
**Drebrin, ein Aktin-Bindeprotein, und seine Rolle in
der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion in
humanen Endothelzellen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Vanessa van Vliet

Dezember 2008

**Drebrin, ein Aktin-Bindeprotein, und seine Rolle
in der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion in
humanen Endothelzellen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Vanessa van Vliet
aus Düsseldorf

Erstgutachter: Prof. Dr. George Boyan

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Schleicher

Sondergutachter: PD Dr. Stefan Linder

eingereicht am: 15.12.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.2009

Ehrenwörtliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt.

Vanessa van Vliet

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2005 bis Dezember 2008 am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Anleitung von PD Dr. Stefan Linder angefertigt. Die Arbeit wurde betreut und vor der biologischen Fakultät vertreten durch Prof. Dr. George Boyan (Department Biologie II – Biozentrum Martinsried: Entwicklungs-Neurobiologie). Diese Arbeit wurde teilweise durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 413, Graduiertenprogramm 438 - Vaskuläre Biologie in der Medizin) unterstützt.

Teile dieser Arbeit sind zur Veröffentlichung unter folgendem Titel bei *Molecular Biology of the Cell* eingereicht:

van Vliet V., Böhlig B., Peitsch W.K., Osiak A.E., Sixt M., Ebbing B., Schröder A., Linder S. *Drebrin mediates between cell-matrix and cell-cell adhesion of HUVEC through regulation of actin waves and VE-cadherin levels*

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf mehreren nationalen und internationalen Tagungen präsentiert:

van Vliet V., Osiak A.E., Peitsch W.K., Schröder A., Ebbing B., Linder S. Drebrin regulates podosomal adhesions in human endothelial cells (Abstract S6-2). 30th Annual Meeting of the German Society for Cell Biology (DGZ), 14.-17. März 2007, Frankfurt, Germany (Poster)

van Vliet V., Osiak A.E., Peitsch W.K., Schröder A., Ebbing B., Linder S. Drebrin regulates podosomal adhesions in human endothelial cells (Abstract B38). FEBS workshop "Invadopodia, Podosomes and Focal Adhesions in Tissue Invasion", 8.-13. September 2007, Ortona, Italy (Poster)

van Vliet V. Drebrin, an actin binding protein, in cytoskeletal regulation of primary human endothelial cells. 4. Symposium des DFG Graduiertenkollegs "Vaskuläre Biologie in der Medizin", 10.-11. November 2007, Herrsching a. Ammersee, Germany (Vortrag)

van Vliet V., Osiak A.E., Peitsch W.K., Schröder A., Ebbing B., Linder S. Drebrin regulates podosomal adhesions in human endothelial cells (Abstract 1703). 47th annual Meeting of the American Society for Cell Biology (ASCB) 1.-5. Dezember 2007, Washington, DC, USA (Poster)

van Vliet V., Osiak A.E., Peitsch W.K., Sixt M., Schröder A., Ebbing B., Böhlig B., Linder S. Drebrin influences adhesion, morphology and cell-cell contact formation in human endothelial cells (Abstract 351). 48th annual Meeting of the American Society for Cell Biology (ASCB) 13.-17. Dezember 2008, San Francisco, USA (Poster)

