversuche sind nur bedingt aussagekräftig und können nicht als Unterstützung für die aus den TEM-Versuchen gewonnen Daten dienen, welche für eine Beteiligung von VE-PTP an der Aufrechterhaltung eines festen Zell-Zellkontaktes in Endothelzellen hoher Dichte sprechen.

### **3.2 Untersuchungen zum Effekt der Ligation von ICAM-1 auf die VE-Cadherin-Phosphorylierung**

Das "Intercellular Cell Adhesion Molecule -1" (ICAM-1) ist ein wichtiges kostimulatorisches Zelladhäsionsmolekül, welches unter anderem auf Endothel und Leukozyten exprimiert wird. Endotheliales ICAM-1 vermittelt die feste Adhäsion von Leukozyten über die Bindung an deren  $\beta$ 2-Integrine LFA-1 und MAC-1 und spielt daher eine wichtige Rolle beim mehrstufigen Modell der Leukozyten-Extravasation (siehe **Einleitung**).

Die antikörpervermittelte Ligation von ICAM-1 ("Crosslink") hat, wie in zahlreichen Vorarbeiten untersucht wurde, eine tiefgreifende Umorganisation des Cytoskeletts zur Folge. Dies wird über die direkte Phosphorylierung von Cytoskelett-assoziierten Proteinen oder von Komponenten der Signalwege, welche diese Moleküle zum Ziel haben, erreicht. Umstrukturierungen am Cytoskelett sind eine Voraussetzung für die Transmigration von Leukozyten (für Übersichtsartikel : Greenwood *et al.*, 2002, Wang & Doerschuk, 2002).

#### **3.2.1 ICAM-1 abhängige Phosphorylierung von VE-Cadherin**

Wegen der Bedeutung von ICAM-1 für die Transmigration von Leukozyten lag die Vermutung nahe, daß VE-Cadherin, welches ein für den endothelialen Zell-Zellkontakt wichtiges Zelladhäsionsmolekül ist, ebenfalls ein Ziel der ICAM-1 Signalwege sein könnte. Um diese Hypothese und deren funktionelle Konsequenzen zu testen, wurden Ligations-Versuche mit ICAM-1 Antikörpern an bEnd.5 Endothelioma durchgeführt.

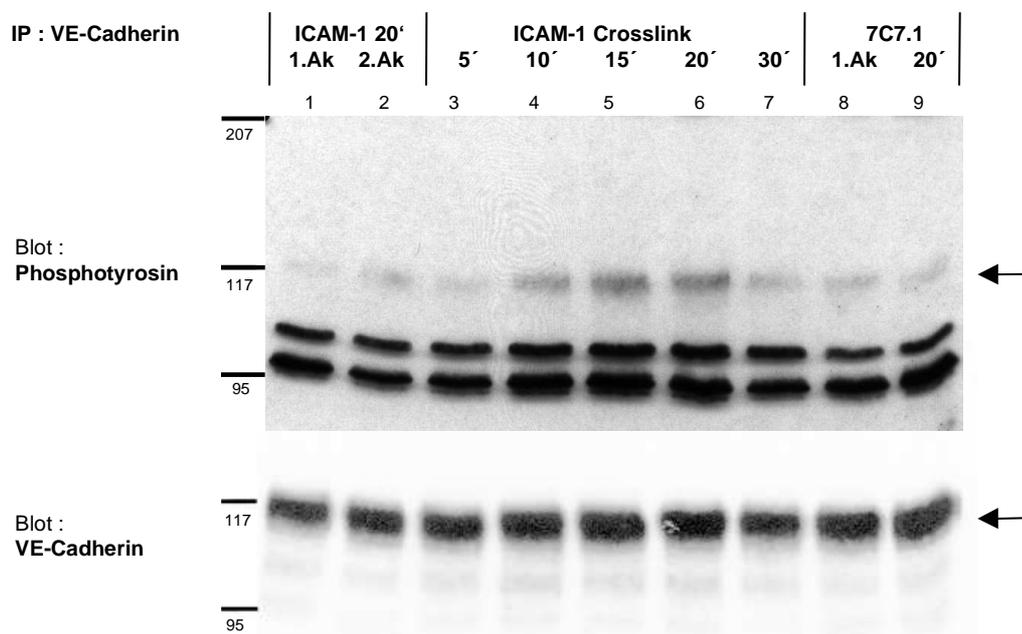
##### **3.2.1.1 ICAM-1 Ligation führt zu transienter Phosphorylierung von VE-Cadherin in Endothelioma**

Aufgrund der in der **Einleitung** zusammengefaßten Vorarbeiten, welche die Implikation von ICAM-1 in wichtige zelluläre Signalwege demonstrieren, wurde die Untersuchung einer ICAM-1 abhängigen Modulierung der VE-Cadherin Phosphorylierung vorgeschlagen.

Hierfür wurden Immunpräzipitationen von VE-Cadherin aus bEnd.5 Endothelioma nach "Crosslink" von ICAM-1 durchgeführt. bEnd.5 sind aufgrund ihrer Morphologie für funktionelle Versuche gut geeignet und exprimieren, im Gegensatz zu bEnd.3, nach TNF- $\alpha$  Stimulation große Mengen ICAM-1 auf der Zelloberfläche. Wie in **2.2.2.13** beschrieben, wurden 60 mm Zellkulturschalen bEnd.5 mit einer Kombination von zwei mAbs gegen ICAM-1 behandelt (primärer Antikörper). Für den eigentlichen "Crosslink" wurden die an die Zellen gebundenen mAbs mit einem polyklonalen Serum quervernetzt (sekundärer

Antikörper). Zu definierten Zeiten nach Zugabe des sekundären Antikörpers wurden die Zellen lysiert und VE-Cadherin mit einem polyklonalen Kaninchenserum (C5) immunpräzipitiert. Die VE-Cadherin Phosphorylierung wurde im Westernblot mit einem mAk spezifisch für Tyrosin-Phosphate (PY-20) nachgewiesen, das präzipitierte Protein mit dem mAk 11D4.1.

**Abbildung 3.11** zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes. Im Phosphotyrosinblot sind die Signale dreier phosphorylierter Proteine sichtbar : VE-Cadherin bei ca. 117 kDa (Pfeil), sowie zwei assoziierte Proteine bei ca. 100 und 95 kDa. Bei ihnen handelt es sich höchstwahrscheinlich um  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin. Der in den Spuren 3-7 durchgeführte "Crosslink" von ICAM-1 zeigt eine vorübergehende Zunahme der Phosphorylierung von VE-Cadherin 15-20 Min nach Zugabe des sekundären Antikörpers. Nach 30 min ist die Phosphorylierung wieder auf das Ausgangsniveau zurückgegangen. Parallel werden auch die Catenine verstärkt phosphoryliert, wenn auch nicht in gleichem Maße wie VE-Cadherin. Der direkte Nachweis von VE-Cadherin auf der gleichen Membran nach Dehybridisierung demonstriert vergleichbare immunpräzipitierte Proteinmengen.



**Abb. 3.11 : Ligation von ICAM-1 führt zu transienter Phosphorylierung von VE-Cadherin in bEnd.5 Endothelioma.** bEnd.5 wurden mit Antikörpern gegen ICAM-1 (Spur 3-7) inkubiert und mit einem polyklonalen Sekundärantikörper für 5 - 30 min ligiert. Zur Kontrolle wurden die Zellen nur mit ICAM-1 Antikörpern (Spur 1) oder nur mit sekundärem Antikörper (Spur 2) behandelt, zusätzlich wurden die Zellen mit Antikörpern gegen Endomucin (7C7.1) allein (Spur 8) inkubiert, bzw. für 20 Min mit Sekundärantikörpern quervernetzt (Spur 9). Nach Immunpräzipitation von VE-Cadherin wurden die Tyrosin-Phosphorylierung und VE-Cadherin Proteinmenge im Westernblot nachgewiesen. Die Pfeile verweisen auf VE-Cadherin.

Die Kontrollen für das Experiment sind in den Spuren 1-2 und 8-9 zu sehen. Hier wurde für den ICAM-1 "Crosslink" auf den primären (Spur 2), beziehungsweise auf den sekundären Antikörper (Spur 1) verzichtet und die VE-Cadherin Phosphorylierung nach 20 Min analysiert. Zudem wurde ein mAk gegen das Oberflächenantigen Endomucin (7C7.1) als primärer Antikörper allein (Spur 8) oder nach 20-minütigem "Crosslink" mit dem sekundären Antikörper (Spur 9) eingesetzt. Diese Kontrollen führten zu keiner verstärkten Phosphorylierung des Cadherins.

Für eine transiente VE-Cadherin Phosphorylierung ist eine Quervernetzung mit sowohl primären als auch sekundären Antikörper gegen ICAM-1 notwendig. Der Effekt ist 15-20 Min nach "Crosslink" nachweisbar und nimmt anschließend wieder ab. Zusammenfassend argumentieren die Ergebnisse für VE-Cadherin als neues Ziel der ICAM-1 abhängigen Signaltransduktionswege.

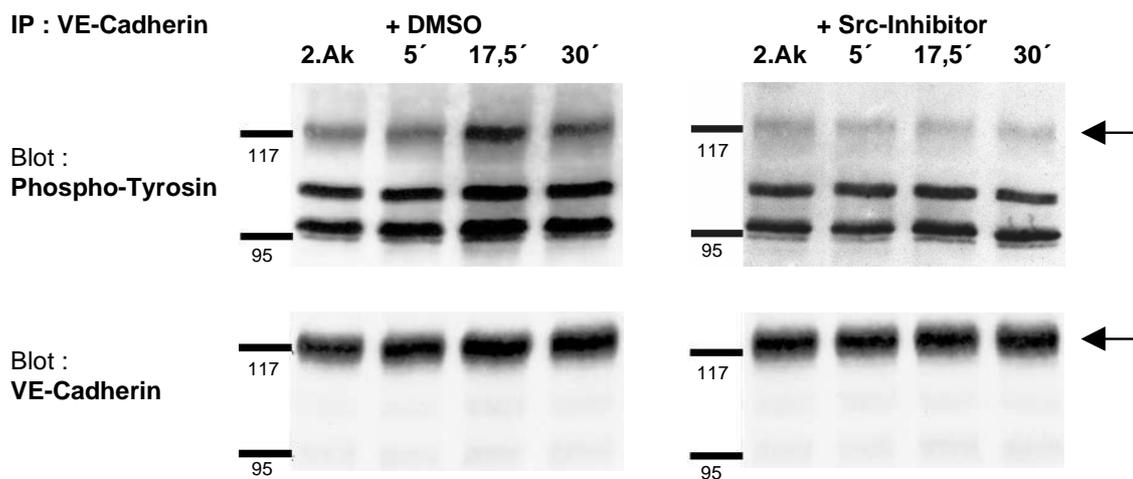
### 3.2.1.2 Beteiligung von Src - Kinasen an der ICAM-1 vermittelten Phosphorylierung von VE-Cadherin

Wie in der Einleitung beschrieben, aktiviert die Quervernetzung von ICAM-1 die Proteinkinase pp60<sup>src</sup> und die GTPase Rho. Beide Signalwege überschneiden sich in ihrer Wirkung auf das Aktin-Cytoskelett. Aufgrund neuer Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe Vestweber erscheint eine Beteiligung von Src-Kinasen an der Regulierung der VE-Cadherin Funktion äußerst wahrscheinlich (Baumeister *et al.*, Manuskript eingereicht). Zudem wurde von Wang *et al.*, 2003 eine Aktivierung von Src-Kinasen nach ICAM-1 Ligation in humanen mikrovaskulären Endothelzellen gezeigt. Dagegen hat die Inhibition von Rho durch Mikroinjektion einer dominant-negativen Mutante oder des spezifischen Rho-Inhibitors C3-Transferase in Endothelzellen keinen Effekt auf die VE-Cadherin Lokalisation und Bildung neuer endothelialer Zell-Zellkontakte (Braga *et al.*, 1999). Daher wurde die Beteiligung von Src-Kinasen an der transienten Phosphorylierung von VE-Cadherin nach ICAM-1 Ligation untersucht.

Hierfür wurden bEnd.5 Endothelioma mit einem sehr spezifischen pharmakologischen Inhibitor für Kinasen der Src-Familie behandelt : SU-6656. Die Zugabe des Inhibitors zu den Zellen oder von DMSO in Kontrollexperimenten erfolgte für 30 Min während der Inkubation mit den primären mAbs gegen ICAM-1. Danach wurden die Zellen analog zu den Versuchen des vorherigen Kapitels mit dem sekundären Antikörper behandelt und zu den angegebenen Zeiten lysiert. **Abb. 3.12** zeigt das Ergebnis der Versuche.

Die Kontrollbehandlung der Zellen mit DMSO führt nach 17,5 minütigem Crosslink, einem Zeitpunkt, der zwischen 15 und 20 Minuten gewählt wurde, zu einer deutlich verstärkten Phosphorylierung von VE-Cadherin, wie auch in **3.2.1.1** dargestellt. Die Hemmung von Src-Kinasen mit SU-6656 verhinderte diese ICAM-1 abhängige Phosphorylierung. Die assoziierten Catenine sind auch nach Src-Inhibition stark phosphoryliert, obwohl die Gesamtphosphorylierung von Proteinen auf der Membran schwächer ist als in der DMSO-Kontrolle. Nach Dehybridisierung der Membran wurde im Westernblot vergleichbare Mengen präzipitiertes VE-Cadherin nachgewiesen.

Aufgrund der hohen Spezifität des eingesetzten Inhibitors für Kinasen der Src-Familie (Blake *et al.*, 2000), kann auf eine direkte Beteiligung von Src-Kinasen bei der ICAM-1-ligationsabhängigen Phosphorylierung von VE-Cadherin geschlossen werden.



**Abb. 3.12 : Inhibition von Src-Kinasen verhindert die ICAM-1-abhängige VE-Cadherin Phosphorylierung.** bEnd.5 Endothelioma wurden mit Src-Kinase Inhibitor SU-6656 oder DMSO behandelt. ICAM-1 wurde mit monoklonalen Antikörpern und mit einem polyklonalen Sekundärantikörper für 5 - 30 min quervernetzt. Zur Kontrolle wurden die Zellen nur mit sekundärem Antikörper (2.Ak) behandelt. Nach Immunpräzipitation von VE-Cadherin wurden die Tyrosin-Phosphorylierung und VE-Cadherin Proteinmenge im Westernblot nachgewiesen. Die Pfeile verweisen auf VE-Cadherin.

### **3.2.2 ICAM-1 abhängige Änderung der Assoziation von VE-PTP und VE-Cadherin**

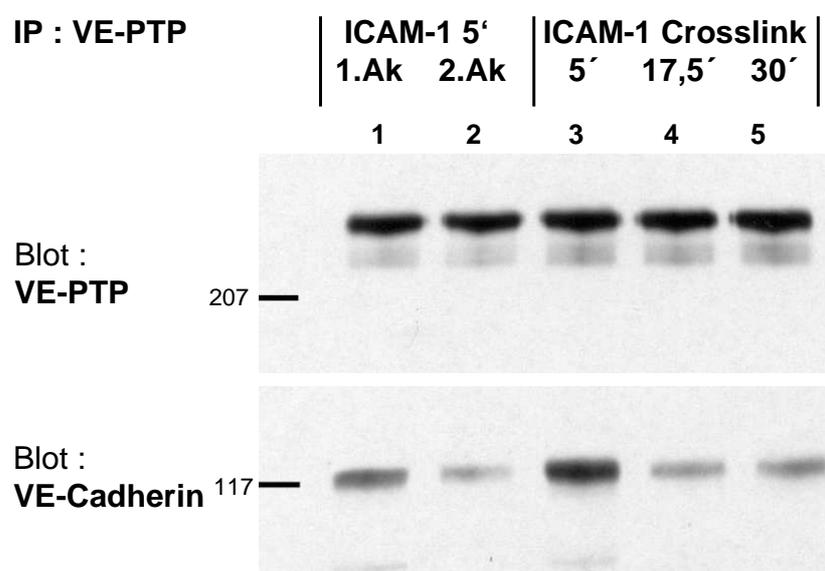
Wie in **Kapitel 3.1.3.2** gezeigt, führt der siRNA-induzierte Ausfall von VE-PTP in HUVEC zu einer erhöhten Phosphorylierung von VE-Cadherin. Zur Beantwortung der Frage, ob im umgekehrten Falle die Manipulierung der VE-Cadherin-Phosphorylierung eine veränderte Assoziation mit VE-PTP zur Folge hat, sind in HUVEC jedoch die experimentellen Möglichkeiten nicht gegeben. Die Maus-Endotheliomalinie bEnd.5 bietet dagegen mit der Quervernetzung von ICAM-1 die Möglichkeit, die Phosphorylierung von VE-Cadherin vorübergehend zu erhöhen. Da jenes "Crosslinking" einen Teil der Adhäsionskaskade von Leukozyten an Endothel simuliert, ist auch die Frage nach der Auswirkung auf den Zellkontakt berechtigt. Wie in der **Einleitung** ausgeführt, ist die Destabilisierung der endothelialen Adherens Junction eine notwendige Voraussetzung für die Transmigration von Leukozyten durch den parazellulären Spalt. Nach erfolgter Migration muß die Barrierefunktion des Endothels zügig wiederhergestellt werden. Die schnelle und transiente Veränderung der Phosphorylierung des Cadherin-Catenin Komplexes könnte bei der Lockerung der endothelialen Barrierefunktion während der transendothelialen Migration von Leukozyten von Bedeutung sein.

Daher wurde die ICAM-1 Quervernetzung im folgenden Experiment eingesetzt, um die Assoziation von VE-Cadherin mit VE-PTP nach vorübergehend erhöhter Phosphorylierung von VE-Cadherin zu untersuchen. Hierfür wurden Ko-Immunpräzipitationen beider Proteine durchgeführt. Als Material dienten bEnd.5 Endothelioma, welche auf 100 mm Zellkulturschalen wie in **2.2.2.13** beschrieben mit primären und sekundären Antikörpern gegen ICAM-1 behandelt wurden. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen lysiert und VE-PTP mit einem polyklonalen Kaninchenserum immunpräzipitiert. Die Phosphatase wurde im Westernblot mit dem mAk 109.3 nachgewiesen, das assoziierte VE-Cadherin mit dem mAk 11D4.1.

**Abb. 3.13** zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes. Dort ist fünf Minuten nach "Crosslink" eine starke Assoziation von VE-PTP und VE-Cadherin sichtbar, welche nach 17,5 und 30 Min abnimmt (Spur 3-5). In den Kontrollexperimenten (Spuren 1+2), welche nach 5 Minuten analysiert wurden, ist ebenfalls eine verstärkte Assoziation nach Zugabe der primären, nicht jedoch der sekundären Antikörper zu verzeichnen. Dies deutet darauf hin, daß die Bindung der primären Antikörper an ICAM-1 allein bereits eine Verstärkung der Assoziation von VE-PTP und VE-Cadherin über ein Grundniveau heraus (Spur 2) bewirkt.

Allerdings kann die Zugabe der primären Antikörper selbst bereits zu einer Quervernetzung von ICAM-1 führen, da zwei monoklonale Antikörper eingesetzt wurden, die gegen unterschiedliche Epitope des Moleküls gerichtet sind. Auf die Phosphorylierung von VE-Cadherin hat der primäre Antikörper allein jedoch keinen Einfluß; für diesen Effekt ist die zusätzliche Quervernetzung ("Super Crosslink") mit dem sekundären Antikörper nötig (siehe **Kapitel 3.2.1.1**).

Die Bedeutung des kurzfristigen Anstieges der Assoziation von VE-PTP und VE-Cadherin ist unklar, sie steht wahrscheinlich nicht im Zusammenhang mit der Phosphorylierung von VE-Cadherin nach ICAM-1 "Crosslink".



**Abb. 3.13 : ICAM-1 Crosslink verändert die Assoziation von VE-PTP und VE-Cadherin.** bEnd.5 wurden mit Antikörpern gegen ICAM-1 (Spur 3-5) inkubiert und mit einem polyklonalen Sekundärantikörper für 5 - 30 min quervernetzt. Zur Kontrolle wurden die Zellen nur mit ICAM-1 Antikörpern (Spur 1) oder nur mit sekundärem Antikörper (Spur 2) behandelt und nach 5 Min analysiert. Nach Immunpräzipitation von VE-PTP wurden kopräzipitiertes VE-Cadherin sowie die VE-PTP Proteinmenge im Westernblot nachgewiesen.

### **3.2.3 Parazelluläre Permeabilität nach ICAM-1 Crosslink auf bEnd.5**

Um die funktionellen Auswirkungen der ICAM-1 vermittelten transienten Phosphorylierung von VE-Cadherin auf den Zell-Zellkontakt zu überprüfen, wurden an bEnd.5 Diffusionsversuche zur parazellulären Permeabilität vorgenommen. Dem bereits ausgeführten Modell entsprechend (siehe **Einleitung**) führt eine Zunahme der VE-Cadherin Phosphorylierung zu einer Destabilisierung der Adherens Junction, verbunden mit steigender parazellulärer Permeabilität. Ein lockerer Zellkontakt wäre vorstellbar, da er

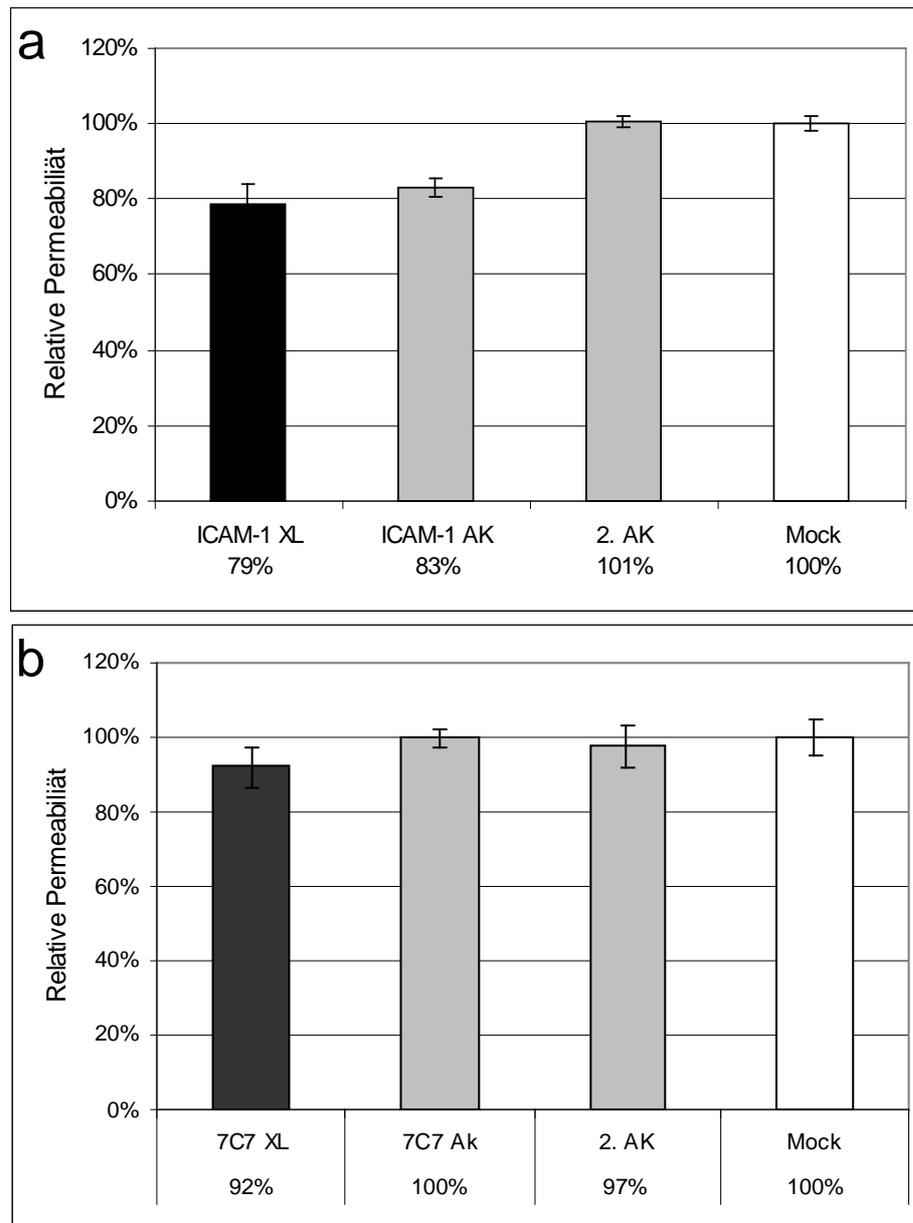
den am Endothel adhärennten Leukozyten die Transmigration erleichtern würde. Unklar ist jedoch, ob die Transmigration von Leukozyten zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels führt. Beobachtungen von van Buul *et al.*, 2002 ließen keine verstärkte endotheliale Permeabilität nach ICAM-1 Ligation erkennen.