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis..... I-V

Abkürzungsverzeichnis.....VI-VIII

1. Einleitung..... 1

1.1. Struktur und Funktion des Endothels..... 1

1.1.1. Heterogenität des Endothels..... 1

1.1.2. Angiogenese..... 2

1.1.3. Die Rolle des Endothels in der Gerinnung..... 2

1.1.4. Der Gefäßwandtonus..... 3

1.1.5. Endotheliale Dysfunktion..... 4

1.2. Zell-Zellkontakte..... 4

1.2.1. *Adherens junction*..... 5

1.2.2. *Tight junctions*..... 6

1.2.3. *Gap junctions*..... 7

1.3. Das Zytoskelett..... 8

1.3.1. Das Aktin-Zytoskelett..... 9

1.3.2. Die Dynamik des Aktinzytoskeletts..... 9

1.3.3. Die Rolle des Zytoskeletts in der Migration..... 12

1.4. Podosomen..... 14

1.4.1. Vorkommen und Struktur von Podosomen..... 14

1.4.2. Funktion und Regulation von Podosomen..... 16

1.4.3. Podosomen in Endothelzellen..... 18

1.5. Drebrin..... 18

1.6. Aktin *waves* in HUVEC..... 20

1.7. Aufgabenstellung..... 22

2.	Material und Methoden	23
2.1.	LaboraAusstattung.....	23
2.2.	Molekularbiologische Methoden.....	24
2.2.1.	Allgemeines zu <i>Escherichia coli</i>	24
2.2.2.	Plasmide.....	25
2.2.3.	Transformation von Plasmiden in kompetente Zellen.....	25
2.2.3.1.	Herstellung hitzekompetenter Bakterien.....	25
2.2.3.2.	Hitzeschocktransformation.....	26
2.2.4.	Agarose-Gelelektrophorese.....	26
2.2.5.	Plasmid-Isolierung.....	26
2.2.6.	DNA-Isolierung mittels Gelelution.....	27
2.2.7.	DNA-Restriktionshydrolyse.....	27
2.2.8.	Ligation.....	28
2.2.9.	PCR-Reaktionen.....	28
2.2.9.1.	Oligonukleotide.....	28
2.2.9.2.	PCR.....	29
2.2.9.3.	Bakterien- / Kolonie-PCR.....	30
2.2.9.4.	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	30
2.2.10.	Mutagenese.....	30
2.2.11.	RNA-Interferenz (RNAi)	30
2.3.	Zellbiologische Methoden.....	31
2.3.1.	Allgemeines.....	31
2.3.2.	Isolierung und Kultur primärer humaner Endothelzellen aus der Nabelschnur..	32
2.3.3.	Ablösung von Endothelzellen.....	33
2.3.4.	Transfektion / Elektroporation von HUVEC.....	33
2.3.4.1.	Transfektion mit dem Nukleofektor-System.....	33
2.3.4.2.	Elektroporation mit dem Microporator-System.....	33
2.3.5.	<i>Spreading assay</i>	34
2.3.6.	FACS (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>).....	34

I. Inhaltsverzeichnis

2.3.7.	<i>Scratch wound assay</i>	35
2.3.8.	<i>Tube formation assay</i>	35
2.4.	Immunfluoreszenz und Mikroskopie.....	35
2.4.1.	Fixierung und Permeabilisierung.....	35
2.4.1.1.	Formaldehyd / Aceton.....	35
2.4.1.2.	Methanol.....	36
2.4.2.	Färbung mittels spezifischer Antikörper.....	36
2.4.3.	Fluoreszenzmikroskopie.....	37
2.4.4.	<i>Live cell</i> Mikroskopie.....	38
2.5.	Proteinbiochemische Methoden.....	39
2.5.1.	Konzentrationsbestimmung.....	39
2.5.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli.....	39
2.5.3.	Molekulargewichtsbestimmung.	39
2.5.4.	Coomassie-Färbung (Weber und Osborn, 1969).....	40
2.5.5.	Silberfärbung (Blum <i>et al.</i> , 1987, modifiziert).....	40
2.5.6.	Western Blot.....	40
2.5.7.	Expression und Aufreinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie	41
2.5.7.1.	GST-Fusionsproteine.....	41
2.5.7.2.	Elution mit Glutathion.....	42
2.5.8.	MBP-Fusionsproteine.....	42
2.5.9.	Interaktionsstudien.....	43
2.5.9.1.	Herstellung von Lysaten aus humanen Zellen.....	43
2.5.9.2.	Immunpräzipitation.....	43
2.5.9.3.	GST- / MBP- <i>pulldown</i>	43
2.5.9.4.	GFP-Immunpräzipitation.....	44
2.5.9.5.	SH3 <i>domain array</i>	44
2.5.10.	G-LISA.....	44

3.	Ergebnisse	46
3.1.	Lokalisierung von Drebrin in HUVEC: Podosomen und Aktin <i>waves</i>	46
3.2.	Drebrin ist essentiell für die Bildung von Aktin <i>waves</i>	48
3.3.	Untersuchung der Rolle von Drebrin in der Ausbreitung (<i>spreading</i>) von HUVEC.....	49
3.4.	Drebrin beeinflusst die Ausbildung der Morphologie von HUVEC.....	51
3.4.1.	Die Überexpression von Drebrin-GFP in HUVEC führt zu einer Dosis-abhängigen Veränderungen der Zellmorphologie.....	51
3.4.2.	Die Überexpression von Drebrin-GFP in HUVEC führt zu einer Umorgani-sierung des Zytoskeletts.....	54
3.4.3.	Die Überexpression von Drebrin beeinträchtigt die Zellretraktion.....	55
3.5.	Molekulare Funktion und Interaktion von Drebrin.....	59
3.5.1.	Untersuchung der <i>coiled coil</i> Region.....	59
3.5.2.	Sequenzanalyse von Drebrin mittels ScanSite 2.0.....	62
3.5.3.	Mutation putativer Phosphorylierungsstellen innerhalb der <i>coiled coil</i> Region von Drebrin.....	63
3.5.4.	Drebrin interagiert über seine poly-Prolinregion mit SH3-Proteinen.....	67
3.5.5.	Die Transfektion C-terminaler Drebrin-Konstrukte inhibiert die Ausbildung von Aktin <i>waves</i> in HUVEC.....	71
3.6.	Drebrin interagiert mit α -Actinin und Myosin IIa.....	73
3.7.	Drebrin ist beteiligt an der Ausbildung von Zell-Zellkontakten.....	75
3.7.1.	Aktin <i>waves</i> in HUVEC führen zur Anreicherung von Drebrin an Zell-Zell-kontaktstellen.....	75
3.7.2.	VE-Cadherin kolokalisiert zeitweise mit Drebrin an Zell-Zellkontaktstellen, aber nicht an Podosomen oder Aktin <i>waves</i>	76
3.7.3.	Drebrin <i>knockdown</i> bewirkt eine Verminderung des VE-Cadherin-Levels an Zell-Zellkontakten.....	78
3.7.4.	Drebrin <i>knockdown</i> beeinträchtigt weder die Lokalisierung von β -Catenin noch von PECAM-1 an Zell-Zellkontakten.....	80
3.7.5.	Drebrin und Connexin43 lokalisieren gemeinsam an Zell-Zellkontaktstellen, ohne sich zu überlagern.....	82
3.8.	Die Rolle von Drebrin in der Angiogenese.....	85