Die Permeabilitätsversuche wurden wie in **2.2.3.10** beschrieben mit bEnd.5 Endothelioma auf Transwell-Filtern durchgeführt. Die Bedingungen für die ICAM-1 Quervernetzung wurden dem Versuchsaufbau entsprechend abgewandelt : Die Inkubation mit den primären Antikörpern fand 45 Min statt, der sekundäre Antikörper wurde zusammen mit 0,5 mg/ml 40 kDa FITC-Dextran für 1 h zu den Zellen gegeben. Ein eventueller, "Crosslink"-bedingter transienter Effekt auf die parazelluläre Permeabilität könnte so über die lange Diffusionszeit hinweg integriert werden. Kürzere Inkubationszeiten sind aufgrund der langsamen Diffusion des Farbstoffes schwer realisierbar.

**Abb. 3.14** zeigt repräsentative Permeabilitätsversuche. ICAM-1 "Crosslink" (**Abb. 3.14 a**) führt zu einer leichten Abnahme der parazellulären Permeabilität um ca. 20 % (Balken "ICAM-1 XL"). Der gleiche Effekt ist auch nach Zugabe des primären Antikörpers allein sichtbar (Balken "ICAM-1 AK"). Die Zugabe des sekundären Antikörpers ohne den primären hat keinen Effekt auf die Permeabilität (Balken "2. AK"). "Mock" gibt die Zugabe von Medium ohne Antikörper an, um Einflüsse durch mechanische Störungen oder pH - Änderung auszuschließen.

In Kontroll-Experimenten (**Abb. 3.14 b**), in denen der mAk 7C7.1 gegen Endomucin als primärer Antikörper eingesetzt wurde, ist eine leichte Abnahme der Permeabilität um ca. 10 % nach "Crosslink" zu verzeichnen (Balken "7C7 XL"). Dieser Effekt tritt nur nach Zugabe beider Antikörper auf (vgl. Balken "7C7 AK" und "2. AK"), und ist daher auf die Quervernetzung des Oberflächenantigens zurückzuführen. Weitere Experimente, in denen niedermolekulares 4 Kilodalton FITC-Dextran zur Diffusion eingesetzt wurde, zeigten keine Unterschiede in der Permeabilität (nicht gezeigte Daten).

im Falle von ICAM-1 beruht der beobachtete Rückgang der Permeabilität wieder allein auf der Wirkung der primären Antikörper. Auch in **Kapitel 3.2.2** ist der beobachtete Effekt nicht in Verbindung mit der Quervernetzung des Proteins durch den sekundären Antikörper zu sehen. Wie bereits erwähnt, könnte die Zugabe des primären Antikörpers selbst bereits zu einer Ligation von ICAM-1 führen. Da im Kontrollversuch die Quervernetzung von Endomucin schon zu einer leichten Reduktion der Permeabilität führt, ist die Aussagefähigkeit der Versuche zur parazellulären Permeabilität insgesamt sehr fragwürdig.



**Abb. 3.14 : ICAM-1 Antikörper bewirken eine Abnahme der Permeabilität von bEnd.5 Zellen.** bEnd.5 auf Transwell-Filtern wurden mit Antikörpern gegen ICAM-1 (a) inkubiert und mit einem polyklonalen Sekundärantikörper für 1h in Präsenz von FITC-Dextran quervernetzt. Zur Kontrolle wurden die Zellen nur mit Endomucin-Antikörpern (b) behandelt. Das Ergebnis der Diffusion ist als relative Permeabilität bezogen auf die „Mock“-Kontrolle ohne Antikörper dargestellt. Abkürzungen : XL = Crosslink, Ak = Antikörper.

### **3.3 Suche nach neuen VE-PTP Interaktionspartnern**

Um weiteren Aufschluß über die Funktion der Vaskulären Endothelialen Protein-Tyrosin Phosphatase (VE-PTP) zu erhalten, wurde auf biochemischem Wege nach Interaktionspartnern gesucht. Kandidatenproteine sollten gelelektrophoretisch aufgetrennt und massenspektrometrisch identifiziert werden.

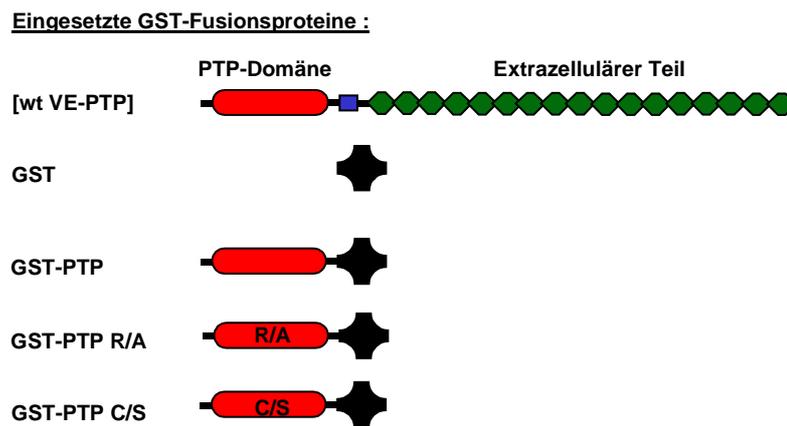
#### **3.3.1 Isolierung eines VE-PTP interagierenden Proteines**

Zur Isolierung von potentiellen Bindungspartnern wurden Ko-Immunopräzipitationen mit monoklonalen Antikörpern oder polyklonalem Serum gegen VE-PTP, sowie Pull-Down Experimente mit humanen IgG-Chimären des extrazellulären Teils von VE-PTP durchgeführt. Diese Experimente ergaben leider keine interessanten potentiellen Interaktionspartner oder Substrate von VE-PTP. Auf eine Darstellung der Ergebnisse wird verzichtet.

##### **3.3.1.1 Pull-Down Experimente mit GST-Fusionsproteinen unter Verwendung von Endothelioma-Lysaten**

Neben den oben genannten Versuchen zur Isolierung von VE-PTP-interagierenden Proteinen wurden Pull-Down Experimente mit Glutathion-S-Transferase (GST) - Fusionsproteinen der intrazellulären PTP-Domäne durchgeführt. **Abb. 3.15** gibt einen Überblick über die eingesetzten Konstrukte, welche von Gregor Fachinger *et al.*, 1999 kloniert wurden. Zum Einsatz kam ein Konstrukt, welches die Wildtyp-Phosphatasedomäne von VE-PTP enthielt; zusätzlich wurden zwei Aminosäure-Austauschmutanten des aktiven Zentrums eingesetzt. Hierbei handelt es sich um einen Arginin/Alanin (R/A) und einen Cystein/Serin (C/S) Austausch im aktiven Zentrum.

Wie in der **Einleitung** beschrieben, besitzen Protein-Tyrosin Phosphatasen familienübergreifend stark konservierte Phosphatasedomänen. Die Strukturdaten der Modellphosphatase PTP1B (Barford *et al.*, 1994) konnten daher beim Entwurf der Austauschmutanten für VE-PTP als Grundlage dienen. Die Punktmutationen behindern die Hydrolyse des Tyrosin-Phosphates, nicht jedoch die Bindung eines Substrates an die Phosphatasedomäne (Übersichtsartikel zur Struktur und Funktion von Protein-Tyrosin Phosphatasen : Zhang, 1998 und 2002). Diese "Substrate-Trapping" Mutanten sind zur Isolierung von potentiellen Interaktionspartnern besonders geeignet.

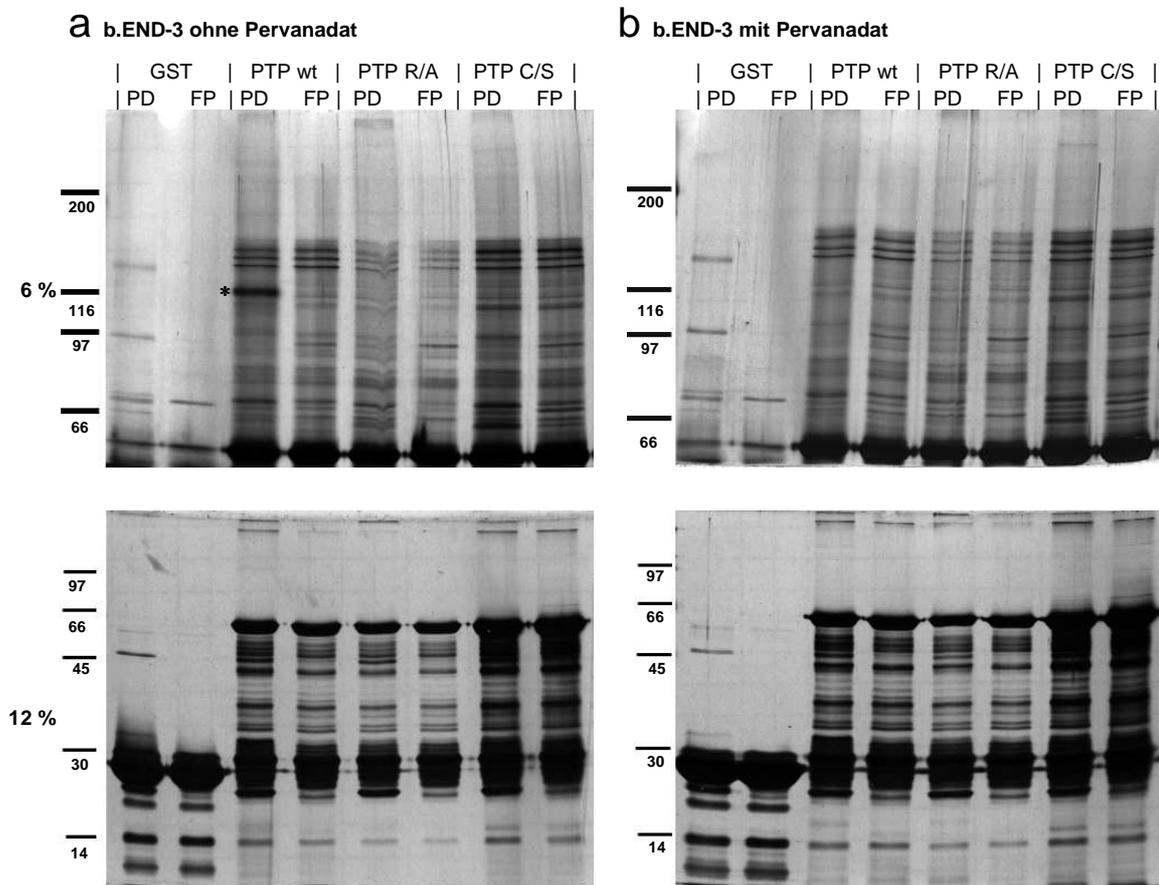


**Abb. 3.15 :** Schematische Darstellung der GST-Fusionsproteine, welche für Pull-Down Experimente zum Einsatz kamen. Verwendet wurde ein Konstrukt mit der Wildtyp C-terminalen Phosphatasedomäne von VE-PTP, welche an GST fusioniert vorliegt (GST-PTP), sowie zwei Punktmutanten im aktiven Zentrum (GST-PTP R/A und C/S). Fusionsproteine wurden rekombinant in *E.coli* exprimiert.

Die Fusionsproteine wurden wie in 2.2.2.14 beschrieben in *E.coli* exprimiert, gereinigt und an Glutathion-Sepharose gekoppelt. GST ohne Fusionspartner diente als Kontrolle für Pull-Down Experimente in Lysaten von bEnd.3 Endothelioma. Diese Zellen wurden entweder im nativen Zustand lysiert, oder nach 7-minütiger Behandlung mit Pervanadat, einem potenten, membrangängigen Inhibitor von Protein-Tyrosin Phosphatasen. Die Behandlung mit Pervanadat führt zur starken künstlichen Tyrosin-Phosphorylierung von zellulären Proteinen und sollte die Isolierung von phosphorylierten Interaktionspartnern von VE-PTP, vor allem mit den "Substrate-Trapping" Mutanten, erleichtern. Als Ausgangsmaterial wurden ca.  $5 \times 10^7$  Zellen bEnd.3 pro Pull-Down eingesetzt.

**Abbildung 3.16** zeigt das Ergebnis der Pull-Downs, welche auf 6% und 12% SDS Gelen aufgetrennt und silbergefärbt wurden. Zur Identifizierung von bakteriellen Proteinen, die zusammen mit den GST-Fusionsproteinen an die Glutathion-Sepharose gekoppelt wurden, befindet sich neben den eigentlichen Pull-Downs jeweils einer Probe des entsprechenden Fusionsproteines. In **Abb. 3.16 a** ist im Pull-Down mit der Wildtyp-Phosphatasedomäne von VE-PTP ein ca. 120 kDa großes Protein isoliert worden (Sternchen), welches nicht in den Kontrollen zu sehen ist. Erstaunlicherweise ist das Protein nicht mit den VE-PTP Punktmutanten isolierbar, zudem geht die Interaktion nach Behandlung der Zellen mit Pervanadat verloren (vgl. **Abb 3.16 b**). Ebenfalls erstaunlich ist die Tatsache, daß der Einsatz der "Substrate-Trapping" Mutanten keine zusätzlichen Kandidaten-Partnerproteine ergab.

Analoge Pull-Down Experimente mit verschiedenen anderen Zelllinien zeigten ebenfalls die starke Interaktion der nativen VE-PTP - Phosphatasedomäne mit dem 130 kDa Protein. Eine Ausnahme bildeten human Zellen, in denen das Protein nur sehr schwach interagiert (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.16 : Pull-Down Experiment mit VE-PTP GST-Fusionsproteinen.** Lysate von nativen (a) und Pervanadat-behandelten (b) bEnd.3 Endothelioma dienen als Grundlage für Pull-Downs mit GST-Fusionsproteinen des intrazellulären Teils von VE-PTP. Eingesetzt wurden die Wildtyp-Phosphatasedomäne (PTP wt) sowie R/A (PTP R/A) und C/S (PTP C/S) Mutanten im aktiven Zentrum. An Glutathion-Sepharose gekoppelte GST diente als Kontrolle. PD = Pull-Down Spur, FP = Fusionsprotein Spur. Dargestellt sind silbergefärbte 6% und 12 % Gele, der Stern in (a) markiert einen VE-PTP Interaktionspartner.

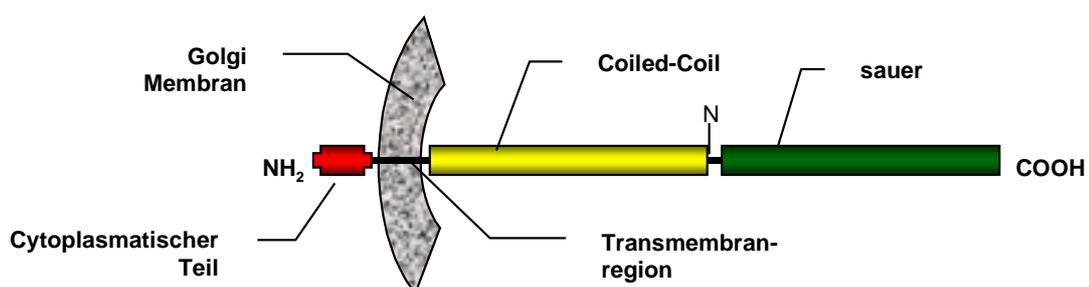
### 3.3.1.2 Identifizierung eines Kandidatenproteines

Das im Pull-Down gefundene 120 kDa Protein wurde im präparativen Maßstab aus MyEnd Endothelioma aufgereinigt, in welchen es ebenfalls als Interaktionspartner der Wildtyp PTP-Domäne vorkommt. Hierfür ca.  $3 \times 10^8$  Zellen MyEnd lysiert und für einen präparativen Pull-Down mit dem Wildtyp - PTP-GST Konstrukt eingesetzt. Das resultierende Gel wurde

Colloidal-Coomassie gefärbt, einer sehr sensitiven Färbemethode, die nicht mit massenspektrometrischen Methoden zur Identifikation des Proteines interferiert. In Zusammenarbeit mit Bernhard Küster von der Firma CellZome (Heidelberg) wurde das Protein als **GPP130** identifiziert. Die orthologen Proteine aus der Ratte und dem Menschen heißen GIMPc und GOLPH4, respektive. Jenes *cis*-golgi lokalisierte Typ-II Transmembranprotein wurde 1987 erstmalig von Yuan *et al.* beschrieben. Das murine Protein umfaßt 683 Aminosäuren mit einem rechnerischen Gewicht von 80 Kilodalton, besitzt aber ein apparentes Molekulargewicht von 130 kDa. Dies liegt zum einen an seinen Calcium-bindenden Eigenschaften, zum anderen am hohen Gehalt saurer Aminosäuren.

**Abb. 3.17** gibt einen Überblick über die strukturellen Merkmale des Proteines. Hier fällt der kurze, aminotermine Teil auf, der ins Cytoplasma ragt. Der Teil umfaßt nur 12 Aminosäuren und müßte aufgrund der Orientierung beider Proteine in der Zelle die Interaktion mit VE-PTP vermitteln. Er enthält eine potentielle PKA-Phosphorylierungsstelle. Der weitaus größte Teil des Proteines ragt ins Lumen des Golgi-Apparates. Strukturelle Merkmale dieser Region sind eine Membran-proximale Coiled-Coil Domäne, welche für die pH-sensitive Lokalisation im *cis*-Golgi verantwortlich ist (Bachert *et al.*, 2001), sowie ein stark saurer Membran-distaler Bereich. Bislang beschriebene Eigenschaften von GPP130 sind eine Umverteilung des Proteines vom Golgi-Kompartiment zu den Endosomen nach pH-Änderung oder Überexpression (Linstedt *et al.*, 1997, Puri *et al.*, 2002). Eine Funktion des Proteins ist bislang nicht bekannt.

**Schematische Darstellung des Proteins**



**Abb. 3.17 : Schematische Darstellung von GPP130.** Das Typ II - Transmembranprotein besitzt einen kurzen cytoplasmatischen Teil am Aminoterminus und eine große Golgi-luminale, carboxyterminale Region. Im carboxyterminalen Teil befindet sich eine Coiled-Coil Domäne und ein ausgedehnter, sehr saurer Bereich, sowie eine N-Glykosylierungsstelle. Der Aminoterminus enthält eine potentielle PKA-Phosphorylierungsstelle.

### **3.3.2 Überprüfung der Interaktion von VE-PTP und GPP130**

Die vermutliche genomische Organisation des GPP130 Genes auf dem murinen Chromosom 3 wurde ENSEMBL entnommen. Demnach erstreckt sich das Gen in 16 Exons über einen Bereich von ca. 80 Kilobasen. Die ebenfalls vorhergesagt Messenger-RNA diente als Grundlage für die Klonierung der cDNA des murinen GPP130 in den eukaryontischen Expressionsvektor pCDNA3 (siehe **2.2.1.11**). Zudem wurde eine aminoterminaler Austauschmutante von GPP130 hergestellt, welche den cytoplasmatischen Teil des Typ-II Transmembranproteines DC-SIGN und den carboxyterminalen Teil von GPP130 trägt (**2.2.1.12**, siehe **Abb. 3.19 b**). Mit den Konstrukten sollte die Spezifität der Interaktion von GPP130 und VE-PTP in biochemischen Versuchen untersucht werden.

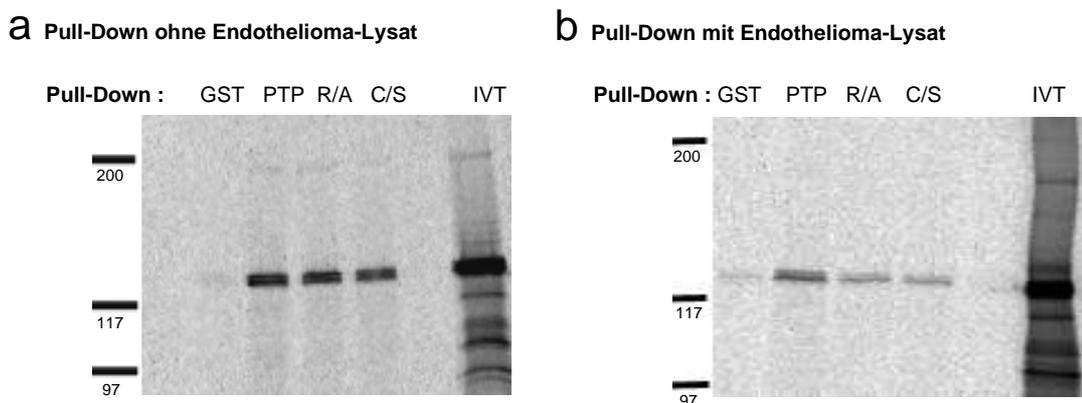
#### **3.3.2.1 Pull-Down mit GST-Fusionsproteinen und *in-vitro* translatierten Proteinen**

Die direkte Interaktion beider Proteine wurde in einem zellfreien System mit *in-vitro* translatiertem GPP130 und GST-Fusionsproteinen von VE-PTP überprüft. Hierfür wird GPP130 unter Verwendung von Kaninchen-Reticulozytenlysate und radioaktiv markiertem <sup>35</sup>S-Methionin und Cystein *in-vitro* von einem Expressionsplasmid transkribiert und im gleichen Reaktionsansatz translatiert (siehe **2.2.2.15**). Der Reaktion werden Hundemikrosomenmembranen hinzugefügt, um eine posttranslationelle Prozessierung und Glykosylierung des Transmembranproteines GPP130 zu ermöglichen. Die radioaktiv markierten Proteine wurden mit den bereits beschriebenen GST-Fusionsproteinen von VE-PTP inkubiert. GST Pull-Downs wurden technisch analog zur in **2.2.2.11** beschriebenen Ko-Immünpräzipitation durchgeführt. Pro Ansatz kamen 30 µl proteinbeladene Sepharosekugeln und 10µl der *in-vitro* Translation zum Einsatz. Die Analyse der Pull-Downs findet nach gelelektrophoretischer Trennung der Proteine durch Fluorographie oder durch Belichtung einer Phosphorimager<sup>TM</sup> Bildplatte statt.

**Abb. 3.18** zeigt das Ergebnis der Studien mit *in-vitro* translatierten Proteinen. In **Abb. 3.18 a** wurde der Pull-Down mit VE-PTP GST Fusionsproteinen in Anwesenheit der *in-vitro* translatierten Proteine durchgeführt. Die Signale deuten auf eine gleichermaßen starke Affinität von GPP130 zur Wildtyp Phosphatasedomäne wie zu den Punktmutanten hin, ohne dabei an die GST Kontrolle zu binden. Dies steht nicht im Einklang mit den in **Kapitel 3.3.1.1** gezeigten Daten, die keine Interaktion von GPP130 mit den VE-PTP Punktmutanten demonstrierten.

In **Abb. 3.18 b** befand sich im Pull-Down Reaktionsansatz zusätzlich Lysat von MyEnd Endothelioma, so daß die Interaktion unter ähnlichen Bedingungen wie bei der ursprünglichen Isolierung von GPP130 stattfinden konnte. Verglichen mit **3.18 a** ändert sich die Spezifität der Interaktion merklich. In den Gelspuren der Punktmutanten sind schwächere Signale nachweisbar als nach Pull-Down mit der Wildtyp PTP-Domäne. Es muß bedacht werden, daß MyEnd Endothelioma endogenes, unmarkiertes GPP130 enthalten, welches mit dem markierten Protein um die Bindung an die GST-Fusionsproteine konkurriert. Dies führt zu einem proportional schwächeren Signal. Trotzdem hat die Gegenwart von Endotheliomalysat eine Erhöhung der Spezifität der Bindung von GPP130 an VE-PTP mit intakter Phosphatasedomäne zur Folge. Eine mögliche Erklärung wäre ein im Lysat vorhandenes Adapterprotein, welches die Interaktion vermittelt.

Zusammengefaßt bestätigen die Pull-Down Experimente die Interaktion von VE-PTP mit GPP130. Die Spezifität der Bindung nimmt in Gegenwart von Endothelzelllysatz zugunsten der Wildtyp-Phosphatasedomäne von VE-PTP zu.