3.8.1.	Drebrin wird nach Verletzung des Endothels an die Zellperipherie rekrutiert...	85
3.8.2.	Ein zu hoher intrazelluläre Drebringegehalt beeinträchtigt die Wundheilung.....	86
3.8.3.	Die Wundheilung durch Endothelzellen ist auch trotz Drebrin <i>knockdown</i> möglich.....	88
3.8.4.	<i>Tube formation</i> auf Matrigel bei Drebrin <i>knockdown</i>	89
4.	Diskussion	92
4.1.	Drebrin und Aktin <i>waves</i> beeinflussen die Zellphysiologie.....	92
4.2.	Podosomen und Aktin <i>waves</i> in humanen Endothelzellen	94
4.3.	Drebrin stabilisiert VE-Cadherin an Zell-Zellkontaktstellen.....	96
4.4.	Interaktionen von Drebrin in HUVEC.....	101
4.4.1.	Drebrin interagiert mit α -Actinin in HUVEC.....	101
4.4.2.	Drebrin interagiert mit Myosin IIa in HUVEC.....	103
4.4.3.	Bewirken Drebrin und Abl2 die Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts in Endothelzellen?	104
4.4.4.	Crk als putativer Interaktionspartner von Drebrin.....	105
4.5.	Drebrin beeinflusst die RhoA-Aktivität in HUVEC.....	106
4.6.	Drebrin-vermittelte Aktin-Modulation und Zell-Morphologie	108
4.7.	Eine kurze Untereinheit innerhalb der Aktinbinderegion vermittelt die Aktin-modulation durch Drebrin	110
4.8.	Die Rolle von Drebrin und Aktin <i>waves</i> im humanen Endothel.....	112
4.9.	Ausblick.....	113
5.	Zusammenfassung	115
6.	Literaturverzeichnis	117
7.	Anhang: Inhalt der Video-CD	137
8.	Danksagung	138
9.	Lebenslauf	139

ABKÜRZUNGEN

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ADF	<i>actin-depolymerising factor</i>
ADF-H	<i>actin-depolymerising factor- homology</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMP-PNP	Adenosin-5(β,γ -imido)-triphosphat
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
Arp	<i>actin-related protein</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
CBD	Catenin-Binde-Dömane
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EtOH	Ethanol
F	Farad
F-	filamentöses (Aktin)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FAK	Fokale Adhäsionen-Kinase (<i>focal adhesion kinase</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDI	<i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	Grünes fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde

II. Abkürzungen

H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
HEPES	N-Hydroxy-Ethylpiperazin-N-Ethylsulfonsäure
HRP	<i>horseraddish peroxidase</i>
HUVEC	Humane vaskuläre Endothelzellen aus Nabelschnüren (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>)
IF	Intermediär-Filament
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-® -D-Thiogalactopyranosid
JAM	<i>junctional adhesion molecule</i>
K	Kilo-
l	Liter
LB	Luria Broth
m	Milli-
M	Molar
MAGUK	<i>membrane-associated guanylate kinases</i>
max.	maximal
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute(n)
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRFP	monomeres rotes fluoreszierendes Protein
MLC	<i>myosin light chain</i>
MTOC	<i>microtubule-organizing center</i>
NGS	Normales Ziegenserum (<i>normal goat serum</i>)
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
p	Plasmid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PECAM	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
P _i	anorganisches Phosphat
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PTPD	Protein Tyrosin-Phosphatase
PTA	<i>podosome type adhesion</i>
Pyk	Prolin-reiche Tyrosin Kinase
RNA	Ribonukleinsäure

II. Abkürzungen

RNAi	RNA <i>interference</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodiumdodecylsulfat</i>)
sec	Sekunden
SHP-2	<i>SH2-domain-containing tyrosine phosphatase-2</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sog.	so genannte
TEMED	N, N, N', N' –Tetramethylethylendiamin
TIRF	<i>Total internal reflection fluorescence microscopy</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U	<i>unit(s)</i>
ÜNK	über Nacht-Kultur
V	Volt
VASP	Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VE	<i>vascular endothelial</i>
Vol	Volumina
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrome-Protein
WAVE	WASP-Family Verprolin Homologous Protein
<i>wt</i>	Wildtyp
x g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec)
ZO-1	<i>zonula occludens-1</i>
μ	Mikro-

1. EINLEITUNG UND STAND DER FORSCHUNG

1.1. Struktur und Funktion des Endothels

Das Endothel besteht aus einer einlagigen Zellschicht, die auf der dem Gefäßlumen zugewandten Seite die Gesamtheit der Lymph- und Blutgefäße auskleidet. Daher bildet das Endothel eine Barriere zwischen dem zirkulierenden Blutstrom und der übrigen Gefäßwand. Endothelzellen bilden zusammen mit ihrer Basalmembran, der *Membrana elastica interna*, und einer dünnen Bindegewebsschicht die *Tunica intima*. Somit grenzt sich das Endothel von den darunter liegenden glatten Muskelzellen, welche die *Tunica media* bilden, ab. Die Einbettung des Blutgefäßes in seine Umgebung erfolgt durch die *Adventitia*, einer lockeren Bindegewebsschicht (Michel *et al.*, 2007; Stan, 2007).

1.1.1. Heterogenität des Endothels

Das Endothel weist eine starke Heterogenität in Bezug auf Funktion und Struktur auf (Übersicht bei Aird, 2006 und 2007). Je nach Organisation, unterscheidet man zwischen kontinuierlichem, diskontinuierlichem und fenestriertem Endothel. Das kontinuierliche Endothel stellt eine hochselektive Barriere für die im Blut gelösten Gase und Partikel dar. Die Abgrenzung des Gewebes vom zirkulierenden Blutstrom wird zwischen benachbarten Endothelzellen durch *tight junctions* (lat. *zonulae occludentes*) bewirkt. Größere Moleküle werden über transendotheliale Kanäle oder Transzytose durch das Endothel transportiert. Das kontinuierliche Endothel besitzt eine Vielzahl von *caveolae* und einige wenige transendotheliale Kanäle. *Caveolae* sind sackförmige Einbuchtungen der Plasmamembran, die den transzytotischen Transport von Partikeln in das Gewebe unterhalb des Endothels ermöglichen, indem sie sich von der Membran abschnüren (Thomas und Smart, 2008).

Das fenestrierte Endothel weist dagegen durch seine hohe Anzahl an porenartigen Strukturen (*fenestrae*, transendotheliale Kanäle) eine größere Permeabilität für Wasser und kleinere Solute auf. Es tritt vor allem in Bereichen mit Filtrationsfunktion oder erhöhtem endothelialen Transport auf, zum Beispiel in den Kapillargefäßen der exo- und endokrinen Drüsen, Glomeruli, sowie der Magen- und Darmschleimhaut. *Fenestrae* sind transzelluläre Poren, mit einem Durchmesser von ca. 70 nm, die sich durch die gesamte Zelle erstrecken. Die meisten *fenestrae* besitzen ein 5-6 nm dickes, nicht-membranöses Diaphragma, welches als molekularer Filter

fungiert (Rostgaard und Qvortrup, 1997).

Das diskontinuierliche Endothel zeichnet sich durch das Vorhandensein relativ großer porenartiger Strukturen aus, wodurch die einzelnen Zellen teilweise nicht mehr in Kontakt zueinander stehen. Dieser Aufbau bewirkt eine erhöhte Durchlässigkeit des Endothels. Das diskontinuierliche Endothel kommt vor allem in den sinusoidalen Gefäßen der Leber vor. Die Basallamina ist in diesem Fall nur wenig ausgeprägt (Aird, 2006). Auch im diskontinuierlichen Endothel kommen *fenestrae* vor, allerdings mit einem größeren Durchmesser (100-200 nm) und ohne Diaphragma (Wisse, 1970). Zusätzlich sind hier die sogenannten *clathrin-coated pits* in hoher Anzahl vertreten. Es handelt sich hierbei um eine bestimmte Form von Membrangruben an der Zelloberfläche, die eine hohe Rezeptordichte aufweisen können und auf der cytoplasmatischen Seite mit dem Protein Clathrin bedeckt sind. Diese Strukturen spielen eine tragende Rolle bei der rezeptorvermittelten Endozytose (Muro *et al.*, 2004).

1.1.2. Angiogenese

Die Neubildung von vaskulären Strukturen auf der Grundlage bereits vorhandener Blutgefäße wird als Angiogenese bezeichnet. Dieser Prozess umschließt die endotheliale Zellaktivierung, Migration und Proliferation, sowie den Abbau der extrazellulären Matrix und die Stabilisierung der neu gebildeten Blutgefäße (Übersicht bei Stan, 2007). Letztere erfolgt über die Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen (Karamysheva, 2008). Um die Auskleidung neuer und bereits bestehender Blutgefäße zu garantieren, sind Endothelzellen in der Lage, durch Migration und Teilung ihre Zahl und Anordnung an die unterschiedlichen Bedingungen anzupassen. Der Angiogenese steht die Vaskulogenese gegenüber, bei der sich im Blutstrom zirkulierende Stammzellen (Angioblasten) zu *de novo* Endothelzellen ausbilden und somit neue Gefäßstrukturen formen (Coultas *et al.*, 2005).