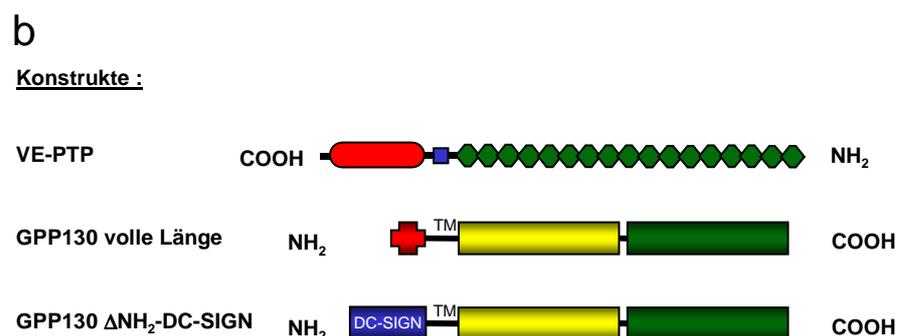
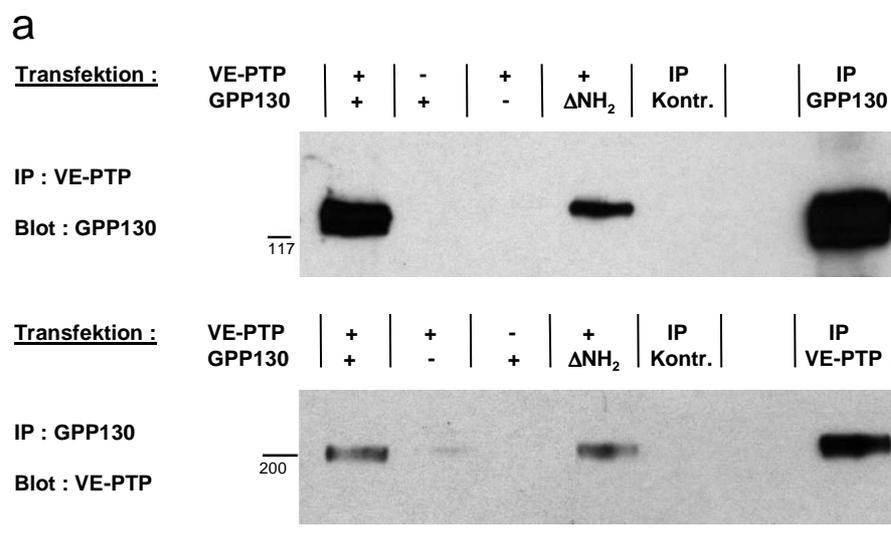
**Abb. 3.18 : Pull-down von *in-vitro* - translatiertem GPP130 mit VE-PTP GST-Fusionsproteinen. (a) : Reaktionsansatz enthielt *in-vitro* translatierte Proteine. (b) : Reaktionsansatz enthielt *in-vitro* translatierte Proteine und Endotheliomalysat (Äquivalent einer 15 cm Zellkulturschale). Pull-Down mit den in Abb. 3.15 beschriebenen GST-Fusionsproteinen. Das *in-vitro* translatierte Protein wurde jeweils zur Kontrolle mit auf das Gel geladen (IVT). Exposition der Gele auf Phosphorimager Platten.**

### 3.3.2.2 Ko-Immünpräzipitationsexperimente mit transient transfizierten Zellen

Für die bisherigen biochemischen Studien zur Interaktion von VE-PTP mit GPP130 kamen GST-Fusionsproteine zum Einsatz. Diese beinhalten jedoch nur den intrazellulären Teil von VE-PTP. Der im Verhältnis dazu sehr große extrazelluläre Teil und die

Transmembrandomäne von VE-PTP wurden in den GST Pull-Downs für die Interaktion mit GPP130 nicht berücksichtigt.

Daher wurden Ko-Immunpräzipitationsexperiment in transient transfizierten Zellen durchgeführt, um die Interaktion beider Proteine voller Länge innerhalb der physiologischen Umgebung eines zellulären Systems zu untersuchen. Hierfür wurden humane 293 A Zellen mit eukaryontischen Expressionsplasmiden für VE-PTP (pCMV-6 XL4 VE-PTP full length) und GPP130 (pCDNA-3 GPP130 full length) transfiziert. Neben dem nativen GPP130 kam auch die aminoterminale Austauschmutante zum Einsatz (pCDNA-3 GPP130  $\Delta$ NH<sub>2</sub> DC-SIGN). Die Zellen wurden als Transfektionssystem gewählt, weil humanes endogenes GPP130 kaum mit VE-PTP aus der Maus interagiert und daher die Interaktion der transfizierten Proteine nur wenig durch Konkurrenz stören kann.



**Abb. 3.19 : Ko-Immunpräzipitation von VE-PTP und GPP130 in transient transfizierten 293 A Zellen. (a) :** Humane HEK 293 A Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für murines volle-Länge VE-PTP und murines volle-Länge GPP130, sowie eine aminoterminale GPP130 Substitutionsmutante ( $\Delta$ NH<sub>2</sub>) transfiziert. Die Kopräzipitation wurde in beide Richtungen mit Antikörpern gegen VE-PTP (mAk 109) und GPP130 (polyklonales Serum) durchgeführt. Zusätzlich wurden die direkt präzipitierten Proteine geladen (jeweils rechte Spur), um deren Laufhöhe im Gel zu demonstrieren. Der aminoterminale Teil von GPP130 ist für die Interaktion mit VE-PTP nicht notwendig. **(b) :** Schematische Darstellung der transfizierten GPP130-Konstrukte.

Für eine Immunpräzipitation wurde eine 100mm Zellkulturschale 293A Zellen mit GeneJammer™ (2.2.2.12) transfiziert. Nach 48 stündiger Expression wurden die Zellen lysiert und Immunpräzipitationen mit mAk 109.3 gegen VE-PTP und einem polyklonalen Kaninchenserum gegen GPP130 durchgeführt. Der Nachweis der Proteine fand im Westernblot unter Verwendung der gleichen Antikörper statt. **Abb. 3.19 a** faßt das Ergebnis der Versuche zusammen, **Abb. 3.19 b** stellt die transfizierten Proteine schematisch dar.

Die Transfektion von VE-PTP und nativem GPP130 führt zu einer deutlich nachweisbaren Interaktion beider Proteine, sowohl nach Präzipitation von VE-PTP als auch von GPP130 (linke Spuren). GPP130 läuft im Gel als Doppelbande bei ca. 120-130 Kilodalton, VE-PTP als einzelne Bande bei 200 Kilodalton. In den Kontrollen, für die jeweils nur ein Protein transfiziert beziehungsweise ein unspezifischer Antikörper für die IP eingesetzt wurde ("IP Kontr."), sind keine signifikanten Signale zu sehen.

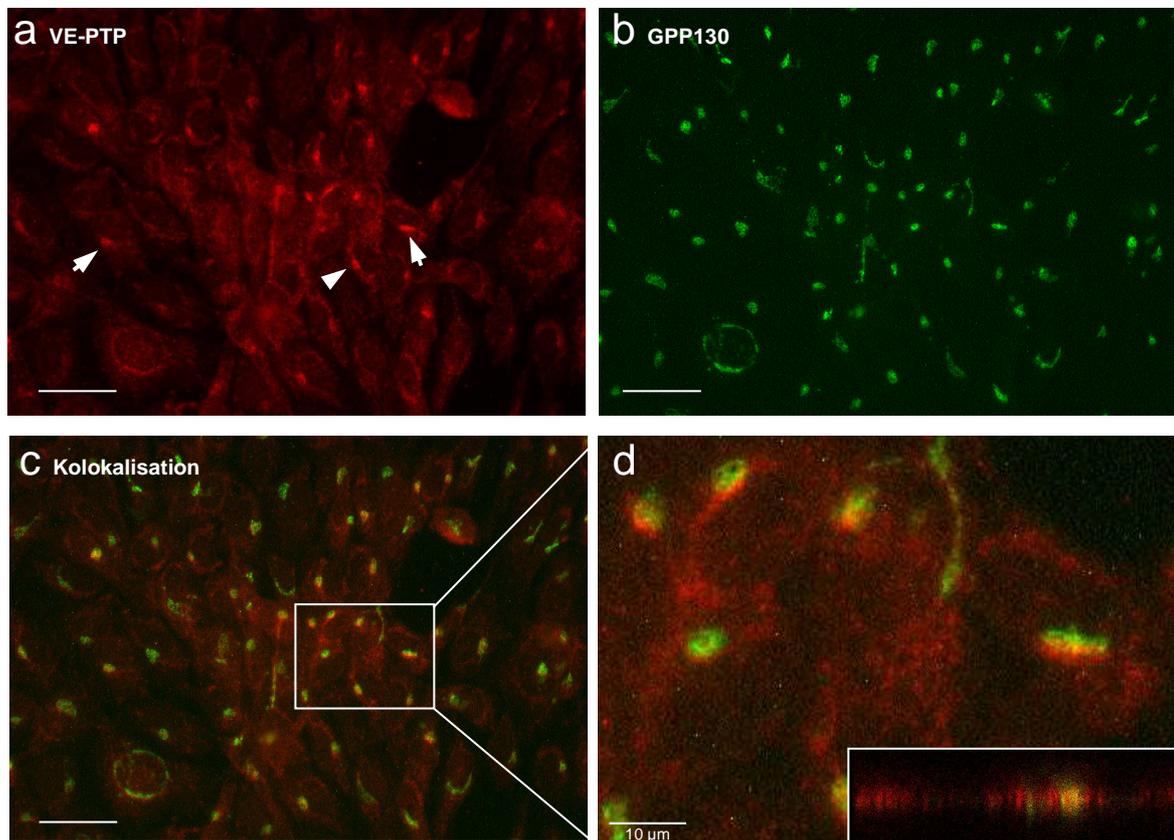
Interessanterweise interagiert VE-PTP ebenfalls mit der aminoterminalen Austauschmutante GPP130  $\Delta$ NH<sub>2</sub> DC-SIGN (mittlere Spuren). Dies läßt den Schluß zu, daß der carboxyterminale, Golgi-luminale Teil von GPP130 für die Interaktion mit VE-PTP ausreichend ist. Aufgrund der Orientierung der Proteine in der nativen Zelle lassen diese Daten eine direkte Interaktion beider Proteine fragwürdig erscheinen. Ein Adapterprotein wäre in der Lage, die spezifische Interaktion zwischen VE-PTP und GPP130 zu vermitteln (siehe **Diskussion**).

### **3.3.3 Subzelluläre Lokalisation von GPP130**

Um eine Vorstellung von der Lokalisation von GPP130 und VE-PTP in der Zelle zu erhalten, wurden subkonfluente HUVECs mit einem mAk gegen GPP130 (Geschenk von Hans-Peter Hauri) und einem polyklonalen Kaninchenserum gegen VE-PTP (VEPTPc) angefärbt.

In **Kapitel 3.1.1.2** wurde die dichteabhängige Umlagerung von VE-PTP an den Zell-Zellkontakt ausgeführt. Dabei fiel eine intrazelluläre Lokalisation der Phosphatase in subkonfluenten Zellen auf, welche bei höherer Zelldichte zugunsten einer verstärkten Oberflächenlokalisierung abnimmt. Für die in **Abb. 3.20** dargestellten Immunfluoreszenz-Aufnahmen wurden subkonfluente HUVEC verwendet, welche VEPTP in einem intrazellulären Kompartiment, und noch nicht am Zellkontakt exprimieren (**Bild 3.20 a**). Die Färbung mit dem GPP130 Antikörper ergibt ein klar auf den Golgi-Apparat beschränktes Signal (**Bild 3.20 b**). In der Doppelfärbung ist trotz der mäßigen Qualität der VE-PTP Färbung eine teilweise Überschneidung der Signale sichtbar (**Bild 3.20 c + d**).

Die partielle Kolokalisation von VE-PTP und GPP130 in subkonfluenten Endothelzellen gibt der biochemischen Interaktion beider Proteine eine räumliche Grundlage.



**Abb. 3.20 : Kolokalisation von VE-PTP und GPP130 in HUVEC.** Subkonfluente HUVEC wurden mit polyklonalen Antikörpern gegen VE-PTP (a) und einem monoklonalen anti-GPP130 Antikörper (b) immungefärbt. Doppelfärbung in (c+d). Z-scan als Einschub in (d). Balken = 50 µm, sofern nicht anders angegeben.

## 4. Diskussion

### **4.1 VE-PTP ist ein funktioneller Interaktionspartner von VE-Cadherin**

Der endotheliale Zell-Zellkontakt besitzt eine wichtige Funktion bei der Regulierung der vaskulären Permeabilität. Dies ist von Bedeutung für die Auswanderung von Leukozyten und die Diffusion von Substanzen aus dem Blut in periphere Gewebe. Daher existieren komplexe Regulationsmechanismen zur Kontrolle der vaskulären Permeabilität, die unter anderem über die Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren durch Wachstumsfaktoren, Entzündungsmediatoren und Leukozyten wirken. Von den spezialisierten Kontaktstrukturen, zu denen auch Tight Junctions, Desmosomen und Complexus Adhaerentes zählen, kommt der Adherens Junction in Endothelzellen eine zentrale Bedeutung zu. In postkapillären Venolen existieren spezialisierte Endothelien, welche die massive Auswanderung von Leukozyten in die peripheren lymphatischen Organe unterstützen. Die Kontaktbereiche dieser Endothelzellen werden hauptsächlich von AJs gebildet. VE-Cadherin ist der wichtigste Bestandteil der Adherens Junction. Über seinen extrazellulären Teil bildet es homophile Zellkontakte, der intrazelluläre Teil dient der Verankerung mit dem Cytoskelett. Hierfür assoziiert VE-Cadherin mit den Cateninen und p120. Die Festigkeit der Adherens Junction ist direkt proportional zur Assoziation des Cadherin-Catenin Komplexes mit dem Cytoskelett (Vleminckx & Kemler, 1999; Vestweber, 2000).

Die Dynamik des Komplexes im Zuge der Etablierung von festen Zellkontakten oder der transienten Erhöhung der Permeabilität durch exogene Substanzen illustriert dessen Bedeutung für die vaskuläre Integrität. In konfluenten Zellen ist gegenüber subkonfluentem Endothel eine verminderte Bindung von p120 an VE-Cadherin dokumentiert worden. Gleichzeitig nimmt die Bindung von Plakoglobin an VE-Cadherin zu (Lampugnani *et al.*, 1995 + 1997). p120 wurde eine Funktion für die Regulierung der Halbwertszeit von Cadherinen über Internalisierung und Degradierung zugeschrieben. Zudem ist es über die Bindung an Kinesin für die schnelle Rekrutierung von N-Cadherin zu Zellkontaktstellen nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Depletierung verantwortlich (Chen *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2003, Xiao *et al.*, 2003).  $\beta$ -Catenin ist das Ziel zahlreicher Signaltransduktionswege und Assoziationspartner mehrerer Phosphatasen, wodurch seine Beteiligung an der Regulierung des endothelialen Zellkontaktes vermutet werden kann. Die Aktivierung des Wnt-Signaltransduktionsweges führt zur erhöhten Konzentration an freiem  $\beta$ - und  $\gamma$ - Catenin in der Zelle, was die verstärkte Lokalisation des Cadherin-Catenin Komplexes in der Plasmamembran zur Folge hat. Dies

erhöht die Cadherin-vermittelte Adhäsion in einigen Zelllinien (Bradley *et al.*, 1993; Hinck *et al.*, 1994).

Wie in der Einleitung ausgeführt, geht die Tyrosin-Phosphorylierung von Komponenten der Adherens Junction mit der Destabilisierung der Integrität des Zell-Zellkontaktes einher. Dies kann mit einer Dissoziation des Cadherin-Catenin Komplexes verbunden sein (Rabiet *et al.*, 1996), nach Stimulierung mit VEGF wurde jedoch kein Zerfall des VE-Cadherin-Catenin Komplexes beobachtet (Esser *et al.*, 1998). Der genaue phosphorylierungsabhängige Mechanismus, der zur Lockerung des Zellkontaktes führt, ist noch nicht geklärt.  $\beta$ -Catenin selbst ist offenbar nicht für die verminderte Zelladhäsion nach erhöhter Tyrosin-Phosphorylierung verantwortlich, wie anhand eines E-Cadherin- $\alpha$ -Catenin Fusionsproteines gezeigt wurde. Vielmehr könnten andere Junction-Proteine wie ERM-Proteine und ZO-1 beteiligt sein (Takeda *et al.*, 1995). Neuere Arbeiten schlagen die Produktion von intrazellulären oxidativen Substanzen als Folge von Cytokin-Stimulierung vor, die zur Phosphorylierung von VE-Cadherin und erhöhter Permeabilität einer endothelialen Zellschicht führen (Nwariaku *et al.*, 2004). Von Interesse ist in dieser Hinsicht auch die Etablierung der Bedeutung der Rac-vermittelten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), welche die Phosphorylierung von Komponenten des VE-Cadherin-Catenin Komplexes bewirken. Inhibition der Signalisierung durch ROS verhindert die Migration von Endothelzellen, die eine transiente Reduktion der Zelladhäsion voraussetzt (van Wetering *et al.*, 2002).

Bei Änderung der endothelialen Zellkontaktintegrität ist häufig die Phosphorylierung von VE-Cadherin betroffen. Ob es sich hierbei um die Ursache oder die Folge des Effektes auf den Zellkontakt handelt, ist unklar. Der cytoplasmatische Teil von VE-Cadherin enthält acht potentielle Tyrosin-Phosphorylierungsstellen und interagiert, wie bereits erwähnt, mit unterschiedlichen Proteinen. Zu den Bindungspartnern von VE-Cadherin gehören auch Protein-Tyrosin Kinasen wie der VEGFR-2. Allerdings scheinen Cadherine im Gegensatz zu ihren cytoplasmatischen Bindungspartnern seltener Substrate für PTKs zu sein (Daniel & Reynolds, 1997). Dennoch assoziieren sie mit Protein-Tyrosin Phosphatasen, von denen sie auch dephosphoryliert werden können (Nawroth *et al.*, 2002).

In der Literatur ist die Tyrosin-Phosphorylierung des Cadherin-Catenin Komplexes an der Adherens Junction mit der verminderten Integrität des Zell-Zellkontaktes korreliert. Die hohe Dynamik des Komplexes, welche die Fähigkeit der Zelle widerspiegelt, auf permeabilitätsverändernde Reize schnell zu reagieren, setzt auch die zügige Regulierbarkeit der Phosphorylierung voraus. Daher verdienen Protein-Tyrosin Phosphatasen als transiente oder feste Bestandteile des VE-Cadherin-Catenin Komplexes besondere Beachtung.

#### **4.1.1 VE-PTP ist eine endothelspezifisch exprimierte Phosphatase**

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe monoklonaler Antikörper die Lokalisation von VE-PTP während der Embryonalentwicklung und in adulten Organen der Maus untersucht. Dabei wurde eine ausschließlich endotheliale Expression der Phosphatase gefunden (Kapitel 3.1.1.1). Die VE-PTP Signale sind schwach verglichen mit anderen endothelialen Oberflächenantigenen wie ESAM oder Endomucin und vor allem auf großen Gefäßen gut nachweisbar.

Anhand der Immunfärbungen konnte die endotheliale VE-PTP Expression, die durch *in-situ* Hybridisierung von Fachinger *et al.* 1999 gezeigt wurde, bestätigt werden. Einige interessante Befunde decken sich auf mRNA und auf Proteinebene: In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine vorrangige Lokalisation der Phosphatase auf großen Gefäßen gefunden werden, deren Endothel von einer dicken Schicht glatter Muskulatur umgeben ist. Dies ist charakteristisch für Arterien. Die Analyse der VE-PTP homozygot-defizienten Maus, welche gegenwärtig in der Arbeitsgruppe Vestweber durchgeführt wird, scheint den Befund einer verstärkt arteriellen Lokalisation von VE-PTP zu bestätigen. Im ältesten untersuchten Embryonalstadium E14,5 gehörte die Lunge ebenfalls zu den Organen mit der stärksten Expression der Phosphatase. Generell zeigten Gewebe mit ausgeprägter Vaskulatur starke Signale, vor allem der Choroid Plexus im Gehirn ab E 12,5 (nicht gezeigt).

Zur Bestimmung der Endothelspezifität wurden Serienschritte mit Antikörpern gegen zwei endotheliale Markerproteine, ESAM (Nasdala *et al.*, 2002) und Endomucin (Samulowitz *et al.*, 2002), angefärbt. Beide Antikörper zeigten in keinem Fall Signale auf Epithelien und stimmten in kleinen Gefäßen stets mit dem Verteilungsmuster von VE-PTP überein. Auf großen Gefäßen wurde häufig eine Expression von VE-PTP und ESAM, nicht aber von Endomucin gefunden. Endomucin wird, wie bereits erwähnt, präferentiell auf venösem Endothel exprimiert. Eine Ausnahme hierzu ist jedoch die dorsale Aorta, die Endomucin trägt und zudem stark positiv für VE-PTP ist. In kleineren Gefäßen sind arterielle und venöse Expression ohne geeignete Markerproteine schwer unterscheidbar, da beide Gefäßtypen im Gewebe direkt übereinander verlaufen und in Gefrierschnitten nicht getrennt voneinander betrachtet werden können. Eine Aussage bezüglich der arteriellen Lokalisation von VE-PTP ist anhand der immunhistologischen Daten nur für große Gefäße möglich, welche Unterschiede in der Expression der Markerproteine ESAM und Endomucin aufweisen.

Besonderes Augenmerk bei der Analyse der immunhistologischen Färbungen lag auf einer eventuellen epithelialen Expression von VE-PTP. Doch konnten weder im Embryo noch im adulten Tier VE-PTP Signale auf solchen Geweben gefunden werden. Besonders deutlich wird dies im kolumnaren Epithel der Lunge, welche klar von der VE-PTP-positiven

Vaskulatur unterscheidbar ist. Weiterhin wurden Epithelzelllinien im Westernblot auf die Expression von VE-PTP hin untersucht. Von den vier Zelllinien CMT, CSG, MTD1A und EPH4 exprimieren nur CMT-Zellen VE-PTP, die anderen hingegen nicht (Daten nicht gezeigt). Daher werden CMT-Zellen als Ausnahme zur generellen endothelspezifischen Expression von VE-PTP betrachtet.

### **4.1.2 VE-PTP wird mit steigender Zelldichte in den endothelialen Zellkontakt umgelagert**

Die immunocytoologischen Studien der subzellulären Verteilung von VE-PTP in bEnd.3 Endothelioma ergaben ein zunächst überraschendes Ergebnis : In subkonfluenten Zellen ist VE-PTP nicht wie erwartet am Zell-Zellkontakt nachweisbar, sondern lediglich in einem perinukleären, intrazellulären Kompartiment. Da in Vorarbeiten VE-PTP jedoch als Interaktionspartner der Zelloberflächenproteine TIE-2 und VE-Cadherin beschrieben wurde (Fachinger *et al.*, 1999; Nawroth *et al.*, 2002), sollte die Phosphatase zumindest zeitweise an der Plasmamembran lokalisierbar sein. Dies muß um so mehr gefordert werden, als VE-PTP die den Zellkontakt stabilisierende Funktion von VE-Cadherin positiv reguliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine mit steigender Zelldichte zunehmende Lokalisation von VE-PTP am Zellkontakt gezeigt, wobei die Signale innerhalb der Zelle abnahmen (Kapitel 3.1.1.2). Über die Natur des VE-PTP-positiven intrazellulären Kompartimentes kann nur spekuliert werden, da eine teilweise Kolokalisation mit Markern für Golgi-Apparat und frühe Endosomen möglich ist. Die Robustheit der Färbung, gerade in subkonfluenten Zellen, läßt jedoch eine physiologische Bedeutung vermuten, über die am Ende dieses Kapitels noch diskutiert werden wird. In hoch konfluenten Endothelioma ist eine Kolokalisation mit VE-Cadherin am Zellkontakt gut nachweisbar. Dies wird der zur Interaktion mit VE-Cadherin geforderten Position von VE-PTP am Zellkontakt gerecht. Wie später ausgeführt, steht die dichteabhängige Kolokalisation der Phosphatase mit VE-Cadherin im Zusammenhang mit der Assoziation beider Moleküle.

Die Untersuchung der Oberflächenexpression von VE-PTP auf Endothelioma mittels Durchflußcytometrie (Kapitel 3.1.1.3) ergab eine konstante Expression der Phosphatase auf der Zelloberfläche. Hierfür wurden die gleichen Dichtestadien untersucht wie in den Immunfärbungen. Zusammen mit den immunocytoologischen Beobachtungen spricht dies für eine dichteabhängige Umlagerung von VE-PTP von der apikalen Oberfläche der Endothelzellen in deren Kontaktbereich. Die mit einsetzender Konfluenz sichtbare

Konzentrierung des Moleküls im Zellkontakt ist durch eine Rekrutierung von der Oberfläche in die Junction erklärbar.

Eine ähnliche Umlagerung wurde für E-Cadherin in Prä-Implantationsembryonen der Maus beobachtet. Dort befindet sich E-Cadherin gleichmäßig verteilt auf der apikalen Oberfläche von Blastomeren nicht-kompakter Morulae. Nach der Kompaktierung ist E-Cadherin in den Zellkontakten der äußeren Blastomeren sichtbar, nicht mehr auf deren Oberfläche (Vestweber *et al.*, 1987). Dies spricht für einen Mechanismus, der bei Ausbildung fester Kontakte von Zellen gezielt Adhäsionsmoleküle in die Kontaktbereiche rekrutiert. Wie der Mechanismus genau funktioniert, ist nicht bekannt.

Als weiterer Mechanismus wäre eine Heraufregulierung der Expression von Phosphatasen denkbar. Dies wurde für die humane hPTP- $\beta$  auf mRNA Ebene gezeigt (Gaits *et al.*, 1995), wobei sich diese Studie auf die Analyse der Transkription der Phosphatase beschränkte. In der vorliegenden Arbeit wurde die Protein-Expression untersucht, welche das Ergebnis der oben genannten Studie nicht bestätigt. Eine verstärkte Transkription von VE-PTP könnte allerdings auch auf einen zelldichteabhängig erhöhten "Turn-over" der Phosphatase schließen lassen, der bei konstanter Oberflächenexpression in konfluenten Zellen mehr "Messenger-RNA" zur Aufrechterhaltung des Expressionsniveaus an der Oberfläche erfordert. Zur Klärung jener Frage wären "Pulse-Chase" Experimente an Endothelioma verschiedener Dichte zur Bestimmung der Halbwertszeit von VE-PTP notwendig.