1.1.3. Die Rolle des Endothels in der Gerinnung

Im Rahmen der Hämostase trägt das Endothel zur regulierten Produktion gerinnungshemmender, bzw. -fördernder Faktoren bei (Furie und Furie, 1988). Eine Unterbrechung der Gefäßintegrität führt zu einer Freisetzung von Komponenten der extrazellulären Matrix, vor allem von Kollagen, und der darauf folgenden Adhäsion von Thrombozyten (Farndale *et al.*, 2004). Die Bindungsreaktion zwischen dem vom Endothel gebildeten von-Willebrand-Faktor und entsprechenden Rezeptoren auf der Oberfläche der Thrombozyten ist für diesen Vorgang essentiell

(Sixma *et al.*, 1997). Es kommt zur Bildung eines Plättchenaggregats am Ort der Gefäßverletzung. Somit entsteht ein erster Wundverschluss (zelluläre Hämostase) (Huo und Ley, 2004). Durch die anschließende plasmatische Hämostase wird dieser weiter verstärkt. Das Endothel trägt zur Initiierung dieses Prozesses durch die Bildung und Sezernierung von Thromboplastin (*tissue factor*, TF, Faktor III) bei (Key *et al.*, 2007). Diese Komponente bewirkt die Aktivierung von Faktor VII. Es folgt die Bildung von Thrombin, die durch die Bildung von TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*) durch das Endothel inhibiert werden kann (Broze, 1995). In der folgenden Koagulationsphase wird die Produktion und Polymerisierung von Fibrin gefördert. Dies bewirkt eine Festigung des Wundverschlusses. Der für die Wundheilung nötige Abbau der somit gebildeten Thromben wird in der Fibrinolyse durch das Enzym Plasmin vermittelt (Weisel, 2005; Übersicht bei Wolberg und Campbell, 2008).

Die Verteilung der vom Endothel sezernierten pro- und antithrombotisch wirksamen Faktoren unterliegt einer strengen Balance und ist nicht einheitlich innerhalb des vaskulären Systems (Übersicht bei Aird, 2005).

1.1.4. Der Gefäßwandtonus

Neben der Aufrechterhaltung der endothelialen Integrität und der Hämostase ist die Regulation des Gefäßwandtonus eine entscheidende Funktion der Endothelzellen. Dies geschieht durch die Ausschüttung von vasokonstriktorisch und vasodilatatorisch wirkenden Substanzen wie zum Beispiel Stickstoffmonoxid (NO). NO entsteht in der Anwesenheit von Sauerstoff und NADPH durch das Enzym NOS (NO-Synthase) aus L-Arginin. Ein Nebenprodukt dieser Reaktion ist L-Citrullin (Stuehr, 1999). Im Endothel kommt vor allem die endotheliale NOS (eNOS) vor. Ihre Aktivität bewirkt über die zytosolische Guanylylcyclase die Bildung des intrazellulären Signalmoleküls cGMP (zyklischem Guanosinmonophosphat) (Russwurm *et al.*, 2001; Zabel *et al.*, 2002). Dies führt einerseits zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und somit zur Vasodilatation. Andererseits vermittelt sie eine Hemmung der Thrombozytenaktivität, indem sie die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten inhibiert (zur Übersicht s. Koesling *et al.*, 2005). Die Spannung der glatten Gefäßmuskulatur hängt maßgeblich von der Balance zwischen vasodilatatorischen und vasokonstriktorischen Faktoren ab (Toda und Okamura, 2003). Bei Letzteren handelt es sich vor allem um Hormone (zum Beispiel Angiotensin I und II, Serotonin, Thromboxan A₂ und Noradrenalin). Die Vasokonstriktion bewirkt eine Verengung der Blutgefäße und damit eine Erhöhung des Strömungswiderstands des zirkulierenden Bluts.

1.1.5. Endotheliale Dysfunktion

Der Zusammenhang zwischen der Funktion des Endothels und pathologischen Prozessen wie der Atherosklerose wurde bereits sehr früh erkannt (Virchow, 1856). In der arteriellen Gefäßwand besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der endothelialen Dysfunktion und der atherosklerotischen Pathogenese (Gimbrone *et al.*, 1997). Diese umfasst eine Veränderung der Gefäßreaktivität und der Lipoproteinpermeabilität, eine gesteigerte Rekrutierung von Leukozyten und die Akkumulation derselben als Schaumzellen in der *Tunica intima*, eine Veränderung der Regulation des vaskulären Zellwachstums und -überlebens (zum Beispiel verminderte Regeneration des Endothels, erhöhte Proliferation der glatten Muskelzellen, etc.), sowie die Störung der hämostatischen und fibrinolytischen Balance (s. dazu Punkt 1.1.3.). Letztere begünstigt die Bildung von Thrombin und die Ablagerung von Thrombozyten und Fibrin (Übersicht bei Gimbrone *et al.*, 2000). Bakterielle oder virale Infektionen, chronische Hypercholesterinämie oder Hyperhomocysteinämie und die Ablagerung von oxidierten Lipoproteinen innerhalb der Gefäßwand stellen dagegen pathophysiologische Stimuli der arteriellen Endotheldysfunktion dar (Ross, 1999). Neben diesen biochemischen Reizen können auch biomechanische Kräfte, die durch den pulsierenden Blutfluss durch die verzweigte arterielle Vaskulatur entstehen, Funktion und Struktur der Endothelzellen, sowie die Expression pathophysiologisch relevanter Gene beeinflussen (Topper und Gimbrone, 1999).