Die Expression der verwandten Typ-III RPTP DEP-1 wird ebenfalls mit steigender Zelldichte erhöht, hier steigt jedoch der Gesamtproteingehalt in der Zelle (Östmann *et al.*, 1994). DEP-1 besitzt durch seine Funktion für die Entwicklung der embryonalen Vaskulatur ein ähnliches Wirkungsfeld wie VE-PTP (Takahashi *et al.*, 2003). Auch die Typ IIb Phosphatasen PCP-2 und hPTP- $\kappa$  werden mit steigender Zelldichte verstärkt exprimiert und lokalisieren in konfluenten Zellen am Zell-Zellkontakt.  $\beta$ -Catenin ist ein Substrat für diese Phosphatasen (Fuchs *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 2002). Für RPTP Lar wurde 2002 von Symons *et al.* eine zelldichteabhängige Expression gezeigt, die zudem von E-Cadherin abhängig ist.

Im Gegensatz dazu ist die Expression von VE-PTP offenbar nicht für die Lokalisation des Moleküls von Bedeutung. Ein bislang unbekannter Mechanismus könnte für die Rekrutierung der Phosphatase in den Zellkontakt verantwortlich sein.

#### **4.1.3 VE-PTP und VE-Cadherin assoziieren verstärkt in konfluenten Endothelzellen**

Die dichteabhängige Umlagerung von VE-PTP in den Zellkontakt korreliert mit einer verstärkten Assoziation der Phosphatase mit VE-Cadherin. Durch Ko-Immunitätspräzipitationsexperimente an bEnd.3 und HUVEC konnte gezeigt werden, daß zum Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens der VE-PTP-Lokalisation im Zell-Zellkontakt beide Proteine schwach miteinander interagieren. Dieser Zeitpunkt wird in bEnd.3 und HUVEC mit einsetzender Konfluenz der Zellen erreicht. Mit fortschreitender Dichte der Kultur steigt auch die Assoziation von VE-PTP und VE-Cadherin (Kapitel 3.1.2.1). Das Ergebnis wurde in zwei verschiedenen Zelltypen von verschiedenen Spezies erhalten.

Die VE-Cadherin Expression bleibt mit steigender Zelldichte unverändert. Somit korreliert der Assoziationsgrad der Moleküle mit der Lokalisierbarkeit im Zellkontakt und nicht mit deren Expression in der Zelle. Dadurch wird eine leichtere Ko-Immunitätspräzipitierbarkeit unter Bedingungen guter Oberflächenexpression beider Proteine impliziert. Solch eine Expression ist stets in transient transfizierten Zellen der Fall (nicht gezeigt), an denen auch die biochemischen Studien von Nawroth *et al.* durchgeführt wurden.

Eingangs und in der Einleitung wurde ausgeführt, welchen Änderungen der Cadherin-Catenin Komplex bei steigender Zelldichte unterworfen ist (Kapitel 1.4). Hier wurde deutlich, daß der Komplex in konfluenten Zellen dephosphoryliert wird und verstärkt mit dem Cytoskelett assoziiert vorliegt. Besonders hervorhebenswert ist die Assoziation von  $\gamma$ -Catenin (Plakoglobin) mit VE-Cadherin, die, ähnlich wie VE-PTP, in konfluenten Endothelzellen zunimmt. Die Expression von Plakoglobin wird auf Protein- und mRNA Ebene mit steigender Zelldichte erhöht, und geht nach Verwundung einer konfluenten endothelialen Zellschicht zurück (Lampugnani *et al.*, 1995). Offenbar ändert sich der Cadherin-Catenin Komplex im Zuge des Dichterwerdens der Zellen in seiner Zusammensetzung.

Die Bedeutung von Phosphatasen für den Komplex ist in mehreren Fällen gut dokumentiert (Kapitel 1.3.2). Bislang konnte eine Funktion der Phosphatasen PTP1b und PTP $\mu$  für die N-Cadherin Assoziation mit dem Cytoskelett gezeigt werden (Brady-Kalnay *et al.*, 1995; Balsamo *et al.*, 1998). Weiterhin scheint SHP-2 von Bedeutung für den VE-Cadherin-Catenin Komplex zu sein, da die Assoziation dieser Phosphatase mit dem Komplex von Zellkontakt-beeinflussenden Faktoren wie Thrombin-Stimulation und Applikation von Scherkräften abhängt (Ukropec *et al.*, 2000 + 2002).

Die Assoziation von VE-PTP und VE-Cadherin ist ungewöhnlich in der Hinsicht, daß sie über die extrazellulären Domänen beider Proteine und nicht über die Bindung an  $\beta$ -Catenin stattfindet. Dies ist der erste berichtete Fall einer solchen Interaktion (Nawroth *et al.*, 2002).

Aus früheren Veröffentlichungen ist bekannt, daß VE-Cadherin bereits in subkonfluenten Endothelzellen am Zell-Zellkontakt lokalisiert ist (Lampugnani *et al.*, 1995). Dies führte zusammen mit der verstärkten Assoziation mit VE-PTP zur Hypothese einer VE-Cadherin-abhängigen Rekrutierung der Phosphatase in den Zellkontakt. Daher wurde mittels siRNA die VE-Cadherin - Expression in bEnd.3 Endothelioma vorübergehend ausgeschaltet (Kapitel 3.1.1.4). Wie dargestellt, läßt sich die Expression des Cadherins für etwa 24 h stark verringern. Dies hat gegenüber der Kontrolle jedoch keinen Einfluß auf die VE-PTP Lokalisation im Zell-Zellkontakt.

Allerdings berücksichtigt das Experiment möglicherweise nur die Funktion von VE-Cadherin bei der *Aufrechterhaltung*, nicht aber bei der *Etablierung* der VE-PTP Lokalisation in der Junction. Die experimentellen Bedingungen mußten aufgrund der transienten Natur des siRNA-Effektes so gewählt werden, daß in sehr dicht ausgesäten Zellen bereits nach 24 h eine signifikante Kolo-kalisation von VE-PTP und VE-Cadherin im Zellkontakt sichtbar wurde. Der gleiche Vorgang dauerte unter üblichen Zellkulturbedingungen mindestens vier Tage. Infolgedessen könnte VE-Cadherin, welches sich zum Zeitpunkt der Transfektion der siRNA Oligonukleotide noch an der Zelloberfläche befindet, für die Bildung von Zellkontakten und eine mögliche Rekrutierung der Phosphatase ausreichen. Trotz des hohen "Turn-overs" von VE-Cadherin setzt der siRNA Effekt unter Umständen erst nach erfolgter Umlagerung VE-PTPs in den Kontakt ein. In diesem Fall wäre eine Rekrutierung von VE-PTP durch VE-Cadherin an den Zellkontakt weiterhin nicht auszuschließen. Jedoch ist ein normales VE-Cadherin Expressionsniveau für die Aufrechterhaltung der VE-PTP Lokalisation am Zellkontakt entbehrlich. Andererseits ist denkbar, daß die restliche Menge VE-Cadherin, die trotz siRNA Behandlung noch exprimiert wurde, für die VE-PTP Lokalisation am Zellkontakt ausreicht.

Zur genaueren Addressierung der eventuellen Rekrutierung VE-PTPs an den Zellkontakt müßten VE-Cadherin-defiziente Endothelzellen auf die Lokalisation von VE-PTP hin untersucht werden. Zum Vergleich wären mit VE-Cadherin retransduzierte Zellen erforderlich. VE-Cadherin-defiziente Endothelioma werden gegenwärtig von Ruth Funke in der Arbeitsgruppe Vestweber hergestellt und charakterisiert.

#### **4.1.4 VE-Cadherin wird mit steigender Zelldichte Dephosphoryliert**

Eine Korrelation, welche der VE-PTP - VE-Cadherin Assoziation Bedeutung beimißt, ist die abnehmende Phosphorylierung von Bestandteilen der Adherens Junction mit steigender Zelldichte (Kapitel 3.1.2.2). Dies steht im Einklang mit dem allgemein akzeptierten Modell einer Stabilisierung des Zellkontaktes in konfluentem Endothel bei gleichzeitiger Abnahme der Phosphorylierung von Komponenten der AJ (Daniel & Reynolds, 1997) und der beobachteten verminderten Zellkontaktstabilität bei erhöhter Tyrosin-Phosphorylierung des Cadherin-Catenin Komplexes (Behrens *et al.*, 1993; Hoschuetzky *et al.*, 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht nur in Pervanadat-behandelten Zellen, sondern erstmalig auch in unbehandelten HUVEC eine verminderte VE-Cadherin Phosphorylierung bei hoher Dichte nachgewiesen. Das bestätigt die Ergebnisse von Lampugnani *et al.*, 1997, wobei dort ausschließlich mit Pervanadat-inhibierten Zellen gearbeitet wurde.

VE-PTP könnte als eine mit der Adherens Junction assoziierte Phosphatase die Dephosphorylierung von VE-Cadherin vermitteln und zu einer dichteabhängigen Stabilisierung des Zellkontaktes beitragen. Demgegenüber steht das Ergebnis in bEnd.3 Endothelioma. Native Zellen zeigen dort keine Veränderung der VE-Cadherin Phosphorylierung, dagegen kommt es nach Inhibition von PTPs mit Pervanadat zu einer *verstärkten* Phosphorylierung des Cadherins. Also ist die Situation in bEnd.3 und HUVEC genau umgekehrt. Wie bereits erwähnt, sind bEnd.3 Endothelioma zur Immortalisierung mit dem viralen "Polyoma - Middle T" Antigen transfiziert. "Middle T" interagiert *in-vitro* mit pp60<sup>src</sup>, deren Aktivität stimuliert wird, sowie mit Zellmembranen (Courtneidge & Smith, 1983). Der "Middle T"-pp60<sup>src</sup> Komplex enthält zusätzlich die Ser/Thr-Phosphatase PP2A, deren Funktion für die transformierende Wirkung benötigt wird (Glover *et al.*, 1999). Die transformierende Wirkung des Komplexes beruht auf der Imitation der Signale von Wachstumsfaktor-Rezeptoren über die Bindung von PI-3-Kinase und Shc (Dilworth, 1995). Wie in Kapitel 1.2.2 ausgeführt, sind diese Proteine auch an der Signalisierung durch VE-Cadherin beteiligt.

Die Ergebnisse an bEnd.3 sind dahingehend interpretierbar, daß mit steigender Zelldichte gleichzeitig Kinase- und Phosphataseaktivität an der Adherens Junction heraufreguliert wird. In nativen bEnd.3 antagonisieren sich beide in ihrer Wirkung auf VE-Cadherin, daher keine Änderung der Phosphorylierung. Nach Inhibition von Protein-Tyrosin Phosphatasen durch Pervanadat wäre die Zunahme der VE-Cadherin Phosphorylierung ein direktes Maß für die steigende Kinaseaktivität. Dies ist zwar verschieden von der Situation in HUVEC, jedoch durchaus verträglich mit der Beobachtung einer verstärkten Assoziation von VE-PTP und VE-Cadherin in bEnd.3.

In HUVEC, die nicht "Middle T" transfiziert sind, kommt es zu keiner ektoptischen Heraufregulierung von Kinaseaktivität an der Adherens Junction. Bei genauer Betrachtung der Daten aus Kapitel 3.1.2.2 fällt in nativen Zellen ein drastischer Unterschied der VE-Cadherin Phosphorylierung in subkonfluenten gegenüber konfluenten Zellen auf, in denen die Cadherin-Phosphorylierung praktisch nicht mehr nachweisbar ist. In Pervanadat-behandelten Zellen ist die Dephosphorylierung mit steigender Dichte weniger ausgeprägt. Da die Signale nach Inhibition von PTPs durch Pervanadat die Aktivität der verbleibenden Tyrosinkinase widerspiegeln, kann in HUVEC eine Abnahme von Kinaseaktivität bei steigender Zelldichte postuliert werden. Die verstärkte Aktivität einer Tyrosin-Phosphatase an der AJ würde zur abnehmenden Kinaseaktivität hinzuaddiert und die in nativen HUVECs bei konfluenten Zellen beobachtete drastisch verringerte Phosphorylierung von VE-Cadherin erklären. Die Abnahme der VE-Cadherin Phosphorylierung bei steigender Zelldichte könnte also auch in HUVEC direkt auf die Wirkung der verstärkt assoziierten Phosphatase VE-PTP zurückzuführen sein.

Neben der Regulierung der Phosphataseaktivität über deren Expression oder Bindung an ihr Substrat ist auch die Regulierung über stimulatorische und inhibitorische Moleküle denkbar. Natürliche Inhibitoren für RPTPs sind sowohl als Bindungspartner für die extrazelluläre Domäne beschrieben. Für RPTP  $\beta/\zeta$  ist Pleiotrophin als Ligand für die extrazelluläre Domäne beschrieben, der zu einer Inhibition der Phosphataseaktivität führt. Infolgedessen steigt die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin stark an. Die Bindung von Phosphatase und Catenin ist unabhängig von deren katalytischer Aktivität (Meng *et al.*, 2000). Inkubation von Jurkat T Zellen mit Galectin-1 führte zu einer verringerten Aktivität der RPTP CD45. Galectin-1 und CD45 sind ko-immunpräzipitierbar (Walzel *et al.*, 1999). Für CD45 wurde außerdem eine Aktivierung durch Bindung der intrazellulären Domäne an Spectrin und Fodrin nachgewiesen (Lokeshwar *et al.*, 1992).

Eine weitere interessante Option ist die Bildung eines "signalisierungskompetenten Komplexes" in der Adherens Junction konfluenten Endothelzellen. In dem Szenario würden mit steigender Zelldichte Komponenten von Signalkaskaden am Zellkontakt akkumuliert. Dieser, obwohl von hoher Festigkeit, wäre in der Lage, schnell auf exogene Reize zu reagieren. VE-PTP würde so beispielsweise die Phosphorylierung des VE-Cadherin-Komplexes, wie sie durch die Zugabe von aktivierten Neutrophilen zu Endothel beobachtet wurde, zügig nach erfolgter Transmigration wieder revertieren können (Tinsley *et al.*, 1999). In der Tat bewirkt die Stimulierung von Endothel mit Histamin nur in konfluenten Zellen eine spezifische Phosphorylierung von VE-Cadherin, verbunden mit einer Dissoziation des Cadherins vom Cytoskelett (Andriopoulou *et al.*, 1999). Konfluenz-abhängige Änderungen der Signaltransduktion sind für den VEGF-Signalweg in Kapitel 1.2.2 der Einleitung beschrieben.

#### **4.1.5 VE-PTP dephosphoryliert VE-Cadherin *in-vivo***

Zu Untersuchung der VE-PTP Funktion in kultivierten primären Endothelzellen (HUVEC) wurde die Expression des Proteines mittels siRNA verringert. Wie in Kapitel **3.1.3.1** gezeigt, läßt sich eine Inhibition der Phosphatase unter geeigneten Bedingungen bis zu 48 h nach Transfektion der Oligonukleotide aufrechterhalten. Wichtig ist in diesem Zusammenhang zu vermerken, daß weder die Expression von VE-Cadherin noch  $\beta$ -Catenin beeinträchtigt wird. Wie Eingangs erwähnt, kann eine veränderte Expression von  $\beta$ -Catenin die Zelladhäsion durch Veränderung der Expression des Cadherin-Catenin Komplexes beeinflussen (Bradley *et al.*, 1993; Hinck *et al.*, 1994). Daher sollten die beobachteten Effekte auf eine Involvierung der Struktur oder Funktion von VE-PTP zurückzuführen sein.

Das selektive Ausschalten von VE-PTP führt zu einer erhöhten Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin (Kapitel **3.1.3.2**). Um den Effekt nachweisen zu können, müssen möglichst konfluente HUVECs untersucht werden. siRNA von VE-PTP in HUVECs geringerer Dichte führt zu einer nur unwesentlich erhöhten VE-Cadherin Phosphorylierung (nicht gezeigte Daten). Der Befund kann im Zusammenhang mit der verstärkten VE-PTP - VE-Cadherin Assoziation bei hoher Zelldichte gesehen werden und argumentiert für eine funktionelle Interaktion beider Proteine mit steigender Konfluenz des Endothels.

Trotz einiger mit dem Cadherin-Catenin Komplex assoziierten PTPs (siehe Kapitel **1.3.2**) ist bislang keine direkte Dephosphorylierung eines Cadherins durch eine Protein-Tyrosin Phosphatase bekannt. Im überwiegenden Teil der Fälle ist  $\beta$ -Catenin das Substrat der Phosphatasen, allerdings bindet PTP $\mu$  als einzige RPTP über die cytoplasmatische Domäne direkt an E-Cadherin (Brady-Kalnay *et al.*, 1998).

Im vorliegenden Fall kann eine direkte Dephosphorylierung von VE-Cadherin durch VE-PTP vermutet werden. Jedoch besteht die Möglichkeit eines indirekten Effektes, der durch einen zwischengeschalteten VE-PTP Effektor vermittelt wird. In Betracht käme beispielsweise eine Kinase, die VE-Cadherin direkt phosphoryliert und durch VE-PTP negativ reguliert wird. Die verstärkte Assoziation von Src-Kinasen mit dem Cadherin-Catenin Komplex wurde in der Einleitung behandelt (Kapitel **1.4.1**). Src Kinasen können E-Cadherin und N-Cadherin, sowie assoziierte Catenine phosphorylieren (Behrens *et al.*, 1993; Hamaguchi *et al.*, 1993). Weiterhin wird die VEGF-abhängige Phosphorylierung von VE-Cadherin nicht direkt durch den VEGFR-2 geleistet, sondern durch Aktivierung von Src-Kinasen, die bevorzugt mit dem Rezeptor nach VEGF-Stimulierung assoziieren (Chou *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2003). Zudem wurde auch in der vorliegenden Arbeit eine Beteiligung von Kinasen der Src-Familie an der Phosphorylierung von VE-Cadherin gezeigt (Kapitel

**3.2.1.1**, siehe auch unten). Die Aktivität von Src-Kinasen selbst wird ebenfalls über die Phosphorylierung eines inhibitorischen Tyrosinrestes reguliert (Piwnica-Worms *et al.*, 1987), welches wiederum das Ziel der inhibitorischen Kinase Csk ist (Nada *et al.*, 1991). Csk wurde von Ulf Baumeister als Bindungspartner von VE-Cadherin identifiziert (Baumeister *et al.*, in Revision) und käme theoretisch als Substrat für VE-PTP in Betracht. Für CSK wurde bislang noch kein eindeutiger Regulationsmechanismus etabliert, der die Funktion einer Phosphatase benötigt.

### **4.1.6 Inhibition von VE-PTP erhöht die transendotheliale Migration von Neutrophilen**

Um die physiologische Bedeutung der VE-PTP in primären Endothelzellen zu untersuchen, wurden Versuche zur parazellulären Permeabilität und Transmigration von polymorphonukleären Neutrophilen unternommen. Dabei wurde nach Ausschalten von VE-PTP eine gegenüber den Kontrollen auf 160 % erhöhte Transmigration von Neutrophilen durch HUVEC-Zellschichten beobachtet (Kapitel **3.1.3.3**). Die Vorbehandlung nicht-transfizierter HUVECs mit einem die Funktion blockierenden Antikörper gegen VE-Cadherin (Corada *et al.*, 2001) führt zu einer Erhöhung der Transmigration auf über 200 %.

Während der Transmigration von Leukozyten wird VE-Cadherin vorübergehend aus dem Zellkontakt verdrängt, um der Zelle die parazelluläre Passage durch die Junction zu ermöglichen (Allport *et al.*, 1997; Shaw *et al.*, 2001). Diese Passage vollzieht sich schnell und bewirkt aufgrund des zügigen Wiederverschlusses der Junction unter physiologischen Bedingungen keine Erhöhung der parazellulären Permeabilität des Endothels (Muller, 2003). Allerdings erhöht sich durch die Injektion von Antikörpern gegen VE-Cadherin die Permeabilität einer endothelialen Zellschicht *in-vitro* und *in-vivo*, was mit der verstärkten Auswanderung von Leukozyten in periphere Gewebe verbunden ist (Gotsch *et al.*, 1997; Corada *et al.*, 1999). Dies läßt darauf schließen, daß eine feste Adherens Junction eine Barriere für die Migration von Neutrophilen darstellt. Die Lockerung der AJ durch Phosphorylierung ihrer Komponenten, vor allem VE-Cadherin, könnte die transiente Öffnung des Zellkontaktes und damit die Transmigration erleichtern.

So gesehen könnte VE-PTP eine Rolle bei der Transmigration durch einen Effekt auf VE-Cadherin zugeschrieben werden. Das Ausschalten der Phosphatase führt zur verstärkten VE-Cadherin Tyrosin-Phosphorylierung. Wie in Kapitel **1.4.1** ausführlich behandelt, ist die Erhöhung der vaskulären Permeabilität durch Zugabe exogener Substanzen mit der Phosphorylierung von AJ-Komponenten verbunden. Sofern der Anstieg der parazellulären

Permeabilität und die Transmigration von Leukozyten vergleichbare Vorgänge in Bezug auf den Zellkontakt darstellen, bekommt die Korrelation zwischen erhöhter VE-Cadherin Phosphorylierung und Transmigration nach VE-PTP "Knock-Down" Gültigkeit.

Die parazelluläre Permeabilität, welche meist durch Diffusion eines fluoreszierenden Farbstoffes durch die endotheliale Zellschicht gemessen wird, ist ein direktes Maß für die Stabilität des interendothelialen Kontaktes. Eine physikalische Destabilisierung der Zellen führt zu erhöhter Diffusion des Farbstoffes. Der im Transmigrationsversuch als Positivkontrolle eingesetzte VE-Cadherin Antikörper übt auch einen deutlichen Effekt auf die parazelluläre Permeabilität der Zellen aus (Kapitel 3.1.3.4). Insofern führt der gleiche Antikörper zu erhöhter Permeabilität und Transmigration, indem er endotheliale Junctions durch Bindung an die membranproximalste VE-Cadherin-Domäne destabilisiert (Corada *et al.*, 2001). Im Diffusionsversuch bewirkt die Inhibition von VE-PTP durch siRNA jedoch nur eine geringe Erhöhung der Permeabilität. Die Zugabe des Kontrollantikörpers hat einen ähnlichen Effekt wie die siRNA-Behandlung zur Folge, wodurch diese Versuche nicht zur Bewertung einer VE-PTP-abhängigen Änderung der endothelialen Barrierefunktion herangezogen werden können. Die Diffusion hochmolekularer Substanzen über eine HUVEC-Endothelzellschicht ist offenbar mit technischen Schwierigkeiten verbunden, die mit der Fragilität der Zellschicht, zumal nach Elektroporation mit siRNA Oligonukleotiden, zusammenhängen können. Transendotheliale Resistenz ist die geeignetere Größe zur Messung der parazellulären Diffusionsbarriere (Hans Schnittler, persönliche Mitteilung). Solche Messungen wurden versuchsweise unternommen, jedoch konnte bislang mit den eingesetzten Zellen kein Aufbau einer Resistenz erreicht werden.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie erhöhte die Inhibition von Protein-Tyrosin Phosphatasen mit Pervanadat die parazelluläre Permeabilität von Endothelzellen und führte zur verstärkten Transmigration von Neutrophilen. Dies ging mit einer starken Erhöhung der Tyrosin-Phosphorylierung, aber ohne den Zerfall des Cadherin-Catenin Komplexes einher (Young *et al.*, 2003). Dieses Ergebnis bekräftigt die Notwendigkeit von PTPs zur Aufrechterhaltung der endothelialen Barrierefunktion.

Alternativ könnte VE-PTP selbst als Adhäsionsmolekül agieren, das zur Stabilität des Zell-Zellkontaktes beiträgt oder als Interaktionspartner für Leukozyten dient. Die extrazelluläre Domäne von VE-PTP besteht aus 17 Fibronectin-III-Domänen und ist von beachtlicher Größe. Die homophile *trans*-Interaktion von RPTPs ist in einigen Fällen als zelladhäsionsfördernd beschrieben worden, speziell RPTP $\mu$  ist in dieser Hinsicht gut untersucht (Brady-Kalnay *et al.*, 1993; Brady-Kalnay & Tonks 1995). RPTP $\mu$  enthält allerdings eine Immunglobulin- sowie eine Meprin-ähnliche Domäne, welche kürzlich als

Vermittler der homophilen Interaktion der Phosphatase bestimmt wurden (Cismasiu *et al.*, 2004). Für Typ III RPTPs wie VE-PTP, denen solche Domänen fehlen, wurde bislang keine homophile Wechselwirkungen gezeigt.

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurden Zelladhäsions-Versuche mit 32D Leukozyten vorgenommen. Als Substrat dienten immobilisierte Fusionsproteine der extrazellulären Domäne, sowie auf COS-7 und CHO Zellen exprimierte VE-PTP. Die Versuche ließen jedoch auf keine VE-PTP-vermittelte Adhäsion von Leukozyten schließen (Daten nicht gezeigt). Im Falle einer Funktion von VE-PTP als Adhäsionsmolekül für Leukozyten müßte nach Inhibition der Expression der Phosphatase eine verminderte Transmigration von Neutrophilen postuliert werden, was dem beobachteten Effekt widerspräche.

Eine direkte Beteiligung von VE-PTP an der Leukozyten-Diapedese ist, trotz der beobachteten verstärkten Transmigration nach verminderter Expression des Moleküls durch siRNA, nicht belegt. Der gemessene Effekt könnte allein auf einer verringerten Stabilität der Adherens Junction durch die verminderte Aktivität der Phosphatase beruhen. Solch ein Mechanismus müßte aber nicht zwangsläufig vom Leukozyt bei der transendothelialen Migration aktiviert werden. Aufklärung in dieser Frage könnten Versuche in Anwesenheit von blockierenden Antikörpern gegen den extrazellulären Teil der Phosphatase bringen, welche die Transmigration von Leukozyten, nicht aber die Aktivität der Phosphatase zu inhibieren in der Lage wären. Dadurch könnte auf eine direkte Beteiligung des Moleküls am Vorgang der Transmigration geschlossen werden.

Denn die naheliegendste und attraktivste Erklärung für den VE-PTP-Effekt auf die Transmigration von Neutrophilen ist die leukozytenvermittelte Aktivierung der Phosphatase und dadurch bedingt die direkte oder indirekte Dephosphorylierung von VE-Cadherin verbunden mit der Destabilisierung des Zellkontaktes. Es besteht eine Korrelation zwischen der dichteabhängigen Umlagerung der Phosphatase in den endothelialen Zellkontakt, der verstärkten Assoziation von VE-PTP und VE-Cadherin mit steigender Zelldichte und der Abnahme der Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin in konfluenten HUVEC. Die Inhibition der Expression der Phosphatase in Endothelzellen hoher Dichte führt zu einem Anstieg der VE-Cadherin Phosphorylierung in HUVEC, verbunden mit einer erhöhten transendothelialen Migration von Neutrophilen. VE-PTP wird für die Aufrechterhaltung der Integrität der endothelialen Adherens Junction bei hoher Zelldichte benötigt.

Studien, die in der Arbeitsgruppe Vestweber durchgeführt wurden, bestätigen zudem die Notwendigkeit der katalytischen Domäne von VE-PTP für die Festigung des VE-Cadherin vermittelten Zell-Zellkontaktes. Nach Induktion einer katalytisch inaktiven Form der

Phosphatase in CHO Zellen, die VEGFR-2 und VE-Cadherin exprimieren, konnte kein Effekt auf die parazelluläre Permeabilität und Zell-Zell Aggregation gezeigt werden (A. Holtmann & S. Kloep, unveröffentlichte Daten). Für eine weitere Untersuchung der Beteiligung VE-PTPs an TEM von Leukozyten und Permeabilität werden gegenwärtig von Astrid Holtmann Endothelioma aus VE-PTP homozygot defizienten Mäusen isoliert und mit Wildtyp VE-PTP retransduziert. Zudem sind Permeabilitätsversuche unter Einsatz von Antikörpern gegen VE-PTP geplant.

### **4.2 VE-Cadherin ist ein Ziel der ICAM-1 Signalwege**

ICAM-1 ist ein für die Auswanderung von Leukozyten bedeutendes Zelladhäsionsmolekül der Immunglobulin-Superfamilie. Die Ligation von ICAM-1 durch Antikörper oder Zugabe von Leukozyten zu Endothel führt, wie in Kapitel 1.6 beschrieben, zur Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionswege, welche die Phosphorylierung von Komponenten des Cytoskelettes und dessen Reorganisierung zur Folge haben. Obgleich die direkte Beteiligung von ICAM-1 für die TEM von Leukozyten gut etabliert ist, konnten bislang keine Zellkontaktproteine als Ziele der ICAM-1 Signalwege gefunden werden. Dabei sind Proteine der endothelialen Junctions, die durch calciumabhängige- und Phosphorylierungsprozesse reguliert werden (Kapitel 1.4), offensichtliche Kandidaten für Ziele dieser Signalprozesse (Greenwood *et al.*, 2002).

Die Phosphorylierung von Komponenten der Adherens Junction mit ihrem zentralen Bestandteil VE-Cadherin hat Auswirkungen auf die Festigkeit des Zell-Zellkontaktes, der wiederum die Auswanderung von Leukozyten beeinflusst (Vestweber, 2000; Bazzoni & Dejana, 2004; die Ergebnisse dieser Arbeit). Mikroskopische Studien bestätigten die transiente Dissoziation der VE-Cadherin Homodimere am Zellkontakt während der Transmigration von Leukozyten durch eine endotheliale Zellschicht (Shaw *et al.*, 2001). Offenbar ist die dynamische Veränderung der VE-Cadherin Lokalisation für die Transmigration von Leukozyten erforderlich. Die Administration von VE-Cadherin Antikörpern *in-vivo* beschleunigt die Auswanderung von Neutrophilen in ein entzündetes Peritoneum (Gotsch *et al.*, 1997) und erhöht zudem auch die vaskuläre Permeabilität durch Dissoziation der Adherens Junction (Corada *et al.*, 1999 + 2001).

Da ICAM-1 der primäre Interaktionspartner von Leukozyten  $\beta_2$ -Integrinen ist, sollte die Ligation des Moleküls eine *bona fide* Simulation der Adhäsion von Leukozyten an das Endothel darstellen. Nach Ligation von ICAM-1 wurde keine Veränderung der endothelialen Permeabilität gefunden, was der physiologischen Situation bei der Transmigration von Leukozyten gleichkommt (van Buul *et al.*, 2002; Muller, 2003). In der gleichen Arbeit führte jedoch die antikörpervermittelte Ligation von VCAM-1, welches ebenfalls Bindungspartner

von Leukozyten  $\beta_2$ -Integrinen ist, zu erhöhter Permeabilität von Endothelzellen über die Bildung von ROS und fördert darüber hinaus die Bildung von interzellulären Lücken. Die Bildung von ROS nach Cytokinstimulierung kann wiederum die Phosphorylierung von VE-Cadherin und Komponenten der AJ bewirken (Nwariaku *et al.*, 2004).

Offenbar löst die Adhäsion von Leukozyten mehrere Vorgänge in der Zelle aus, die direkt oder indirekt Auswirkungen auf den endothelialen Zellkontakt haben können. Wenige davon sind gut verstanden. Deshalb sollte ein möglicher ICAM-1-abhängiger Effekt auf die Adherens Junction, speziell VE-Cadherin, untersucht werden.

### **4.2.1 Transiente VE-Cadherin Phosphorylierung durch ICAM-1 Ligation**

Wie in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben, führt die Quervernetzung von ICAM-1 auf bEnd.5 Endothelioma mit primären und sekundären Antikörpern zu einer kurzfristigen Erhöhung der Phosphorylierung von VE-Cadherin und zu geringerem Maße auch der Catenine. Die Quervernetzung eines anderen Oberflächenproteines, Endomucin, zeigt dagegen keinen Effekt auf die Phosphorylierung des Cadherin-Catenin Komplexes.

Dieses Ergebnis erlaubt die Betrachtung von VE-Cadherin als Ziel der ICAM-1 Signalwege. Die Kurzfristigkeit der Erhöhung der Phosphorylierung, welche nach 30 Minuten wieder auf Kontrollniveau zurückgeht, läßt den Vorgang für die Transmigration relevant erscheinen. Eine dauerhafte Erhöhung der VE-Cadherin Phosphorylierung wäre nicht mit der unveränderten Stabilität des Endothels bei der TEM von Leukozyten zu vereinbaren (van Buul *et al.*, 2002; Muller, 2003). Bei der TEM von Leukozyten handelt es sich ebenfalls um einen schnellen Prozeß, der innerhalb von Minuten abgeschlossen ist (Engelhardt & Wolburg, 2004). ICAM-1 besitzt keine intrinsische Kinaseaktivität, die zu einer Phosphorylierung von Proteinen führen könnte. Weiterhin ist der intrazelluläre Teil von ICAM-1 sowohl verantwortlich für die Transmigration von T-Zellen durch Endothel, als auch für die Aktivierung der Signaltransduktionswege in der Zelle (Greenwood *et al.*, 2003; Lyck *et al.*, 2003). Für die ICAM-1 vermittelte Phosphorylierung von VE-Cadherin kommen mehrere Mechanismen in Betracht :

1.) Die Aktivierung von Rho - GTPasen hat einen tiefgreifenden Umbau des Aktin-Cytoskelettes zur Folge, der über die Phosphorylierung der Cytoskelett-assoziierten Proteine p130Cas, FAK und Paxillin erreicht werden könnte (Etienne *et al.*, 1998). Quervernetzung von ICAM-1 führt in Rho - abhängiger Weise zur Bildung von Aktin-Stressfasern, und die Inhibition von Rho verhindert die Transmigration von Leukozyten (Adamson *et al.*, 1999; Strey *et al.*, 2002). Dennoch haben Rho - Proteine keinen Einfluß auf die Lokalisation von VE-Cadherin in Endothelzellen (Braga *et al.*, 1999). Rho -

GTPasen scheinen die Transmigration von Neutrophilen über den Umbau des Aktin - Cytoskelettes der Endothelzelle zu erleichtern, auf die Integrität der Adherens Junction haben sie offenbar keinen direkten Einfluß.

2.) Kinasen der Src Familie sind dagegen direkt an der Modulierung der Adherens Junction beteiligt. Für den E-Cadherin- und N-Cadherin - Catenin Komplex wurde durch Transfektion von Zellen mit viralem v-src Protoonkogen eine erhöhte Phosphorylierung des Komplexes demonstriert, welche mit verminderter Cadherin-abhängiger Adhäsion verbunden ist (Matsuyoshi *et al.*, 1992; Behrens *et al.*, 1993). Die Src-vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung des Komplexes *selbst* wurde als Ursache für die instabile Zell-Zell Adhäsion diskutiert (Hamaguchi *et al.*, 1993). Mikroskopische Studien an MDCK Zellen belegten zudem die Spezifität des Effektes von v-src für die Adherens Junction, welche nach Überexpression der Kinase beeinträchtigt wird. TJs und Desmosomen sind davon nicht betroffen. Der Effekt ist durch Inhibition von Tyrosinkinase revertierbar (Volberg *et al.*, 1992). Src-Kinasen vermitteln den Effekt des Wachstumsfaktors VEGF auf Endothel. VEGF, das auch Vaskulärer Permeabilitäts Faktor (VPF) genannt wird, erhöht die parazelluläre Permeabilität von Endothel und führt zur Phosphorylierung VE-Cadherins im Komplex mit  $\beta$ -Catenin (Esser *et al.*, 1998). *In-vivo* verhindert die Inhibition von Src den permeabilisierenden Effekt von VEGF auf die Vaskulatur. Dies ist über die transiente Destabilisierung eines Komplexes aus VEGFR-2, VE-Cadherin und  $\beta$ -Catenin nach VEGF-Stimulierung zu erklären. Die Phosphorylierung des Komplexes durch Src-Kinasen wurde als Ursache für die verminderte Integrität des endothelialen Zellkontaktes diskutiert (Weis *et al.*, 2004).

Mehrere Studien beschreiben die Aktivierung von Src nach Ligation von ICAM-1 (Durieu-Trautmann *et al.*, 1994; Etienne-Manneville *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003).

### **4.2.2 Inhibition von Src verhindert die ICAM-1 abhängige Phosphorylierung von VE-Cadherin**

Aufgrund der oben genannten Überlegungen wurde die Beteiligung von Src-Kinasen an der ICAM-1 vermittelten Phosphorylierung von VE-Cadherin mit Hilfe pharmakologischer Inhibitoren untersucht (Kapitel 3.2.1.2). Die Ergebnisse der Versuche legen eine Beteiligung von Src an der transienten Phosphorylierung von VE-Cadherin nach ICAM-1 Ligation nahe. Die Catenine sind nur mäßig von der Wirkung des Inhibitors betroffen, sie sind stark phosphoryliert als Assoziationspartner von VE-Cadherin sichtbar. VE-Cadherin ist somit das vierte bekannte Protein, das nach ICAM-1 Ligation Src-abhängig phosphoryliert wird neben Cortactin (Durieu-Trautmann *et al.*, 1994), Ezrin (Wang *et al.*, 2003) und p38 MAPK (Wang & Doerschuk, 2001).

Erstaunlich ist die Tatsache, daß keiner der alternativen Signaltransduktionswege, die nach ICAM-1 Quervernetzung aktiviert werden, den Effekt auf VE-Cadherin vermitteln können. Beschrieben sind die Freisetzung von intrazellulärem Calcium (Clayton *et al.*, 1998), Aktivierung von Rho (Adamson *et al.*, 1999), PKC (Etienne-Manneville *et al.*, 2000) und die Produktion von ROS (Wang & Doerschuk, 2000). In der Studie von Etienne-Manneville *et al.*, 2000 wurde die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  als Voraussetzung für die PKC $\alpha$ -vermittelte Aktivierung von p60<sup>src</sup> als letztem Glied der Signaltransduktionskette etabliert. Weitere Studien argumentieren ebenfalls für eine calciumabhängige Aktivierung der PKC $\alpha$ , die eine verminderte Integrität des endothelialen Zellkontaktes induziert, verbunden mit unterbrochener VE-Cadherin Lokalisierung am Kontakt (Sandoval *et al.*, 2001). Jedoch scheint p60<sup>src</sup> in Bezug auf VE-Cadherin der terminale Effektor der PKC $\alpha$  zu sein.

Reaktive Sauerstoffspezies wurden als Effektor der Rac-induzierten Herabsetzung der Zelladhäsion von HUVEC ermittelt. Die Induktion von konstitutiv aktiviertem Rac in der Zelle ist abhängig von Rho GTPasen und wird begleitet von der Bildung von Aktin-Stressfasern und dem Verlust VE-Cadherin vermittelter Zell-Zell Adhäsion. Damit einhergehend wurde die Phosphorylierung von  $\alpha$ -Catenin beobachtet. Trotzdem hat die Transduktion von HUVEC mit konstitutiv aktiviertem Rho keinen Effekt auf die VE-Cadherin Lokalisation und Zellkontaktintegrität, wohl aber auf das Aktin-Cytoskelett (van Wetering *et al.*, 2002). Obwohl Rho und Rac für die Etablierung und Kontrolle der E-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion in Epithelzellen erforderlich sind (Hordijk *et al.*, 1997; Braga *et al.*, 1997 + 1999), ist die funktionelle Verbindung von Rho und VE-Cadherin in Endothelzellen nicht klar. Trotz der dokumentierten Aktivierung von Rho und der Bildung von ROS nach ICAM-1 Ligation sind diese Mechanismen nicht in der Lage, die Funktion von Src - Kinasen zu ersetzen.

Allerdings muß darauf hingewiesen werden, daß auch bEnd.5 Endothelioma, die für die Versuche eingesetzt wurden, Polyoma "Middle T" transfiziert sind. Die möglichen Konsequenzen für die Aktivität von Src-Kinasen wurde in Kapitel 4.1.4 diskutiert. Daher ist das Ergebnis einer möglichen Funktion von Src bei der Regulierung der Stabilität der Adherens Junction während der Transmigration von Leukozyten kritisch zu betrachten. Vergleichbare Studien an Primärzellen wären erforderlich.

Die Phosphorylierung von VE-Cadherin könnte zu einer Auflockerung des Zell-Zellkontaktes führen und die parazelluläre Migration von Leukozyten durch Endothel erleichtern. Aufgrund der im Versuch beteiligten Antikörper, darunter YNI-1, sind Transmigrationsversuche nach ICAM-1 Quervernetzung jedoch nicht möglich. YNI-1 inhibiert die Transmigration von Leukozyten durch Blockierung der Bindung von LFA-1 an ICAM-1.

#### **4.2.3 Veränderte Assoziation von VE-PTP mit VE-Cadherin nach ICAM-1 Ligation**

Die ICAM-1 abhängige Phosphorylierung von VE-Cadherin ist transienter Natur. Sie ist im Zeitraum von 10 - 20 Minuten nach Quervernetzung mit primären und sekundären Antikörpern erhöht und geht dann auf Kontrollniveau zurück. Wie beschrieben sind sehr wahrscheinlich Src-Kinasen für die Phosphorylierung des Cadherins verantwortlich. Nicht ersichtlich ist hingegen der Mechanismus, welcher wieder zur Dephosphorylierung von VE-Cadherin führt. Aufgrund der Ergebnisse meiner Arbeit kann VE-PTP als Kandidaten-Phosphatase zur Regulierung des VE-Cadherin-vermittelten Zell-Zellkontaktes betrachtet werden. Daher wurde die Assoziation beider Proteine nach antikörpervermittelter ICAM-1 Ligation untersucht, um Aufschluß über eine mögliche Korrelation zwischen der Phosphorylierung von VE-Cadherin und Bindung an eine regulatorische Phosphatase zu erhalten.

Die Ergebnisse der Ko-Immünpräzipitationen (Kapitel **3.2.2**) zeigen eine verstärkte Assoziation unmittelbar nach der Inkubation der Zellen mit dem primären Antikörper. Zusätzliche Quervernetzung mit dem Sekundärantikörper bewirkt eine verbesserte Bindung beider Proteine, wobei der sekundäre Antikörper allein keinen Effekt hat. Hierfür gibt es zwei Möglichkeiten der Interpretation :

1.) Die Assoziation von VE-PTP und VE-Cadherin wird durch die Zugabe des Zweitantikörpers gestört, unabhängig von der Präsenz des primären Antikörpers. Dies würde den niedrigen Assoziationsgrad in der Sekundärantikörper-Kontrolle gegenüber der Primärantikörper-Kontrolle erklären. Keine Erklärung würde hingegen geboten für die verstärkte Bindung beider Proteine nach "Super Crosslink". In diesem Szenario wäre die Änderung der Bindung beider Moleküle ein Artefakt, welches auf die unspezifische Wirkung des quervernetzenden Zweitantikörpers zurückzuführen ist und in keinem Zusammenhang mit der transienten Phosphorylierung von VE-Cadherin steht.

2.) Die Kombination aus zwei gegen ICAM-1 gerichtete monoklonalen Antikörpern bewirkt bereits eine Quervernetzung der Moleküle auf der Zelloberfläche, und diese Quervernetzung führt zur verstärkten Assoziation von VE-PTP und VE-Cadherin. Die zusätzliche Ligation mit dem Sekundärantikörper verstärkt den Effekt deutlich. Die gesteigerte Bindung beider Proteine ist von kurzer Dauer, zum Zeitpunkt der maximalen Phosphorylierung von VE-Cadherin nach ICAM-1 Ligation ist sie wieder auf Kontrollniveau zurückgegangen.

Ein direkter Kontext zur Phosphorylierung von VE-Cadherin ist aus einem derartigen Verhalten nicht ersichtlich, da zum Zeitpunkt des Rückganges der VE-Cadherin Phosphorylierung keine verstärkte Bindung von VE-PTP meßbar ist. Über die Signifikanz der gesteigerten Assoziation von VE-PTP und VE-Cadherin nach Bindung von mAbs an

ICAM-1 herrscht Unklarheit. Es könnte sich um einen gänzlich unspezifischen Effekt handeln, der mit der Zugabe eines Antikörpers gegen ein Oberflächenantigen zusammenhängt. Zur Überprüfung wären Kontrollexperimente notwendig, in denen VE-PTP und VE-Cadherin nach Quervernetzung eines versuchsfremden Antigens, z. B. Endomucin, ko-immunpräzipitiert werden. Diese Kontrollen wurden wegen des erheblichen Bedarfes an Antikörpern für den Fall eines aussagekräftigen Experimentes zurückgestellt.

### **4.2.4 Permeabilitätsversuche nach ICAM-1 Quervernetzung**

Um Aufschluß über die Konsequenzen der ICAM-1 abhängigen VE-Cadherin Phosphorylierung für die Barrierefunktion des endothelialen Zellkontaktes zu erhalten, wurden Diffusionsversuche zur parazellulären Permeabilität durchgeführt (Kapitel **3.2.3**). Anhand der Kontrollen kann bezüglich des Effektes allerdings keine eindeutige Aussage getroffen werden. Schwankungen der Permeabilität sind durch Zugabe des primären Antikörpers selbst entstanden und möglicherweise kein ICAM-1 spezifischer Effekt. Die Ligation des Kontrollantigens Endomucin bewirkt ebenfalls eine leichte Abnahme der Permeabilität, hat aber keinen Effekt auf die Phosphorylierung von VE-Cadherin.

### ***4.3 Identifizierung eines neuen VE-PTP-interagierenden Proteines***

VE-PTP ist eine endothelspezifische Rezeptor Protein-Tyrosin Phosphatase, von deren Interaktionspartnern zur Zeit die ebenfalls endothelspezifischen Rezeptor Tyrosin-Kinasen TIE-2 und VE-Cadherin bekannt sind (Fachinger *et al.*, 1999; Nawroth *et al.*, 2002). Weiterhin gibt es Hinweise auf eine Interaktion mit N-Cadherin (B. August, persönliche Mitteilung). Jene Interaktionspartner lassen zusammen mit den Lokalisationsdaten der vorliegenden Arbeit auf eine spezifische Rolle im Endothel schließen. Zur weiteren Charakterisierung der biologischen Funktion der Phosphatase sollten auf biochemischem Wege interagierende Proteine isoliert werden.

Durch Pull-Down Experimente und anschließender massenspektrometrischer Identifizierung wurde in Endothelioma das *cis*-Golgi Protein GPP130 als Bindungspartner des cytoplasmatischen Teiles von VE-PTP gefunden (Kapitel **3.3.1**). Für dieses Protein sind bislang weder eine konkrete Funktion noch Interaktionspartner bekannt. GPP130 benötigt für seine Lokalisation im *cis*-Golgi einen sauren luminalen pH, bei neutralem pH erfolgt eine Umverteilung in die Endosomen (Linstedt *et al.*, 1997). Der Vorgang ist reversibel. Wird der normale pH wieder hergestellt, normalisiert sich auch die Verteilung von GPP130 in der Zelle (Puri *et al.*, 2002). Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit diskutiert die

Rolle des Proteines bei dem sogenannten "Bypass Pathway" von Proteinen, der eine endozytische Route von frühen Endosomen in den Golgi unter Umgehung von späten Endosomen / Lysosomen darstellt (Natarajan & Linstedt, 2004). Der "Bypass Pathway" wird vor allem von pflanzlichen und bakteriellen Toxinen als Weg in die Zelle genutzt.

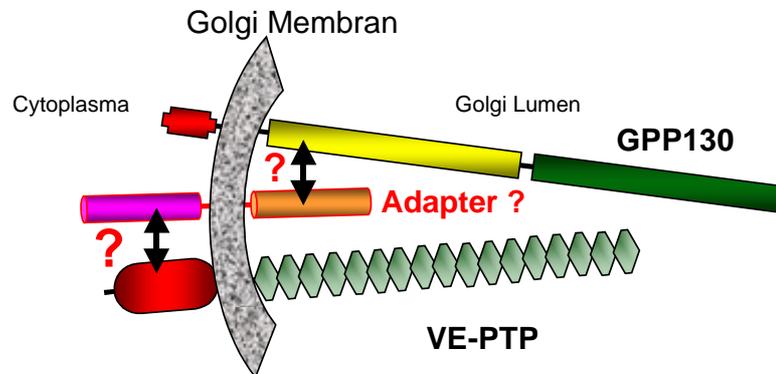
Die Pull-Down Experimente mit VE-PTP GST-Fusionsproteinen enthüllten einige ungewöhnliche Eigenschaften der GPP130 / VE-PTP Interaktion : GPP130 bindet ausschließlich an die native Phosphatasedomäne von VE-PTP, nicht an Aminosäure-Austauschmutanten im aktiven Zentrum der Phosphatase. Die eingesetzten Konstrukte mit einer R/A und C/S Substitution sind entsprechend der Situation bei PTP-1B als "Substrate Trapping" Mutanten für phosphorylierte Substrate entworfen worden (Flint *et al.*, 1997). Pervanadat-Vorbehandlung der Endothelioma, die als Material für die Pull-Downs dienen, führt zur starken Tyrosin-Phosphorylierung von zellulären Proteinen. Dies sollte die Interaktion, gerade mit den Austauschmutanten, erleichtern. Das Gegenteil ist für GPP130 der Fall, nach Pervanadatbehandlung geht die Interaktion mit VE-PTP verloren.

In Kapitel **3.3.1.2** wurde auf strukturelle Merkmale von GPP130 eingegangen. Ein für die Interaktion mit VE-PTP bedeutsamer Umstand ist die Tatsache, daß es sich um ein Typ-II Transmembranprotein handelt. Topologisch könnten in der Zelle nur die cytoplasmatischen Teile der Proteine miteinander interagieren. Diesen Teil repräsentiert bei GPP130 der N-Terminus, welcher 12 Aminosäuren umfaßt. Er enthält keine Tyrosin-Phosphorylierungsstellen, dennoch ist die Interaktion mit der PTP-Domäne Pervanadatsensitiv. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte ein hypothetisches Phosphoprotein sein, welches als Adapter die Bindung zwischen VE-PTP und GPP130 vermittelt. Die GST Pull-Down Experimente ergaben neben GPP130 weitere Kandidaten, die spezifisch mit der Wildtyp PTP-Domäne interagierten. Leider schlug die Sequenzierung der Proteine fehl.