Die Atherosklerose beruht auf einem chronischen Entzündungsprozess, der sich durch die Akkumulation von Monozyten, bzw. Makrophagen, glatten Muskelzellen und Lymphozyten innerhalb der arteriellen Gefäßwand auszeichnet. Diese Akkumulation resultiert aus der Freisetzung von proinflammatorischen Molekülen und bewirkt die Bildung eines atherosklerotischen Plaques. Dieser kann durch sein stetiges Wachstum zum Beispiel zum Verschluss der Arterie oder zur Bildung von Aneurysmen führen. Alternativ kommt es zur Kalzifizierung und damit zur Verhärtung des Blutgefäßes (Arteriosklerose) oder zur Ruptur des Plaques, was zum Myokardinfarkt oder Schlaganfall führen kann (zur Übersicht s. Milioti *et al.*, 2008).

1.2. **Zell-Zell Kontakte**

Für die korrekte Ausbildung, Vernetzung und Umgestaltung von Blutgefäßen ist die interzelluläre Adhäsion von entscheidender Bedeutung. Im Endothel treten zwei Haupttypen der interzellulären Verbindung in Erscheinung: die bereits unter Punkt 1.1.1. erwähnten *tight junctions* (lat. *zonulae occludentes*) und *adherens junctions* (lat. *zonulae adherentes*) (Dejana, 2004).

1.2.1. *Adherens junctions*

Adherens junctions kommen im gesamten vaskulären System vor und werden vornehmlich durch Cadherine gebildet, eine Familie transmembranständiger Adhäsionsproteine, die homophile Adhäsionen vermitteln und sich an den Zellgrenzen zu multimeren Komplexstrukturen organisieren (Bazzoni und Dejana, 2004). Die Bezeichnung „Cadherin“ leitet sich aus der Kalziumabhängigkeit der homophilen Bindung ab („Ca-adherine“), welche über sogenannte Ectodomänen (ca. 100 Aminosäuren lange, hochkonservierte und negativ geladene extrazelluläre Sequenzmotive) vermittelt wird. Anhand der Anzahl ihrer Ecto- und cytoplasmatischen Domänen sowie ihrer Größe werden Cadherine in sechs Gruppen unterteilt: klassische Cadherine, desmosomale Cadherine, Protocadherine, Proteinkinase-Cadherine, FAT-ähnliche Cadherine und 7-Transmembran-Cadherine (Angst *et al.*, 2001). Im Endothel wird vor allem VE (*vascular endothelial*)-Cadherin gebildet und in *adherens junctions* eingebaut (Dejana *et al.*, 1995). Klassische Cadherine, zu denen auch VE-Cadherin gehört, bilden in der Zytoplasmamembran laterale *cis*-Dimere. In dieser Konformation erfolgt eine *trans*-Dimerisierung mit einem zweiten Cadherin-Dimer, welches durch die angrenzende Zellmembran zur Verfügung gestellt wird (Angst *et al.*, 2001), wodurch der extrazelluläre Raum überbrückt wird. Die Verankerung von *adherens junctions* an das Zytoskelett erfolgt nach folgendem Modell: die zytoplasmatische Domäne von in der Membran verankertem VE-Cadherin bindet β -Catenin, Plakoglobin und p120. β -Catenin und Plakoglobin wiederum binden an α -Catenin, welches, neben Aktin selbst, die Aktin-Bindeproteine α -Actinin, Vinculin und ZO-1 (*zonula occludens-1*) binden kann (Ben-Ze'ev und Geiger, 1998, Vleminckx und Kemler, 1999; Watabe-Uchida *et al.*, 1998) (s. Abb. 1.1.).

Neben dem klassischen Cadherin-Catenin-Komplex kommt in *adherens junctions* zusätzlich der Nectin-Afadin Komplex vor. Nectine besitzen eine einzelne Transmembrandomäne, eine extrazelluläre Domäne mit drei IgG-ähnlichen Schleifen, und eine zytoplasmatische Domäne mit einem C-terminalen PDZ-Bindemotiv. Nectine bilden laterale Homodimere aus, die homo- und heterophile Adhäsionen mit anderen Nectinen oder Nectin-ähnlichen Rezeptoren ausbilden können (Übersicht bei Niessen, 2007). Über die Interaktion mit dem Aktin-Bindeprotein Afadin („AF-6“) wird eine Verbindung an das Zytoskelett gewährleistet (Mandai *et al.*, 1997).

Im interzellulären Raum befinden sich weitere, von den Endothelzellen gebildete Adhäsionsproteine. Unter ihnen ist PECAM (*platelet endothelial cell adhesion molecule*) das am besten untersuchte Protein. Es handelt sich um ein transmembranes Immunglobulin, welches ebenfalls

von Leukozyten und Thrombozyten gebildet wird (Übersicht bei Newman 1997 und 1999). Über seine zytoplasmatische Domäne interagiert PECAM-1 zum Beispiel mit der Phosphatase SHP-2 (Jackson *et al.*, 1997) und β -Catenin (Matsumura *et al.*, 1997; Ilan *et al.*, 2000).