Pull-Down Experimente mit *in-vitro* translatiertem GPP130 argumentieren ebenfalls für ein Adapterprotein, das die Bindung von GPP130 an VE-PTP vermittelt. Die in Kapitel **3.3.2.1** dargestellten Experimente demonstrieren die Notwendigkeit der Zugabe von endotheliale Zelllysate für eine erhöhte Spezifität der GPP130 Bindung an die native Phosphatasedomäne. Durch Ko-Immünpräzipitationsexperimente in transient transfizierten 293 A Zellen wurde deutlich, daß der kurze cytoplasmatische Teil von GPP130 für die Interaktion nicht erforderlich ist (Kapitel **3.3.2.2**). Folglich muß an der Interaktion der Golgi-luminale Teil von GPP130 beteiligt sein. Zusammen mit den Daten der GST Pull-Down Experimente könnte ein Adapterprotein vermutet werden, welches die Interaktion zwischen beiden Proteinen wie in **Abbildung 4.1** dargestellt vermittelt.

Nicht eingezeichnet ist die Möglichkeit einer direkten Interaktion zwischen den extrazellulären / Golgi-luminalen Domänen der Proteine, die ausschließlich im Golgi-Apparat der Zelle stattfinden könnte. Dagegen sprechen jedoch die Daten der GST Pull-

Down Experimente, welche die Rolle des cytoplasmatischen Teils von VE-PTP für die Interaktion bestätigen. Eine vergleichbare Interaktion zwischen einer RPTP und einem Typ-II Transmembranprotein ist nicht bekannt.



**Abbildung 4.1** : Schematische Darstellung der möglichen Interaktion zwischen GPP130 und VE-PTP über ein Adapterprotein.

Sie könnte einen bislang unbekanntem Mechanismus zur Regulierung der Aktivität von VE-PTP darstellen. Für die testisspezifische Ser/Thr-Phosphatase PP1 $\gamma$ 2 ist die Interaktion mit dem Chaperon GRP78 demonstriert worden. Dieses Protein aus der Familie der Hitzeschockproteine ist im Endoplasmatischen Reticulum lokalisiert und Teil des PP1 $\gamma$ 2 Holoenzym. Durch die Interaktion wird die Aktivität der Phosphatase stark erhöht (Chun *et al.*, 1994 + 1999). Für VE-PTP ist die Möglichkeit der Blockierung des aktiven Zentrums durch GPP130 ein attraktiver Regulationsmechanismus, der durch zwei Beobachtungen gestützt wird : GPP130 interagiert äußerst spezifisch mit der Wildtyp PTP-Domäne. Zwei unabhängige Austausche von nur einer Aminosäure im aktiven Zentrum verhindern die Interaktion vollständig. VE-PTP ist zudem in Zellen geringer Dichte in einem intrazellulären Kompartiment lokalisiert (Kapitel 3.1.1.2). Dort ist sie teilweise mit dem Golgi-Markerprotein Mannosidase II kolokalisierbar, ebenso mit EE1A, einem Markerprotein für frühe Endosomen (nicht gezeigt). In Kapitel 3.3.3 wird die Lokalisation von GPP130 und VE-PTP als Doppelfluoreszenz in HUVEC dargestellt. Auch dort ist eine teilweise Kolokalisation beider Proteine im Golgi-Apparat sichtbar. Dadurch kommt die Interaktion beider Proteine in der Zelle auch räumlich in Betracht.

Protein-Tyrosin Phosphatasen sind Enzyme mit hoher Aktivität. Die innerhalb der Zelle vorhandenen VE-PTP Moleküle sollten, sofern sich die Spezifität der Phosphatase nicht auf Zelloberflächenproteine beschränkt, an der unspezifischen Dephosphorylierung von Tyrosinen durch einen wirksamen Inhibitor gehindert werden. Die Regulierung der VE-PTP Aktivität über die Lokalisation, speziell durch Interaktion mit Partnerproteinen über die

extrazelluläre Domäne, ist bereits diskutiert worden (Nawroth *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu Assoziation mit VE-Cadherin, welches ein Substrat der Phosphatase ist, könnte die Interaktion mit GPP130 VE-PTP von anderen Proteinen fernhalten.

Die Bedeutung des intrazellulären Pools der Phosphatase ist unklar. Einerseits suggerieren die immunocytoologischen Daten eine Umverteilung von VE-PTP von einem intrazellulären Bereich an die Zelloberfläche im Zuge der Etablierung fester Zellkontakte mit steigender Konfluenz. Andererseits argumentiert die in der Durchflußcytometrie gemessene konstante Oberflächenexpression von VE-PTP auf Zellen jedes Dichtestadiums gegen eine solche Umverteilung. Möglicherweise existiert ein Mechanismus, der VE-PTP durch konstante Internalisierung und Rezyklierung an die Plasmamembran reguliert. Solche Mechanismen sind vor allem für die Regulierung von neuronalen Funktionen etabliert, wo beispielsweise die Dichte von Neurotransmitter-Rezeptoren an der Synapse durch verstärkte Endo- und Exocytose reguliert wird (Buckley *et al.*, 2000).

Ein solcher Mechanismus wäre ein Novum für Rezeptor Protein-Tyrosin Phosphatasen und könnte eine Möglichkeit bieten, schnelle Änderungen am Zellkontakt durch dynamische Phosphorylierung und Dephosphorylierung zu bewirken.

## 5. Literaturverzeichnis

- Aberle H, Schwartz H, Kemler R. *Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function*. J Cell Biochem. **1996** Jun 15;61(4):514-23
- Adamson P, Etienne S, Couraud PO, Calder V, Greenwood J. *Lymphocyte migration through brain endothelial cell monolayers involves signaling through endothelial ICAM-1 via a rho-dependent pathway*. J Immunol. **1999** Mar 1;162(5):2964-73
- Aicher B, Lerch MM, Muller T, Schilling J, Ullrich A. *Cellular redistribution of protein tyrosine phosphatases LAR and PTPsigma by inducible proteolytic processing*. J Cell Biol. **1997** Aug 11;138(3):681-96.
- Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newman PJ. *Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule*. J Cell Biol. **1991** Sep;114(5):1059-68.
- Allport JR, Ding H, Collins T, Gerritsen ME, Luscinskas FW. *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** Aug 18;186(4):517-27.
- Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T. *Protein tyrosine phosphatases in the human genome*. Cell. **2004** Jun 11;117(6):699-711. Related Articles, Anastasiadis PZ, Reynolds AB. *The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer*. J Cell Sci. **2000** Apr;113 ( Pt 8):1319-34.
- Anderson JM, Van Itallie CM. *Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability*. Am J Physiol. **1995** Oct;269(4 Pt 1):G467-75.
- Andriopoulou P, Navarro P, Zanetti A, Lampugnani MG, Dejana E. *Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. **1999** Oct;19(10):2286-97.
- Bachert C, Lee TH, Linstedt AD. *Luminal endosomal and Golgi-retrieval determinants involved in pH-sensitive targeting of an early Golgi protein*. Mol Biol Cell. **2001** Oct;12(10):3152-60.
- Balda MS, Whitney JA, Flores C, Gonzalez S, Cereijido M, Matter K. *Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein*. J Cell Biol. **1996** Aug;134(4):1031-49.
- Balsamo J, Leung T, Ernst H, Zanin MK, Hoffman S, Lilien J. *Regulated binding of PTP1B-like phosphatase to N-cadherin: control of cadherin-mediated adhesion by dephosphorylation of beta-catenin*. J Cell Biol. **1996** Aug;134(3):801-13.
- Balsamo J, Arregui C, Leung T, Lilien J. *The nonreceptor protein tyrosine phosphatase PTP1B binds to the cytoplasmic domain of N-cadherin and regulates the cadherin-actin linkage*. J Cell Biol. **1998** Oct 19;143(2):523-32.
- Bamforth SD, Kniessel U, Wolburg H, Engelhardt B, Risau W. *A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function*. J Cell Sci. **1999** Jun;112 ( Pt 12):1879-88.
- Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. *Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily*. J Biol Chem. **1999** Jan 8;274(2):584-94.
- Bardin N, Anfosso F, Masse JM, Cramer E, Sabatier F, Le Bivic A, Sampol J, Dignat-George F. *Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion*. Blood. **2001** Dec 15;98(13):3677-84.
- Barford D, Flint AJ, Tonks NK. *Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B*. Science. **1994** Mar 11;263(5152):1397-404.
- Barreiro O, Yanez-Mo M, Serrador JM, Montoya MC, Vicente-Manzanares M, Tejedor R, Furthmayr H, Sanchez-Madrid F. *Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes*. J Cell Biol. **2002** Jun 24;157(7):1233-45.
- Bazzoni G, Dejana E. *Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis*. Physiol Rev. **2004** Jul;84(3):869-901.
- Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Mueller F, Nelboeck P, Schmid G, Bartfai T, Dejana E, Brockhaus M. *Homophilic interaction of junctional adhesion molecule*. J Biol Chem. **2000** Oct 6;275(40):30970-6.
- Behrens J, Birchmeier W, Goodman SL, Imhof BA. *Dissociation of Madin-Darby canine kidney epithelial cells by the monoclonal antibody anti-arc-1: mechanistic aspects and identification of the antigen as a component related to uvomorulin*. J Cell Biol. **1985** Oct;101(4):1307-15.
- Behrens J, Vakaet L, Friis R, Winterhager E, Van Roy F, Mareel MM, Birchmeier W. *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** Feb;120(3):757-66.
- Ben-Ze'ev A, Geiger B. *Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer*. Curr Opin Cell Biol. **1998** Oct;10(5):629-39.
- Bienz M, Clevers H. *Linking colorectal cancer to Wnt signaling*. Cell. **2000** Oct 13;103(2):311-20.
- Bilwes AM, den Hertog J, Hunter T, Noel JP. *Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization*. Nature. **1996** Aug 8;382(6591):555-9.
- Bixel G, Kloep S, Butz S, Petri B, Engelhardt B, Vestweber D. *Mouse CD99 participates in T-cell recruitment into inflamed skin*. Blood. **2004** Jul 27

- Blake RA, Broome MA, Liu X, Wu J, Gishizky M, Sun L, Courtneidge SA. *SU6656, a selective src family kinase inhibitor, used to probe growth factor signaling.* Mol Cell Biol. **2000** Dec;20(23):9018-27.
- Bourdeau A, Dumont DJ, Letarte M. *A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia.* J Clin Invest. **1999** Nov;104(10):1343-51.
- Brachtendorf G, Kuhn A, Samulowitz U, Knorr R, Gustafsson E, Potocnik AJ, Fassler R, Vestweber D. *Early expression of endomucin on endothelium of the mouse embryo and on putative hematopoietic clusters in the dorsal aorta.* Dev Dyn. **2001** Nov;222(3):410-9.
- Bradley RS, Cowin P, Brown AM. *Expression of Wnt-1 in PC12 cells results in modulation of plakoglobin and E-cadherin and increased cellular adhesion.* J Cell Biol. **1993** Dec;123(6 Pt 2):1857-65.
- Brady-Kalnay SM, Flint AJ, Tonks NK. *Homophilic binding of PTP mu, a receptor-type protein tyrosine phosphatase, can mediate cell-cell aggregation.* J Cell Biol. **1993** Aug;122(4):961-72.
- Brady-Kalnay SM, Rimm DL, Tonks NK. *Receptor protein tyrosine phosphatase PTPmu associates with cadherins and catenins in vivo.* J Cell Biol. **1995** Aug;130(4):977-86.
- Brady-Kalnay SM, Tonks NK. *Protein tyrosine phosphatases as adhesion receptors.* Curr Opin Cell Biol. **1995** Oct;7(5):650-7.
- Brady-Kalnay SM, Mourton T, Nixon JP, Pietz GE, Kinch M, Chen H, Brackenbury R, Rimm DL, Del Vecchio RL, Tonks NK. *Dynamic interaction of PTPmu with multiple cadherins in vivo.* J Cell Biol. **1998** Apr 6;141(1):287-96.
- Brady-Kalnay SM *Ig superfamily phosphatases.* In : Ig superfamily molecules in the nervous system. Edited by Sonderegger P. Amsterdam, Netherlands: Harwood Academic Publishers; **1998**:133-159.
- Braga VM, Machesky LM, Hall A, Hotchin NA. *The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts.* J Cell Biol. **1997** Jun 16;137(6):1421-31.
- Braga VM, Del Maschio A, Machesky L, Dejana E. *Regulation of cadherin function by Rho and Rac: modulation by junction maturation and cellular context.* Mol Biol Cell. **1999** Jan;10(1):9-22.
- Breviario F, Caveda L, Corada M, Martin-Padura I, Navarro P, Golay J, Introna M, Gulino D, Lampugnani MG, Dejana E. *Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. **1995** Aug;15(8):1229-39.
- Buckley KM, Melikian HE, Provoda CJ, Waring MT. *Regulation of neuronal function by protein trafficking: a role for the endosomal pathway.* J Physiol. **2000** May 15;525 Pt 1:11-9.
- Burden-Gulley SM, Brady-Kalnay SM. *PTPmu regulates N-cadherin-dependent neurite outgrowth.* J Cell Biol. **1999** Mar 22;144(6):1323-36.
- Byon JC, Kusari AB, Kusari J. *Protein-tyrosine phosphatase-1B acts as a negative regulator of insulin signal transduction.* Mol Cell Biochem. **1998** May;182(1-2):101-8.
- Carman CV, Jun CD, Salas A, Springer TA. *Endothelial cells proactively form microvilli-like membrane projections upon intercellular adhesion molecule 1 engagement of leukocyte LFA-1.* J Immunol. **2003** Dec 1;171(11):6135-44.
- Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oostuyse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E. *Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis.* Cell. **1999** Jul 23;98(2):147-57.
- Caveda L, Martin-Padura I, Navarro P, Breviario F, Corada M, Gulino D, Lampugnani MG, Dejana E. *Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin).* J Clin Invest. **1996** Aug 15;98(4):886-93.
- Chappuis-Flament S, Wong E, Hicks LD, Kay CM, Gumbiner BM. *Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion.* J Cell Biol. **2001** Jul 9;154(1):231-43.
- Chen X, Kojima S, Borisy GG, Green KJ. *p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions.* J Cell Biol. **2003** Nov 10;163(3):547-57.
- Chou MT, Wang J, Fujita DJ. *Src kinase becomes preferentially associated with the VEGFR, KDR/Flk-1, following VEGF stimulation of vascular endothelial cells.* BMC Biochem. **2002** Dec 31;3(1):32. Print **2002** Dec 31.
- Chun YS, Shima H, Nagasaki K, Sugimura T, Nagao M. *PP1 gamma 2, a testis-specific protein-serine/threonine-phosphatase type 1 catalytic subunit, is associated with a protein having high sequence homology with the 78-kDa glucose-regulated protein, a member of the 70-kDa heat shock protein family.* Proc Natl Acad Sci U S A. **1994** Apr 12;91(8):3319-23.
- Chun YS, Park JW, Kim MS, Shima H, Nagao M, Lee SH, Park SW, Chung MH. *Role of the 78-kDa glucose-regulated protein as an activity modulator of protein phosphatase1gamma2.* Biochem Biophys Res Commun. **1999** Jun 7;259(2):300-4.
- Cismasiu VB, Denes SA, Reilander H, Michel H, Szedlacsek SE. *The MAM (mepri/A5-protein/PTPmu) domain is a homophilic binding site promoting the lateral dimerization of receptor-like protein-tyrosine phosphatase mu.* J Biol Chem. **2004** Jun 25;279(26):26922-31.
- Clayton A, Evans RA, Pettit E, Hallett M, Williams JD, Steadman R. *Cellular activation through the ligation of intercellular adhesion molecule-1.* J Cell Sci. **1998** Feb;111 ( Pt 4):443-53.
- Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C, Anderson JM. *Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells.* Am J Physiol Cell Physiol. **2002** Jul;283(1):C142-7.
- Colegio OR, Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM. *Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture.* Am J Physiol Cell Physiol. **2003** Jun;284(6):C1346-54.

- Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, Lampugnani MG, Martin-Padura I, Stoppacciaro A, Ruco L, McDonald DM, Ward PA, Dejana E. *Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A. **1999** Aug 17;96(17):9815-20.
- Corada M, Liao F, Lindgren M, Lampugnani MG, Breviario F, Frank R, Muller WA, Hicklin DJ, Bohlen P, Dejana E. *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** Mar 15;97(6):1679-84.
- Corada M, Zanetta L, Orsenigo F, Breviario F, Lampugnani MG, Bernasconi S, Liao F, Hicklin DJ, Bohlen P, Dejana E. *A monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin inhibits tumor angiogenesis without side effects on endothelial permeability*. Blood. **2002** Aug 1;100(3):905-11.
- Courtneidge SA, Smith AE. *Polyoma virus transforming protein associates with the product of the c-src cellular gene*. Nature. **1983** Jun 2-8;303(5916):435-9.
- Daniel JM, Reynolds AB. *Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function*. Bioessays. **1997** Oct;19(10):883-91.
- Daniel JM, Reynolds AB. *Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function*. Bioessays. **1997** Oct;19(10):883-91.
- Dejana E. *Endothelial cell-cell junctions: happy together*. Nat Rev Mol Cell Biol. **2004** Apr;5(4):261-70.
- Del Maschio A, Zanetti A, Corada M, Rival Y, Ruco L, Lampugnani MG, Dejana E. *Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions*. J Cell Biol. **1996** Oct;135(2):497-510.
- Del Maschio A, De Luigi A, Martin-Padura I, Brockhaus M, Bartfai T, Fruscella P, Adorini L, Martino G, Furlan R, De Simoni MG, Dejana E. *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** Nov 1;190(9):1351-6.
- Diamond MS, Staunton DE, de Fougères AR, Stacker SA, Garcia-Aguilar J, Hibbs ML, Springer TA. *ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18)*. J Cell Biol. **1990** Dec;111(6 Pt 2):3129-39.
- Dilworth SM. *Polyoma virus middle T antigen: meddler or mimic?* Trends Microbiol. **1995** Jan;3(1):31-5.
- Dumstrei K, Wang F, Shy D, Tepass U, Hartenstein V. *Interaction between EGFR signaling and DE-cadherin during nervous system morphogenesis*. Development. **2002** Sep;129(17):3983-94.
- Durieu-Trautmann O, Chaverot N, Cazaubon S, Strosberg AD, Couraud PO. *Intercellular adhesion molecule 1 activation induces tyrosine phosphorylation of the cytoskeleton-associated protein cortactin in brain microvessel endothelial cells*. J Biol Chem. **1994** Apr 29;269(17):12536-40.
- Dvorak AM, Kohn S, Morgan ES, Fox P, Nagy JA, Dvorak HF. *The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasation*. J Leukoc Biol. **1996** Jan;59(1):100-15.
- Ebnet K, Vestweber D. *Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines*. Histochem Cell Biol. **1999** Jul;112(1):1-23.
- Ebnet K, Schulz CU, Meyer Zu Brickwedde MK, Pendl GG, Vestweber D. *Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1*. J Biol Chem. **2000** Sep 8;275(36):27979-88.
- Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, Vestweber D. *Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions?* J Cell Sci. **2004** Jan 1;117(Pt 1):19-29.
- Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, Normandin D, Cheng A, Himms-Hagen J, Chan CC, Ramachandran C, Gresser MJ, Tremblay ML, Kennedy BP. *Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene*. Science. **1999** Mar 5;283(5407):1544-8.
- El-Hariry I, Pignatelli M, Lemoine NR. *FGF-1 and FGF-2 modulate the E-cadherin/catenin system in pancreatic adenocarcinoma cell lines*. Br J Cancer. **2001** Jun 15;84(12):1656-63.
- Engelhardt B, Wolburg H. *Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house?* Eur J Immunol. **2004** Nov;34(11):2955-63.
- Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. *Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells*. J Cell Sci. **1998** Jul;111 ( Pt 13):1853-65.
- Etienne S, Adamson P, Greenwood J, Strosberg AD, Cazaubon S, Couraud PO. *ICAM-1 signaling pathways associated with Rho activation in microvascular brain endothelial cells*. J Immunol. **1998** Nov 15;161(10):5755-61.
- Etienne-Manneville S, Manneville JB, Adamson P, Wilbourn B, Greenwood J, Couraud PO. *ICAM-1-coupled cytoskeletal rearrangements and transendothelial lymphocyte migration involve intracellular calcium signaling in brain endothelial cell lines*. J Immunol. **2000** Sep 15;165(6):3375-83.
- Fachinger G, Deutsch U, Risau W. *Functional interaction of vascular endothelial-protein-tyrosine phosphatase with the angiopoietin receptor Tie-2*. Oncogene. **1999** Oct 21;18(43):5948-53.
- Fanning AS, Anderson JM. *PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane*. J Clin Invest. **1999** Mar;103(6):767-72.
- Fanning AS, Ma TY, Anderson JM. *Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1*. FASEB J. **2002** Nov;16(13):1835-7.
- Flint AJ, Tiganis T, Barford D, Tonks NK. *Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases*. Proc Natl Acad Sci U S A. **1997** Mar 4;94(5):1680-5.

- Fuchs M, Muller T, Lerch MM, Ullrich A. Association of human protein-tyrosine phosphatase kappa with members of the armadillo family. *J Biol Chem.* **1996** Jul 12;271(28):16712-9.
- Fukata M, Nakagawa M, Itoh N, Kawajiri A, Yamaga M, Kuroda S, Kaibuchi K. Involvement of IQGAP1, an effector of Rac1 and Cdc42 GTPases, in cell-cell dissociation during cell scattering. *Mol Cell Biol.* **2001** Mar;21(6):2165-83.
- Fukuhara A, Irie K, Nakanishi H, Takekuni K, Kawakatsu T, Ikeda W, Yamada A, Katata T, Honda T, Sato T, Shimizu K, Ozaki H, Horiuchi H, Kita T, Takai Y. Involvement of nectin in the localization of junctional adhesion molecule at tight junctions. *Oncogene.* **2002** Oct 31;21(50):7642-55.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol.* **1993** Dec;123(6 Pt 2):1777-88.
- Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol.* **1998** Oct 19;143(2):391-401.
- Furuse M, Fujita, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol.* **1998b** Jun 29;141(7):1539-50.
- Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.* **2002** Mar 18;156(6):1099-111.
- Gaits F, Li RY, Ragab A, Ragab-Thomas JM, Chap H. Increase in receptor-like protein tyrosine phosphatase activity and expression level on density-dependent growth arrest of endothelial cells. *Biochem J.* **1995** Oct 1;311 ( Pt 1):97-103.
- Glover HR, Brewster CE, Dilworth SM. Association between src-kinases and the polyoma virus oncogene middle T-antigen requires PP2A and a specific sequence motif. *Oncogene.* **1999** Jul 29;18(30):4364-70.
- Gluzman Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell.* **1981** Jan;23(1):175-82.
- Golenhofen N, Ness W, Wawrousek EF, Drenckhahn D. Expression and induction of the stress protein alpha-B-crystallin in vascular endothelial cells. *Histochem Cell Biol.* **2002** Mar;117(3):203-9.
- Gotsch U, Borges E, Bosse R, Boggemeyer E, Simon M, Mossmann H, Vestweber D. VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci.* **1997** Mar;110 ( Pt 5):583-8.
- Gottardi CJ, Gumbiner BM. Distinct molecular forms of {beta}-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *J Cell Biol.* **2004** Oct 25;167(2):339-349.
- Gottardi CJ, Gumbiner BM. Role for ICAT in beta-catenin-dependent nuclear signaling and cadherin functions. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004b Apr;286(4):C747-56.
- Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol.* **2001** May 28;153(5):1049-60.
- Gottardi, C.J., C.M. Niessen, and B.M. Gumbiner. *The adherens junction.* Cell Adhesion. **2002.** Oxford University Press, Oxford, UK. 259–287
- Graesser D, Solowiej A, Bruckner M, Osterweil E, Juedes A, Davis S, Ruddle NH, Engelhardt B, Madri JA. Altered vascular permeability and early onset of experimental autoimmune encephalomyelitis in PECAM-1-deficient mice. *J Clin Invest.* **2002** Feb;109(3):383-92.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* **1977** Jul;36(1):59-74.
- Greenwood J, Etienne-Manneville S, Adamson P, Couraud PO. Lymphocyte migration into the central nervous system: implication of ICAM-1 signalling at the blood-brain barrier. *Vasc. Pharmac.* **2002** Jun;38(6):315-22.
- Greenwood J, Amos CL, Walters CE, Couraud PO, Lyck R, Engelhardt B, Adamson P. Intracellular domain of brain endothelial intercellular adhesion molecule-1 is essential for T lymphocyte-mediated signaling and migration. *J Immunol.* **2003** Aug 15;171(4):2099-108.
- Gumbiner B, Stevenson B, Grimaldi A. The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J Cell Biol.* **1988** Oct;107(4):1575-87.
- Gumbiner BM. Breaking through the tight junction barrier. *J Cell Biol.* **1993** Dec;123(6 Pt 2):1631-3.
- Guo M, Wu MH, Granger HJ, Yuan SY. Transference of recombinant VE-cadherin cytoplasmic domain alters endothelial junctional integrity and porcine microvasc. permeability. *J Physiol.* **2004** Jan 1;554(Pt 1):78-88.
- Hamaguchi M, Matsuyoshi N, Ohnishi Y, Gotoh B, Takeichi M, Nagai Y. p60v-src causes tyrosine phosphorylation and inactivation of the N-cadherin-catenin cell adhesion system. *EMBO J.* **1993** Jan;12(1):307-14.
- Heiska L, Alftan K, Gronholm M, Vilja P, Vaheri A, Carpen O. Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Biol Chem.* **1998** Aug 21;273(34):21893-900.
- Hinck L, Nelson WJ, Papkoff J. Wnt-1 modulates cell-cell adhesion in mammalian cells by stabilizing beta-catenin binding to the cell adhesion protein cadherin. *J Cell Biol.* **1994** Mar;124(5):729-41.
- Hixenbaugh EA, Goeckeler ZM, Papaiya NN, Wysolmerski RB, Silverstein SC, Huang AJ. Stimulated neutrophils induce myosin light chain phosphorylation and isometric tension in endothelial cells. *Am J Physiol.* **1997** Aug;273(2 Pt 2):H981-8.
- Ho YD, Joyal JL, Li Z, Sacks DB. IQGAP1 integrates Ca<sup>2+</sup>/calmodulin and Cdc42 signaling. *J Biol Chem.* **1999** Jan 1;274(1):464-70.
- Hof P, Pluskey S, Dhe-Paganon S, Eck MJ, Shoelson SE. Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell.* **1998** Feb 20;92(4):441-50.