1.2.2. *Tight junctions*

Für die Aufrechterhaltung der endothelialen Integrität spielen *tight junctions* eine größere Rolle als *adherens junctions*. Sie kommen sowohl in Epithel- als auch in Endothelzellen vor und befinden sich vor allem auf der apikalen Seite des interzellulären Spalts (Dejana, 2004; Übersicht bei Bazzoni und Dejana, 2004). Damit tragen sie zur Aufrechterhaltung der Zellpolarität bei. Zusätzlich beeinflussen sie, je nach ihrer molekularen Zusammensetzung, den Transport von Soluten über den interzellulären Spalt („Barriere-Funktion“) und verhindern die Diffusion apikaler, bzw. basolateraler Membrankomponenten („Zaun-Funktion“). Die Anordnung dieser Zell-Zellverbindungen variiert innerhalb des vaskulären Systems: Endothelzellen großer Arterien, die dem pulsierenden Blutstrom stärker ausgesetzt sind, weisen aufgrund der mechanischen Belastung hoch strukturierte Anordnungen von *tight junctions* auf. Im mikrovaskulären System dagegen treten diese Verbindungen (vor allem im Fall der Venolen) in geringerer Zahl in Erscheinung. Dieses Phänomen steht ebenfalls im Einklang mit der dort erfolgenden Diapedese („Hindurchtreten“) von Leukozyten durch das aktivierte Endothel im Rahmen einer Entzündungs- oder Infektionssituation.

Als erste Komponente von *tight junctions* wurde im Jahr 1986 von Stevenson *et al.* das zytoplasmatische Protein ZO-1 beschrieben. Die ZO-Proteine ZO-1, -2 und -3 gehören zur MAGUK (*membrane-associated guanylate kinases*)-Familie, die sich durch drei N-terminale PDZ-Domänen, einer SH3- und einer GUK-Domäne auszeichnen. Die ZO-Proteine interagieren über die PDZ-Domänen direkt mit Occludin und Claudinen (s. Abb. 1.1. B); über den C-Terminus erfolgt die Bindung an Aktin und somit an das Zytoskelett (Schneeberger und Lynch, 2004). Die Molekülstruktur von Occludin weist zwei extrazelluläre Schleifen und vier Transmembrandomänen auf. Sowohl der Amino- als auch der Carboxy-Terminus sind im Zytoplasma lokalisiert (Furuse *et al.*, 1993). Neben Occludin kommen auch Claudine in *tight junctions* vor (Morita *et al.*, 1999). Die 24 Vertreter der Claudin-Proteinfamilie besitzen ebenfalls vier Transmembrandomänen und im Zytoplasma lokalisierte Termini (Morita *et al.*, 1999). Die meisten Mitglieder der Claudin-Familie besitzen eine cytoplasmatische PDZ-Binderegion, welche die Kopplung an die erste PDZ-Domäne von ZO-1-Proteinen ermöglicht. Dieser Vor-

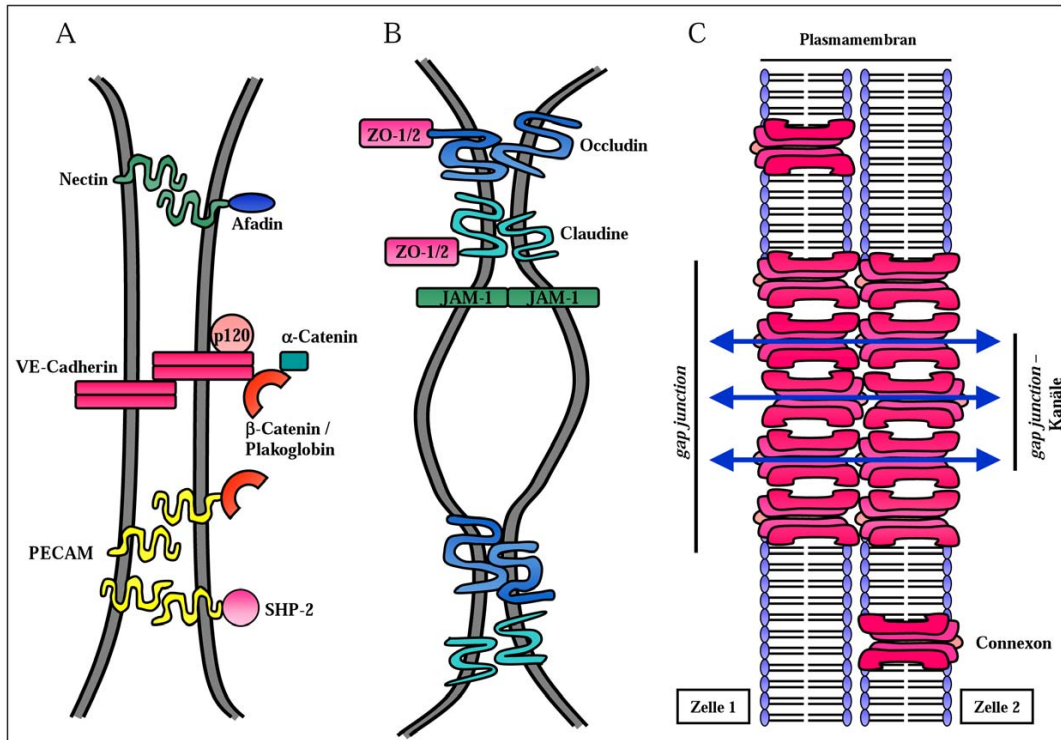


Abb. 1.1. Unterschiedliche Formen von interzellulären Kontakten (modifiziert nach Bazzoni und Dejana 2004; Niessen, 2007; Prochnow und Dermietzel, 2008)