- Hoffmann KM, Tonks NK, Barford D. *The crystal structure of domain 1 of receptor protein-tyrosine phosphatase mu.* J Biol Chem. **1997** Oct 31;272(44):27505-8.
- Hordijk PL, ten Klooster JP, van der Kammen RA, Michiels F, Oomen LC, Collard JG. *Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling.* Science. **1997** Nov 21;278(5342):1464-6.
- Hoschuetzky H, Aberle H, Kemler R. *Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor.* J Cell Biol. **1994** Dec;127(5):1375-80.
- Huang AJ, Manning JE, Bandak TM, Ratau MC, Hanser KR, Silverstein SC. *Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells.* J Cell Biol. **1993** Mar;120(6):1371-80.
- Hynes RO. *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.* Cell. **2002** Sep 20;110(6):673-87.
- Ilan N, Mahooti S, Rimm DL, Madri JA. *PECAM-1 (CD31) functions as a reservoir for and a modulator of tyrosine-phosphorylated beta-catenin.* J Cell Sci. **1999** Sep;112 Pt 18:3005-14.
- Ilan N, Cheung L, Pinter E, Madri JA. *Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31), a scaffolding molecule for selected catenin family members whose binding is mediated by different tyrosine and serine/threonine phosphorylation.* J Biol Chem. **2000** Jul 14;275(28):21435-43.
- Ilan N, Cheung L, Pinter E, Madri JA. *Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31), a scaffolding molecule for selected catenin family members whose binding is mediated by different tyrosine and serine/threonine phosphorylation.* J Biol Chem. **2000** Jul 14;275(28):21435-43.
- Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, Tsukita S. *Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments.* J Cell Biol. **1997** Jul 14;138(1):181-92.
- Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Ozaki H, Kita T, Tsukita S. *Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions.* J Cell Biol. **2001** Aug 6;154(3):491-7.
- Jiang G, den Hertog J, Su J, Noel J, Sap J, Hunter T. *Dimerization inhibits the activity of receptor-like protein-tyrosine phosphatase-alpha.* Nature. **1999** Oct 7;401(6753):606-10.
- Jiang G, den Hertog J, Hunter T. *Receptor-like protein tyrosine phosphatase alpha homodimerizes on the cell surface.* Mol Cell Biol. **2000** Aug;20(16):5917-29.
- Johnson KG, Van Vactor D. *Receptor protein tyrosine phosphatases in nervous system development.* Physiol Rev. **2003** Jan;83(1):1-24.
- Kemler R. *From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion.* Trends Genet. **1993** Sep;9(9):317-21.
- Klaman LD, Boss O, Peroni OD, Kim JK, Martino JL, Zabolotny JM, Moghal N, Lubkin M, Kim YB, Sharpe AH, Stricker-Krongrad A, Shulman GI, Neel BG, Kahn BB. *Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice.* Mol Cell Biol. **2000** Aug;20(15):5479-89.
- Korswagen HC, Herman MA, Clevers HC. *Distinct beta-catenins mediate adhesion and signalling functions in C. elegans.* Nature. **2000** Aug 3;406(6795):527-32.
- Krueger NX, Streuli M, Saito H. *Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases.* EMBO J. **1990** Oct;9(10):3241-52.
- Kubota K, Furuse M, Sasaki H, Sonoda N, Fujita K, Nagafuchi A, Tsukita S. *Ca(2+)-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions.* Curr Biol. **1999** Sep 23;9(18):1035-8.
- Kuroda S, Fukata M, Nakagawa M, Fujii K, Nakamura T, Ookubo T, Izawa I, Nagase T, Nomura N, Tani H, Shoji I, Matsuura Y, Yonehara S, Kaibuchi K. *Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion.* Science. **1998** Aug 7;281(5378):832-5.
- Kypta RM, Su H, Reichardt LF. *Association between a transmembrane protein tyrosine phosphatase and the cadherin-catenin complex.* J Cell Biol. **1996** Sep;134(6):1519-29.
- Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, Ruco L, Dejana E. *A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts.* J Cell Biol. **1992** Sep;118(6):1511-22.
- Lampugnani MG, Corada M, Caveda L, Breviario F, Ayalon O, Geiger B, Dejana E. *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** Apr;129(1):203-17.
- Lampugnani MG, Corada M, Andriopoulou P, Esser S, Risau W, Dejana E. *Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells.* J Cell Sci. **1997** Sep;110 ( Pt 17):2065-77.
- Lampugnani MG, Dejana E. *Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles.* Curr Opin Cell Biol. **1997** Oct;9(5):674-82.
- Lampugnani MG, Zanetti A, Breviario F, Balconi G, Orsenigo F, Corada M, Spagnuolo R, Betson M, Braga V, Dejana E. *VE-cadherin regulates endothelial actin activating Rac and increasing membrane association of Tiam.* Mol Biol Cell. **2002** Apr;13(4):1175-89.
- Grazia Lampugnani M, Zanetti A, Corada M, Takahashi T, Balconi G, Breviario F, Orsenigo F, Cattelino A, Kemler R, Daniel TO, Dejana E. *Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148.* J Cell Biol. **2003** May 26;161(4):793-804.
- Laposata M, Dvornarsky DK, Shin HS. *Thrombin-induced gap formation in confluent endothelial cell monolayers in vitro.* Blood. **1983** Sep;62(3):549-56.
- Laudanna C, Kim JY, Constantini G, Butcher E. *Rapid leukocyte integrin activation by chemokines.* Immunol Rev. **2002** Aug;186:37-46.

- Li L, Dixon JE. *Form, function, and regulation of protein tyrosine phosphatases and their involvement in human diseases*. Semin Immunol. **2000** Feb;12(1):75-84.
- Liang TW, DeMarco RA, Mrsny RJ, Gurney A, Gray A, Hooley J, Aaron HL, Huang A, Klassen T, Tumas DB, Fong S. *Characterization of huJAM: evidence for involvement in cell-cell contact and tight junction regulation*. Am J Physiol Cell Physiol. **2000** Dec;279(6):C1733-43.
- Liao F, Doody JF, Overholser J, Finnerty B, Bassi R, Wu Y, Dejana E, Kussie P, Bohlen P, Hicklin DJ. *Selective targeting of angiogenic tumor vasculature by vascular endothelial-cadherin antibody inhibits tumor growth without affecting vascular permeability*. Cancer Res. **2002** May 1;62(9):2567-75.
- Liebner S, Gerhardt H, Wolburg H. *Differential expression of endothelial beta-catenin and plakoglobin during development and maturation of the blood-brain and blood-retina barrier in the chicken*. Dev Dyn. **2000** Jan;217(1):86-98.
- Lin MT, Yen ML, Lin CY, Kuo ML. *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by resveratrol through interruption of Src-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation*. Mol Pharmacol. **2003** Nov;64(5):1029-36.
- Linstedt AD, Mehta A, Suhan J, Reggio H, Hauri HP. *Sequence and overexpression of GPP130/GIMPC: evidence for saturable pH-sensitive targeting of a type II early Golgi membrane protein*. Mol Biol Cell. **1997** Jun;8(6):1073-87.
- Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M, Parkos CA. *Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia*. J Cell Sci. **2000** Jul;113 ( Pt 13):2363-74.
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. *Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism*. Cell. **2002** Mar 22;108(6):837-47.
- Lokeshwar VB, Bourguignon LY. *Tyrosine phosphatase activity of lymphoma CD45 (GP180) is regulated by a direct interaction with the cytoskeleton*. J Biol Chem. **1992** Oct 25;267(30):21551-7.
- Lorenz P, Vecile E, Nardon E, Ferrero E, Tedesco F, Dobrina A. *Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors*. J Cell Biol. **1998** Sep 7;142(5):1381-91.
- Lu TT, Barreuther M, Davis S, Madri JA. *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 is phosphorylatable by c-Src, binds Src-Src homology 2 domain, and exhibits immunoreceptor tyrosine-based activation motif-like properties*. J Biol Chem. **1997** May 30;272(22):14442-6.
- Luscinskas FW, Ma S, Nusrat A, Parkos CA, Shaw SK. *Leukocyte transendothelial migration: a junctional affair*. Semin Immunol. **2002** Apr;14(2):105-13.
- Lyck R, Reiss Y, Gerwin N, Greenwood J, Adamson P, Engelhardt B. *T-cell interaction with ICAM-1/ICAM-2 double-deficient brain endothelium in vitro: the cytoplasmic tail of endothelial ICAM-1 is necessary for transendothelial migration of T cells*. Blood. **2003** Nov 15;102(10):3675-83.
- Maeda N, Noda M. *Involvement of receptor-like protein tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta and its ligand pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) in neuronal migration*. J Cell Biol. **1998** Jul 13;142(1):203-16.
- Majeti R, Xu Z, Parslow TG, Olson JL, Daikh DI, Killeen N, Weiss A. *An inactivating point mutation in the inhibitory wedge of CD45 causes lymphoproliferation and autoimmunity*. Cell. **2000** Dec 22;103(7):1059-70.
- Mantovani A. *The chemokine system: redundancy for robust outputs*. Immunol Today. **1999** Jun;20(6):254-7.
- Marlin SD, Springer TA. *Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1)*. Cell. **1987** Dec 4;51(5):813-9.
- Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. *Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration*. J Cell Biol. **1998** Jul 13;142(1):117-27.
- Matsuyoshi N, Hamaguchi M, Taniguchi S, Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi M. *Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts*. J Cell Biol. **1992** Aug;118(3):703-14.
- McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, Furuse M, Tsukita S, Rogers RA, Lynch RD, Schneeberger EE. *Occludin is a functional component of the tight junction*. J Cell Sci. **1996** Sep;109 ( Pt 9):2287-98.
- McCarthy KM, Francis SA, McCormack JM, Lai J, Rogers RA, Skare IB, Lynch RD, Schneeberger EE. *Inducible expression of claudin-1-myc but not occludin-VSV-G results in aberrant tight junction strand formation in MDCK cells*. J Cell Sci. **2000** Oct;113 Pt 19:3387-98.
- Meng K, Rodriguez-Pena A, Dimitrov T, Chen W, Yamin M, Noda M, Deuel TF. *Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta-catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta*. Proc Natl Acad Sci USA. **2000** Mar 14;97(6):2603-8.
- Milev P, Friedlander DR, Sakurai T, Karthikeyan L, Flad M, Margolis RK, Grumet M, Margolis RU. *Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules*. J Cell Biol. **1994** Dec;127(6 Pt 1):1703-15.
- Millauer B, Witzigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A. *High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis*. Cell. **1993** Mar 26;72(6):835-46.
- Miravet S, Piedra J, Miro F, Itarte E, Garcia de Herreros A, Dunach M. *The transcriptional factor Tcf-4 contains different binding sites for beta-catenin and plakoglobin*. J Biol Chem. **2002** Jan 18;277(3):1884-91.

- Moll T, Dejana E, Vestweber D. *In vitro degradation of endothelial catenins by a neutrophil protease*. J Cell Biol. **1998** Jan 26;140(2):403-7.
- Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. *Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands*. Proc Natl Acad Sci U S A. **1999** Jan 19;96(2):511-6.
- Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. *Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells*. J Cell Biol. **1999b** Oct 4;147(1):185-94.
- Morita K, Sasaki H, Fujimoto K, Furuse M, Tsukita S. *Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis*. J Cell Biol. **1999c** May 3;145(3):579-88.
- Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. *PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes*. J Exp Med. **1993** Aug 1;178(2):449-60.
- Muller T, Choidas A, Reichmann E, Ullrich A. *Phosphorylation and free pool of beta-catenin are regulated by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration*. J Biol Chem. **1999** Apr 9;274(15):10173-83.
- Muller WA. *Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response*. Trends Immunol. **2003** Jun;24(6):327-34.
- Mustelin T, Feng GS, Bottini N, Alonso A, Kholod N, Birle D, Merlo J, Huynh H. *Protein tyrosine phosphatases*. Front Biosci. **2002** Jan 01;7:d85-142.
- Mustelin T, Abraham RT, Rudd CE, Alonso A, Merlo JJ. *Protein tyrosine phosphorylation in T cell signaling*. Front Biosci. **2002b** Apr 01;7:d918-69.
- Nada S, Okada M, MacAuley A, Cooper JA, Nakagawa H. *Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src*. Nature. **1991** May 2;351(6321):69-72.
- Nakagawa M, Fukata M, Yamaga M, Itoh N, Kaibuchi K. *Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites*. J Cell Sci. **2001** May;114(Pt 10):1829-38.
- Nam HJ, Poy F, Krueger NX, Saito H, Frederick CA. *Crystal structure of the tandem phosphatase domains of RPTP LAR*. Cell. **1999** May 14;97(4):449-57.
- Nasdala I, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H, Kuhn A, Ebnet K, Brachtendorf G, Samulowitz U, Kuster B, Engelhardt B, Vestweber D, Butz S. *A transmembrane tight junction protein selectively expressed on endothelial cells and platelets*. J Biol Chem. **2002** May 3;277(18):16294-303.
- Natarajan R, Linstedt AD. *A cycling cis-Golgi protein mediates endosome-to-Golgi traffic*. Mol Biol Cell. **2004** Nov;15(11):4798-806.
- Navarro P, Caveda L, Breviario F, Mandoteanu I, Lampugnani MG, Dejana E. *Catenin-dependent and -independent functions of vascular endothelial cadherin*. J Biol Chem. **1995** Dec 29;270(52):30965-72.
- Navarro P, Ruco L, Dejana E. *Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization*. J Cell Biol. **1998** Mar 23;140(6):1475-84.
- Nawroth R, Poell G, Ranft A, Kloep S, Samulowitz U, Fachinger G, Golding M, Shima DT, Deutsch U, Vestweber D. *VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts*. EMBO J. **2002** Sep 16;21(18):4885-95.
- Neel BG, Tonks NK. *Protein tyrosine phosphatases in signal transduction*. Curr Opin Cell Biol. **1997** Apr;9(2):193-204.
- Newman PJ. *The biology of PECAM-1*. J Clin Invest. **1997** Jan 1;99(1):3-8.
- Newman PJ. *Switched at birth: a new family for PECAM-1*. J Clin Invest. **1999** Jan;103(1):5-9.
- Nobes CD, Hall A. *Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia*. Cell. **1995** Apr 7;81(1):53-62.
- Novak A, Dedhar S. *Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf*. Cell Mol Life Sci. **1999** Oct 30;56(5-6):523-37.
- Nusrat A, Giry M, Turner JR, Colgan SP, Parkos CA, Carnes D, Lemichez E, Boquet P, Madara JL. *Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia*. Proc Natl Acad Sci U S A. **1995** Nov 7;92(23):10629-33.
- Nwariaku FE, Liu Z, Zhu X, Nahari D, Ingle C, Wu RF, Gu Y, Sarosi G, Terada LS. *NADPH oxidase mediates vascular endothelial cadherin phosphorylation and endothelial dysfunction*. Blood. **2004** Nov 15;104(10):3214-20.
- O'Grady P, Thai TC, Saito H. *The laminin-nidogen complex is a ligand for a specific splice isoform of the transmembrane protein tyrosine phosphatase LAR*. J Cell Biol. **1998** Jun 29;141(7):1675-84.
- Oh ES, Gu H, Saxton TM, Timms JF, Hausdorff S, Frevert EU, Kahn BB, Pawson T, Neel BG, Thomas SM. *Regulation of early events in integrin signaling by protein tyrosine phosphatase SHP-2*. Mol Cell Biol. **1999** Apr;19(4):3205-15.
- Osawa M, Masuda M, Kusano K, Fujiwara K. *Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cell mechanosignal transduction: is it a mechanoresponsive molecule?* J Cell Biol. **2002** Aug 19;158(4):773-85.
- Ostermann G, Weber KS, Zerneck A, Schroder A, Weber C. *JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes*. Nat Immunol. **2002** Feb;3(2):151-8.
- Ostman A, Yang Q, Tonks NK. *Expression of DEP-1, a receptor-like protein-tyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell density*. Proc Natl Acad Sci U S A. **1994** Oct 11;91(21):9680-4.
- Panes J, Granger DN. *Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease*. Gastroenterology. **1998** May;114(5):1066-90.
- Patel KD, Cuvelier SL, Wiehler S. *Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment*. Semin Immunol. **2002** Apr;14(2):73-81.

- Pei D, Lorenz U, Klingmuller U, Neel BG, Walsh CT. *Intramolecular regulation of protein tyrosine phosphatase SH-PTP1: a new function for Src homology 2 domains*. *Biochemistry*. **1994** Dec 27;33(51):15483-93.
- Peles E, Nativ M, Campbell PL, Sakurai T, Martinez R, Lev S, Clary DO, Schilling J, Barnea G, Plowman GD, et al. *The carbonic anhydrase domain of receptor tyrosine phosphatase beta is a functional ligand for the axonal cell recognition molecule contactin*. *Cell*. **1995** Jul 28;82(2):251-60.
- Perkins LA, Larsen I, Perrimon N. *corkscrew encodes a putative protein tyrosine phosphatase that functions to transduce the terminal signal from the receptor tyrosine kinase torso*. *Cell*. **1992** Jul 24;70(2):225-36.
- Pertz O, Bozic D, Koch AW, Fauser C, Brancaccio A, Engel J. *A new crystal structure, Ca<sup>2+</sup> dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation*. *EMBO J*. **1999** Apr 1;18(7):1738-47.
- Pfau S, Leitenberg D, Rinder H, Smith BR, Pardi R, Bender JR. *Lymphocyte adhesion-dependent calcium signaling in human endothelial cells*. *J Cell Biol*. **1995** Mar;128(5):969-78.
- Piali L, Hammel P, Uherek C, Bachmann F, Gisler R, Dunon D, Imhof BA. *CD31/PECAM-1 is a ligand for alpha v beta 3 integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium*. *J Cell Biol*. **1995** Jul;130(2):451-60.
- Piwonica-Worms H, Saunders KB, Roberts TM, Smith AE, Cheng SH. *Tyrosine phosphorylation regulates the biochemical and biological properties of pp60c-src*. *Cell*. **1987** Apr 10;49(1):75-82.
- Pluskey S, Wandless TJ, Walsh CT, Shoelson SE. *Potent stimulation of SH-PTP2 phosphatase activity by simultaneous occupancy of both SH2 domains*. *J Biol Chem*. **1995** Feb 17;270(7):2897-900.
- Pluskota E, Chen Y, D'Souza SE. *Src homology domain 2-containing tyrosine phosphatase 2 associates with intercellular adhesion molecule 1 to regulate cell survival*. *J Biol Chem*. **2000** Sep 29;275(39):30029-36.
- Polakis P. *Wnt signaling and cancer*. *Genes Dev*. **2000** Aug 1;14(15):1837-51.
- Puri S, Bachert C, Fimmel CJ, Linstedt AD. *Cycling of early Golgi proteins via the cell surface and endosomes upon luminal pH disruption*. *Traffic* **2002** Sep;3(9):641-53
- Qu CK, Yu WM, Azzarelli B, Feng G. *Genetic evidence that Shp-2 tyrosine phosphatase is a signal enhancer of the epidermal growth factor receptor in mammals*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1999** Jul 20;96(15):8528-33.
- Rabiet MJ, Plantier JL, Rival Y, Genoux Y, Lampugnani MG, Dejana E. *Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **1996** Mar;16(3):488-96.
- Rahimi N, Kazlauskas A. *A role for cadherin-5 in regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 activity in endothelial cells*. *Mol Biol Cell*. **1999** Oct;10(10):3401-7.
- Ravetch JV, Lanier LL. *Immune inhibitory receptors*. *Science*. **2000** Oct 6;290(5489):84-9.
- Ridley AJ. *Rho family proteins: coordinating cell responses*. *Trends Cell Biol*. **2001** Dec;11(12):471-7.
- Risau W. *Mechanisms of angiogenesis*. *Nature*. **1997** Apr 17;386(6626):671-4.
- Roebuck KA, Finnegan A. *Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression*. *J Leukoc Biol*. **1999** Dec;66(6):876-88.
- Rotrosen D, Gallin JI. *Histamine type I receptor occupancy increases endothelial cytosolic calcium, reduces F-actin, and promotes albumin diffusion across cultured endothelial monolayers*. *J Cell Biol*. **1986** Dec;103(6 Pt 1):2379-87.
- Roura S, Miravet S, Piedra J, Garcia de Herreros A, Dunach M. *Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation*. *J Biol Chem*. **1999** Dec 17;274(51):36734-40.
- Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T, Tsukita S. *Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions*. *J Cell Biol*. **1998** Apr 20;141(2):397-408.
- Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S. *Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands*. *Mol Biol Cell*. **2000** Dec;11(12):4131-42.
- Samulowitz U, Kuhn A, Brachtendorf G, Nawroth R, Braun A, Bankfalvi A, Bocker W, Vestweber D. *Human endomucin: distribution pattern, expression on high endothelial venules, and decoration with the MECA-79 epitope*. *Am J Pathol*. **2002** May;160(5):1669-81.
- Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, van der Kammen RA, Collard JG. *Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior*. *J Cell Biol*. **1999** Nov 29;147(5):1009-22.
- Sandoval R, Malik AB, Minshall RD, Kouklis P, Ellis CA, Tiruppathi C. *Ca(2+) signalling and PKCalpha activate increased endothelial permeability by disassembly of VE-cadherin junctions*. *J Physiol*. **2001** Jun 1;533(Pt 2):433-45.
- Sastry SK, Burridge K. *Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics*. *Exp Cell Res*. **2000** Nov 25;261(1):25-36.
- Saxton TM, Henkemeyer M, Gasca S, Shen R, Rossi DJ, Shalaby F, Feng GS, Pawson T. *Abnormal mesoderm patterning in mouse embryos mutant for the SH2 tyrosine phosphatase Shp-2*. *EMBO J*. **1997** May 1;16(9):2352-64.
- Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT. *Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src*. *Mol Cell Biol*. **1994** Mar;14(3):1680-8.
- Schenkel AR, Mamdouh Z, Chen X, Liebman RM, Muller WA. *CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions*. *Nat Immunol*. **2002** Feb;3(2):143-50. Links
- Schmelz M, Franke WW. *Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: the syndesmos connecting rethelial cells of lymph nodes*. *Eur J Cell Biol*. **1993** Aug;61(2):274-89.

- Schmelz M, Moll R, Kuhn C, Franke W. *Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells II. Different types of lymphatic vessels.* Differentiation. **1994** Aug;57(2):97-117.
- Schmidt A, Heid HW, Schafer S, Nuber UA, Zimbelmann R, Franke WW. *Desmosomes and cytoskeletal architecture in epithelial differentiation: cell type-specific plaque components and intermediate filament anchorage.* Eur J Cell Biol. **1994** Dec;65(2):229-45.
- Schwarz MA, Owaribe K, Kartenbeck J, Franke WW. *Desmosomes and hemidesmosomes: constitutive molecular components.* Annu Rev Cell Biol. **1990**;6:461-91.
- Serra-Pages C, Medley QG, Tang M, Hart A, Streuli M. *Liprins, a family of LAR transmembrane protein-tyrosine phosphatase-interacting proteins.* J Biol Chem. **1998** Jun 19;273(25):15611-20.
- Shaw SK, Bamba PS, Perkins BN, Luscinskas FW. *Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium.* J Immunol. **2001** Aug 15;167(4):2323-30.
- Shay-Salit A, Shushy M, Wolfvitz E, Yahav H, Breviaro F, Dejana E, Resnick N. *VEGF receptor 2 and the adherens junction as a mechanical transducer in vascular endothelial cells.* Proc Natl Acad Sci U S A. **2002** Jul 9;99(14):9462-7.
- Sheibani N, Sorenson CM, Frazier WA. *Differential modulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by platelet endothelial cell adhesion molecule-1 isoforms through activation of extracellular regulated kinases.* Mol Biol Cell. **2000** Aug;11(8):2793-802.
- Shi ZQ, Lu W, Feng GS. *The Shp-2 tyrosine phosphatase has opposite effects in mediating the activation of extracellular signal-regulated and c-Jun NH2-terminal mitogen-activated protein kinases.* J Biol Chem. **1998** Feb 27;273(9):4904-8.
- Simionescu M, Simionescu N. *Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. A look from cell biology.* Cell Biol Rev. **1991**;25(1):5-78.
- Simmons D, Makgoba MW, Seed B. *ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM.* Nature. **1988** Feb 18;331(6157):624-7.
- Simon AM, Goodenough DA. *Diverse functions of vertebrate gap junctions.* Trends Cell Biol. **1998** Dec;8(12):477-83.
- Stamenkovic I, Sgroi D, Aruffo A, Sy MS, Anderson T. *The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45RO on T cells and alpha 2-6 sialyltransferase, CD75, on B cells.* Cell. **1991** Sep 20;66(6):1133-44.
- Stevens T, Garcia JG, Shasby DM, Bhattacharya J, Malik AB. *Mechanisms regulating endothelial cell barrier function.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. **2000** Sep;279(3):L419-22.
- Strey A, Janning A, Barth H, Gerke V. *Endothelial Rho signaling is required for monocyte transendothelial migration.* FEBS Lett. **2002** Apr 24;517(1-3):261-6.
- Stuiver I, O'Toole TE. *Regulation of integrin function and cellular adhesion.* Stem Cells. **1995** May;13(3):250-62.
- Suzuki S, Sano K, Tanihara H. *Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue.* Cell Regul. **1991** Apr;2(4):261-70.
- Suzuki E, Nagata D, Yoshizumi M, Kakoki M, Goto A, Omata M, Hirata Y. *Reentry into the cell cycle of contact-inhibited vascular endothelial cells by a phosphatase inhibitor. Possible involvement of extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase.* J Biol Chem. **2000** Feb 4;275(5):3637-44.
- Symons JR, LeVeae CM, Mooney RA. *Expression of the leukocyte common antigen-related (LAR) tyrosine phosphatase is regulated by cell density through functional E-cadherin complexes.* Biochem J. **2002** Jul 15;365(Pt 2):513-9.
- Tada Y, Koarada S, Morito F, Ushiyama O, Haruta Y, Kanegae F, Ohta A, Ho A, Mak TW, Nagasawa K. *Acceleration of the onset of collagen-induced arthritis by a deficiency of platelet endothelial cell adhesion molecule 1.* Arthritis Rheum. **2003** Nov;48(11):3280-90.
- Tago K, Nakamura T, Nishita M, Hyodo J, Nagai S, Murata Y, Adachi S, Ohwada S, Morishita Y, Shibuya H, Akiyama T. *Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein.* Genes Dev. **2000** Jul 15;14(14):1741-9.
- Takahashi K, Nakanishi H, Miyahara M, Mandai K, Satoh K, Satoh A, Nishioka H, Aoki J, Nomoto A, Mizoguchi A, Takai Y. *Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein.* J Cell Biol. **1999** May 3;145(3):539-49.
- Takahashi T, Takahashi K, St John PL, Fleming PA, Tomemori T, Watanabe T, Abrahamson DR, Drake CJ, Shirasawa T, Daniel TO. *A mutant receptor tyrosine phosphatase, CD148, causes defects in vascular development.* Mol Cell Biol. **2003** Mar;23(5):1817-31.
- Takai Y, Irie K, Shimizu K, Sakisaka T, Ikeda W. *Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, migration, and polarization.* Cancer Sci. **2003** Aug;94(8):655-67.
- Takeda H, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Behrens J, Birchmeier W, Tsukita S. *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** Dec;131(6 Pt 2):1839-47.
- Takeichi M. *Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis.* Curr Opin Cell Biol. **1993** Oct;5(5):806-11.
- Tamir I, Dal Porto JM, Cambier JC. *Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: regulators of B cell signal transduction.* Curr Opin Immunol. **2000** Jun;12(3):307-15.
- Tanaka Y, Adams DH, Shaw S. *Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes.* Immunol Today. **1993** Mar;14(3):111-5.

- Tenev T, Keilhack H, Tomic S, Stoyanov B, Stein-Gerlach M, Lammers R, Krivtsov A, Ullrich A, Bohmer F. *Both SH2 domains are involved in interaction of SHP-1 with the epidermal growth factor receptor but cannot confer receptor-directed activity to SHP-1/SHP-2 chimera.* J Biol Chem. **1997** Feb 28;272(9):5966-73.
- Thompson RD, Noble KE, Larbi KY, Dewar A, Duncan GS, Mak TW, Nourshargh S. *Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)-deficient mice demonstrate a transient and cytokine-specific role for PECAM-1 in leukocyte migration through the perivascular basement membrane.* Blood. **2001** Mar 15;97(6):1854-60.
- Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Daniel JM, Ireton RC, Wheelock MJ, Johnson KR, Hummingbird DK, Reynolds AB. *Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion.* J Cell Biol. **2000** Jan 10;148(1):189-202.
- Tinsley JH, Wu MH, Ma W, Taulman AC, Yuan SY. *Activated neutrophils induce hyperpermeability and phosphorylation of adherens junction proteins in coronary venular endothelial cells.* J Biol Chem. **1999** Aug 27;274(35):24930-4.
- Tonks NK, Neel BG. *Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases.* Curr Opin Cell Biol. **2001** Apr;13(2):182-95.
- Tsukita S, Tsukita S, Nagafuchi A, Yonemura S. *Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions.* Curr Opin Cell Biol. **1992** Oct;4(5):834-9.
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M. *Multifunctional strands in tight junctions.* Nat Rev Mol Cell Biol. **2001** Apr;2(4):285-93.
- Ukropec JA, Hollinger MK, Salva SM, Woolkalis MJ. *SHP2 association with VE-cadherin complexes in human endothelial cells is regulated by thrombin.* J Biol Chem. **2000** Feb 25;275(8):5983-6.
- Ukropec JA, Hollinger MK, Woolkalis MJ. *Regulation of VE-cadherin linkage to the cytoskeleton in endothelial cells exposed to fluid shear stress.* Exp Cell Res. **2002** Feb 15;273(2):240-7.
- Valiron O, Chevrier V, Usson Y, Breviario F, Job D, Dejana E. *Desmoplakin expression and organization at human umbilical vein endothelial cell-to-cell junctions.* J Cell Sci. **1996** Aug;109 ( Pt 8):2141-9.
- van Buul JD, Voermans C, van den Berg V, Anthony EC, Mul FP, van Wetering S, van der Schoot CE, Hordijk PL. *Migration of human hematopoietic progenitor cells across bone marrow endothelium is regulated by vascular endothelial cadherin.* J Immunol. **2002** Jan 15;168(2):588-96.
- van de Stolpe A, van der Saag PT. *Intercellular adhesion molecule-1.* J Mol Med. **1996** Jan;74(1):13-33.
- Van Itallie CM, Anderson JM. *Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts.* J Cell Sci. **1997** May;110 ( Pt 9):1113-21.
- Van Vactor D, O'Reilly AM, Neel BG. *Genetic analysis of protein tyrosine phosphatases.* Curr Opin Genet Dev. **1998** Feb;8(1):112-26.
- van Wetering S, van Buul JD, Quik S, Mul FP, Anthony EC, ten Klooster JP, Collard JG, Hordijk PL. *Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells.* J Cell Sci. **2002** May 1;115(Pt 9):1837-46.
- Vasioukhin V, Bauer C, Yin M, Fuchs E. *Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion.* Cell. **2000** Jan 21;100(2):209-19.
- Venkateswaran K, Xiao K, Summers S, Calkins CC, Vincent PA, Pumiglia K, Kowalczyk AP. *Regulation of endothelial barrier function and growth by VE-cadherin, plakoglobin, and beta-catenin.* Am J Physiol Cell Physiol. **2002** Sep;283(3):C811-21.
- Vestweber D, Kemler R. *Identification of a putative cell adhesion domain of uvomorulin.* EMBO J. **1985** Dec 16;4(13A):3393-8.
- Vestweber D, Gossler A, Boller K, Kemler R. *Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos.* Dev Biol. **1987** Dec;124(2):451-6.
- Vestweber D, Blanks JE. *Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands.* Physiol Rev. **1999** Jan;79(1):181-213.
- Vinals F, Pouyssegur J. *Confluence of vascular endothelial cells induces cell cycle exit by inhibiting p42/p44 mitogen-activated protein kinase activity.* Mol Cell Biol. **1999** Apr;19(4):2763-72.
- Vincent PA, Xiao K, Buckley KM, Kowalczyk AP. *VE-cadherin: adhesion at arm's length.* Am J Physiol Cell Physiol. **2004** May;286(5):C987-97.
- Vlaminckx K, Kemler R. *Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling.* Bioessays. **1999** Mar;21(3):211-20.
- Volberg T, Geiger B, Dror R, Zick Y. *Modulation of intercellular adherens-type junctions and tyrosine phosphorylation of their components in RSV-transformed cultured chick lens cells.* Cell Regul. **1991** Feb;2(2):105-20.
- Volberg T, Zick Y, Dror R, Sabanay I, Gilon C, Levitzki A, Geiger B. *The effect of tyrosine-specific protein phosphorylation on the assembly of adherens-type junctions.* EMBO J. **1992** May;11(5):1733-42.
- Wakelin MW, Sanz MJ, Dewar A, Albelda SM, Larkin SW, Boughton-Smith N, Williams TJ, Nourshargh S. *An anti-platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 antibody inhibits leukocyte extravasation from mesenteric microvessels in vivo by blocking the passage through the basement membrane.* J Exp Med. **1996** Jul 1;184(1):229-39.
- Walzel H, Schulz U, Neels P, Brock J. *Galectin-1, a natural ligand for the receptor-type protein tyrosine phosphatase CD45.* Immunol Lett. **1999** Apr 15;67(3):193-202.
- Wang Q, Doerschuk CM. *Neutrophil-induced changes in the biomechanical properties of endothelial cells: roles of ICAM-1 and reactive oxygen species.* J Immunol. **2000** Jun 15;164(12):6487-94.

- Wang Q, Doerschuk CM. *The p38 mitogen-activated protein kinase mediates cytoskeletal remodeling in pulmonary microvascular endothelial cells upon intracellular adhesion molecule-1 ligation.* J Immunol. **2001** Jun 1;166(11):6877-84.
- Wang Q, Chiang ET, Lim M, Lai J, Rogers R, Janmey PA, Shepro D, Doerschuk CM. *Changes in the biomechanical properties of neutrophils and endothelial cells during adhesion.* Blood. **2001** Feb 1;97(3):660-8.
- Wang Q, Doerschuk CM. *The signaling pathways induced by neutrophil-endothelial cell adhesion.* Antioxid Redox Signal. **2002** Feb;4(1):39-47.
- Wang Q, Pfeiffer GR 2nd, Gaarde WA. *Activation of SRC tyrosine kinases in response to ICAM-1 ligation in pulmonary microvascular endothelial cells.* J Biol Chem. **2003** Nov 28;278(48):47731-43.
- Ward SG, Bacon K, Westwick J. *Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction.* Immunity. **1998** Jul;9(1):1-11.
- Weis S, Shintani S, Weber A, Kirchmair R, Wood M, Cravens A, McSharry H, Iwakura A, Yoon YS, Himes N, Burstein D, Doukas J, Soll R, Losordo D, Cheresh D. *Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction.* J Clin Invest. **2004** Mar;113(6):885-94.
- Wojciak-Stothard B, Williams L, Ridley AJ. *Monocyte adhesion and spreading on human endothelial cells is dependent on Rho-regulated receptor clustering.* J Cell Biol. **1999** Jun 14;145(6):1293-307.
- Wright TJ, Leach L, Shaw PE, Jones P. *Dynamics of vascular endothelial-cadherin and beta-catenin localization by vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in human umbilical vein cells.* Exp Cell Res. **2002** Nov 1;280(2):159-68.
- Xiao K, Allison DF, Buckley KM, Kottke MD, Vincent PA, Faundez V, Kowalczyk AP. *Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells.* J Cell Biol. **2003** Nov 10;163(3):535-45.
- Yan HX, He YQ, Dong H, Zhang P, Zeng JZ, Cao HF, Wu MC, Wang HY. *Physical and functional interaction between receptor-like protein tyrosine phosphatase PCP-2 and beta-catenin.* Biochemistry. **2002** Dec 31;41(52):15854-60.
- Yap AS, Brieffer WM, Gumbiner BM. *Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions.* Annu Rev Cell Dev Biol. **1997**;13:119-46.
- Young BA, Sui X, Kiser TD, Hyun SW, Wang P, Sakarya S, Angelini DJ, Schaphorst KL, Hasday JD, Cross AS, Romer LH, Passaniti A, Goldblum SE. *Protein tyrosine phosphatase activity regulates endothelial cell-cell interactions, the paracellular pathway, and capillary tube stability.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. **2003** Jul;285(1):L63-75.
- Yu DH, Qu CK, Henegariu O, Lu X, Feng GS. *Protein-tyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion.* J Biol Chem. **1998** Aug 14;273(33):21125-31.
- Yuan L, Barriocanal JG, Bonifacino JS, Sandoval IV. *Two integral membrane proteins located in the cis-middle and trans-part of the Golgi system acquire sialylated N-linked carbohydrates and display different turnovers and sensitivity to cAMP-dependent phosphorylation.* J Cell Biol. **1987** Jul;105(1):215-27.
- Zanetti A, Lampugnani MG, Balconi G, Breviaro F, Corada M, Lanfrancone L, Dejana E. *Vascular endothelial growth factor induces SHC association with vascular endothelial cadherin: a potential feedback mechanism to control vascular endothelial growth factor receptor-2 signaling.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. **2002** Apr 1;22(4):617-22.
- Zhang ZY. *Protein-tyrosine phosphatases: biological function, structural characteristics, and mechanism of catalysis.* Crit Rev Biochem Mol Biol. **1998**;33(1):1-52.
- Zhang ZY. *Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics.* Curr Opin Chem Biol. **2001** Aug;5(4):416-23.
- Zhang ZY. *Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development.* Annu Rev Pharmacol Toxicol. **2002**;42:209-34.
- Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev A. *Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles.* J Cell Sci. **2000** Sep;113 ( Pt 18):3127-39.
- Zollner O, Lenter MC, Blanks JE, Borges E, Steegmaier M, Zerwes HG, Vestweber D. *L-selectin from human, but not from mouse neutrophils binds directly to E-selectin.* J Cell Biol. **1997** Feb 10;136(3):707-16.
- Zondag GC, Moolenaar WH, Gebbink MF. *Lack of association between receptor protein tyrosine phosphatase RPTP mu and cadherins.* J Cell Biol. **1996** Sep;134(6):1513-7.
- Zondag GC, Reynolds AB, Moolenaar WH. *Receptor protein-tyrosine phosphatase RPTPmu binds to and dephosphorylates the catenin p120(ctn).* J Biol Chem. **2000** Apr 14;275(15):11264-9.
- Zondag GC, Evers EE, ten Klooster JP, Janssen L, van der Kammen RA, Collard JG. *Oncogenic Ras downregulates Rac activity, which leads to increased Rho activity and epithelial-mesenchymal transition.* J Cell Biol. **2000b** May 15;149(4):775-82.

## 6. Anhang

### 6.1 DNA Sequenz der murinen GPP130 cDNA

Die Transmembrandomäne ist **fett gedruckt**. Unter der DNA-Sequenz steht die Übersetzung in Aminosäurereste im Ein-Buchstaben Code.

```

5' -
atgggaaacgggatgtgctccccgaaagcagaagcggatcttccagacgctgctgcttctc
M G N G M C S R K Q K R I F Q T L L L L
acggtggctcttcggcttccctctatggcgcgatgctctacttggaaactgcagacgcagctg
T V V F G F L Y G A M L Y L E L Q T Q L
cgaaagctgagggcagtgggcgtcaagtaccagcagcaccaggactctctctctgcccag
R K A E A V A L K Y Q Q H Q D S L S A Q
ttgcaagttgtatatgaacacagatcaagattagagaaatctttgcaaaaagaaaggctt
L Q V V Y E H R S R L E K S L Q K E R L
gaacacaagaaagcaaaggaagatttccttgtttataagttagaagcacaagaaacactt
E H K K A K E D F L V Y K L E A Q E T L
aaciaaggaaggcaagattccaatagcagatatagtgcatgaatgtccaacatcagatg
N K G R Q D S N S R Y S A L N V Q H Q M
ctgaaaagtcagcatgaggagctgaggaagcagcacagtgacctggaagaggaacaccgg
L K S Q H E E L R K Q H S D L E E E H R
aagcaaggggaagacttcagtagaacggttcaatgaccacaagcagagatacctgcagctt
K Q G E D F S R T F N D H K Q R Y L Q L
cagcaagaaaaggaacaagaacttttctaagcttaaagaaactgtatataatcttgagagaa
Q Q E K E Q E L S K L K E T V Y N L R E
gagaatagacaactaagaaaagcacaccaagacattcacacacagcttcaagacgtcaag
E N R Q L R K A H Q D I H T Q L Q D V K
caacagcataagaatcttactctccgagcatgaacagcttgtagtgactttggaagaccac
Q Q H K N L L S E H E Q L V V T L E D H
aagagtgactggctgctgctgcgcagactcaagttgcagaatataaacaactgaaagataca
K S A L A A A Q T Q V A E Y K Q L K D T
ctgaacaggattccaagcttttcgaaatcctgaccagtcgagcagcaaaatgtcaccttt
L N R I P S F R N P D P V E Q Q N V T F
ccccatgggactcacctcctcaagggttacaacggaagagagaagctgacaggagagctc
P H G T H P P Q G Y N G R E K L T G E L
caagaggtgcagccgaatcacgaagcagggcctagaagaatggaagagaaacctctgtct
Q E V Q P N H E A G P R R M E E K P L S
tccatgcagaaggatgcaggattccaggctctagaagagcagaatcaagtggaaccacaga
S M Q K D A G F Q A L E E Q N Q V E P R
gagccagaggagcgtcaagtggaagaggaacacaggaaggcactggaggaggaggagatg
E P E E R Q V E E E H R K A L E E E E M
gagcaggtggggcagggcggagcatctggaggaagaacacgacccatcaccagaggagcag
E Q V G Q A E H L E E E H D P S P E E Q
gatcgagactggcgggatcagcagggacagaatgcagcccaccttctggatggccaccct
D R D W R D Q Q G Q N A A H L L D G H P
caagctgaggtggagcattcgaccaaggcagctacaaacttccaatccccatgatgaggaa
Q A E V E H S T K A A T N F Q S P Y E E
cagttggaacagcagaggctggcagcagggagagatgaggaagcccagcggctgagagaa
Q L E Q Q R L A A R R D E E A Q R L R E
catcaggaagccttgcaccaacagaggctccatggggcagttgctaagacaacagcagcag
H Q E A L H Q Q R L H G Q L L R Q Q Q Q
caacagttcctggccagagagatggctcagcagaagcaggtagcccatgaagatggccag
Q Q F L A R E M A Q Q K Q V A H E D G Q
cagcagcaccaggagcagctaaggcagcaagctcattacaatgctgtggagaatgacatc
Q Q H Q E Q L R Q Q A H Y N A V E N D I
gcacagggagtcgaggaccaggggaatccccgaagaagaggggaggtgcctatgacagagat

```

A Q G V E D Q G I P E E E G G A Y D R D  
 aaccagcgccaagatgaagctgaaggagacccaggcaacagacaggaacttcgtgaacca  
 N Q R Q D E A E G D P G N R Q E L R E P  
 ggacaccaagaaggcgaccctgaagttgaagcagatagggcagctgtggaggatataaac  
 G H Q E G D P E V E A D R A A V E D I N  
 ccagcagatgaccccaacaatcaaggcgaagatgaatcttgaggaagccgagcaagtgaga  
 P A D D P N N Q G E D E F E E A E Q V R  
 gaagaaaatttgccagaggaagtgaagagcaaaaacaaagcgaagcaaagcaagggaat  
 E E N L P E E S E E Q K Q S E A K Q G N  
 gtagaaatggatgagcacttggtgatggcagggaatccagaccagcaggaggataatggt  
 V E M D E H L V M A G N P D Q Q E D N V  
 gatgagcagtatcaggacgaaggagaggaagaggttcaggaagatctgactgaagagaaa  
 D E Q Y Q D E G E E E V Q E D L T E E K  
 aaacgggaaatggagcataatggtgaagagacatatggtgaacatcctgatgataagaat  
 K R E M E H N V E E T Y G E H P D D K N  
 aatgatggtgaagaacaaggagttcacaacagggcgcatcctaaggaagacaggagcat  
 N D G E E Q G V H N R A H P K G R Q E H  
 tatgaggaggaggaagatgaagaagacggggctgctggtgctgagaaatcacatcgcaga  
 Y E E E E D E E D G A A V A E K S H R R  
 Gctgaaatg  
 A E M  
 - 3 '

## 6.2 Abkürzungsverzeichnis

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

---

IgG:	Immunglobulin
IP:	Immunopräzipitation
IPTG:	Isopropyl $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
ITAM:	Immunoreceptor Tyrsosine-Based Activation-Motif
ITIM:	Immunoreceptor Tyrsosine-Based Inhibitory-Motif
kb:	Kilobasen
kDa:	Kilodalton
l:	Liter
M:	Molar
mAk:	monoklonaler Antikörper
MDCK:	Madine Darby Canine Kidney
MEM:	minimal essential medium
mRNA:	Messenger RNA
N-:	Amino-
ODx:	Optische Dichte bei Wellenlänge x nm
ORF:	Open reading frame
p.A.:	per Analyse
PBS:	Phosphate buffered saline
PCR:	Polymerase chain reaction
PDGF-BB:	Platelet derived growth factor BB
PE:	R-Phycoerythrin
PMSF:	Phenylmethylsulfonylfluorid
PV:	Pervanadat
RNA:	Ribonukleinsäure
rpm:	Umdrehungen pro Minute
RPTP:	Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatase
RT:	Raumtemperatur
RTK:	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
PTP:	Protein-Tyrosin-Phosphatase
RT-PCR:	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SAP:	Shrimp alkaline phosphatase
SDS:	Sodiumdodecylsulfate
SDS-PAGE:	Sodiumdodecylsulfat-polyacrylamide-gelelektrophorese
TE:	TRIS/EDTA-Puffer
TEMED:	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS:	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UKM:	Universitätsklinikum Münster
UV:	Ultraviolett
V:	Volt
VE-cadherin:	Vascular endothelial cadherin
VEGF:	Vascular endothelium growth factor
VEGF-R2:	Vascular endothelium growth factor receptor 2
VE-PTP:	Vascular endothelial protein tyrosine phosphatase
wt:	Wildtyp
w/v:	Weight/volume
X-Gal:	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl $\beta$ -Galactopyranosid
z.B.:	zum Beispiel

## **6.3 Lebenslauf**

### **Persönliche Daten :**

Name : Alexander - Christian Gamp  
Geburtstag : 19. November 1975  
Geburtsort : Heidelberg  
Familienstand : ledig

### **Schulbildung:**

August 1982 - Juli 1986 Grundschole in Berlin  
August 1986 - Juni 1995 Johann-Rist Gymnasium in Wedel (Holstein)  
8. Juni 1995 Abitur

### **Zivildienst:**

August 1995 - September 1996 Kreiskrankenhaus Wedel

### **Studium:**

Oktober 1996 - November 2001 Biologiestudium (Diplom) an der  
Georg-August-Universität Göttingen  
Oktober 1999 - Juli 2000 ERASMUS - Auslandssemester an der  
Univ. Paul Sabatier Toulouse, Frankreich

### **Promotionsstudiengang:**

WS 2002/2003 - WS 2003/2004 Universität Münster, Fachbereich Biologie

### **Prüfungen:**

16. Oktober 1998 Vordiplom mit der Note : "Sehr Gut"  
14. November 2001 Diplomprüfung in den Fächern Entwicklungs-  
biologie, Genetik und Physik mit "Sehr Gut"

**Praktika / Berufserfahrung:**

Februar 1998 - März 1998	Praktikum im Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH)
Februar 2000 - Juni 2000	Praktikum am Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS) in Toulouse
März 2001 - November 2001	Wissenschaftliche Hilfskraft im Rahmen der Diplomarbeit an der Universität Göttingen im Institut für Biochemie II unter der Leitung von Prof. Kurt von Figura (AG Prof. Saftig)
Januar 2002 - heute	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen der Promotion an der Universität Münster im Institut für Zellbiologie, ZMBE Münster

**Dissertation :**

Beginn :	7. Januar 2002
Institut :	Institut für Zellbiologie/ZMBE, UKM Münster
Betreuer :	Prof. Dr. Dietmar Vestweber



---

(Alexander-Christian Gamp)

## **6.4 Danksagungen**

Ich möchte mich bei mehreren Personen für ihre Hilfe bedanken :

- Prof. Dr. Dietmar Vestweber möchte ich für das interessante Thema und die zahlreichen hilfreichen Diskussionen danken, die er immer zu führen bereit ist.
- Prof. Dr. Volker Gerke danke ich für die Übernahme des Korreferates.
- Großer Dank geht an Dr. Stefan Butz für die Vermittlung von wertvollem biochemischem Know-How während seiner Betreuung meiner Arbeit und den Weg, den wir gemeinsam gegangen sind! Außerdem natürlich für die Durchsicht der Dissertation.
- Den Kollegen und Freunden aus dem Labor danke ich für eine schöne Zeit bei der Arbeit und danach. Besonders hervorgehoben seien hier die Damen und Herren der Labore 3 + 4. "Mittendrin statt nur dabei !"
- Spezieller Dank geht an Tanja Möller für die technische Hilfe und ihr Blut. Deine Neutrophilen sind die besten ;-)
- Meinen Eltern danke ich für "moralischen support" in allen Lebenslagen!
- Vor allem aber danke ich Silvia für ihre Liebe und Unterstützung!