(A) *adherens junction*: Hauptbestandteil dieser Zellkontaktform in Endothelzellen ist das Transmembranprotein VE-Cadherin. Über dessen cytoplasmatische Domäne erfolgt die Bindung an α - und β -Catenin, p120 und Plakoglobin; (B) *tight junction*: Occludine, Claudine und kleine Verbindungsproteine wie JAM-1 sind ebenfalls Transmembranproteine, die einen sehr engen Kontakt zwischen den beteiligten Zellmembranen herstellen; (C) *Gap junction*: durch die Paarung von Halbkanälen (sog. Connexonen) zweier benachbarter Zellen wird der interzelluläre Transport von Ionen und kleinen Metaboliten ermöglicht.

gang ist damit für die Stabilisierung von Signaltransduktionskomplexen und die Verankerung von Transmembranproteinen an das Zytoskelett verantwortlich (Songyang *et al.*, 1997). Claudine sorgen für die starke interzelluläre Adhäsion der *tight junctions*, indem sie untereinander innerhalb einer Zelle polymerisieren und mit Claudinen benachbarter Zellen interagieren.

Eine weitere Gruppe beteiligter Proteine stellen die *junctional adhesion molecules* (JAMs) dar. Der bestuntersuchte Vertreter dieser Gruppe ist JAM-1. Es handelt sich dabei um ein Glycoprotein, das sich aus einer extrazellulären Region, einem Transmembransegment und einer kurzen cytoplasmatischen Region zusammensetzt (Bazzoni, 2003).

1.2.3. Gap junctions

Im Gegensatz zu *adherens* und *tight junctions*, die vornehmlich der interzellulären Adhäsion dienen, bilden *gap junctions* interzelluläre Kanäle, die den Austausch von Ionen und kleineren Molekülen (bis zu 1 kDa) zwischen den verbundenen Zellen ermöglichen (Übersicht bei Baz-

zoni und Dejana 2004; Prochnow und Dermietzel, 2008). Dieser Austausch ist von großer Bedeutung für das normale Zellwachstum und die Zellentwicklung, sowie für die interzelluläre Kommunikation. *Gap junctions* sind daher im Embryonalstadium weit verbreitet.

Für die Ausbildung von *gap junctions* ist die Bereitstellung von Halbkanälen (sogenannte Connexone) zweier benachbarter Zellen erforderlich. Diese Halbkanäle setzen sich aus jeweils sechs Connexin-Molekülen zusammen. Im Endothel werden vor allem drei Typen von Connexinen gebildet: Connexin43, -40 und -37. Der Aufbau der Connexone kann monomer (aus einem Isotyp) oder heteromer (aus mehreren Isotypen) erfolgen (Prochnow und Dermietzel, 2008). Durch die Zusammenlagerung von jeweils zwei Connexonen benachbarter Zellen entstehen Kanäle mit einem Durchmesser von 1,5 bis 2 nm (s. Abb. 1.1. C).

1.3. Das Zytoskelett

Das Zytoskelett eukaryotischer Zellen sorgt für die mechanische Stabilisierung der Zelle, für den Erhalt und die Umgestaltung der äußeren Zellform, Zellpolarität, den Transport und die Organisation von Organellen und ist maßgeblich an migratorischen Prozessen beteiligt. Trotz der Bezeichnung „Zytoskelett“ besitzt dieser Strukturkomplex keinen starren Aufbau; vielmehr handelt es sich um ein dynamisches System, welches aus drei unterschiedlichen Komponenten aufgebaut ist: Mikrotubuli, Aktin-Mikrofilamente und Intermediärfilamente (IF). IF-Proteine besitzen einen zentralen α -helicalen Bereich, der die Ausbildung von *coiled-coil* Dimerstrukturen begünstigt. Diese Dimere setzen sich zu Filamenten mit einem Durchmesser von 10-12 nm zusammen, welche vor allem dem Erhalt der Zellform dienen (Kim und Coulombe, 2007). Mikrotubuli sind Polymere, welche sich aus α - und β -Tubulin-Heterodimeren zusammensetzen. Die Tubulin-Dimere bilden Protofilamente, welche in einer helikalen Anordnung mit einem Durchmesser von 25 nm polymerisieren. Mikrotubuli sind in der Zelle vor allem an der Mitose, Zytokinese und dem intrazellulären Transport von Vesikeln und Organellen beteiligt. Die Nukleation und Organisation von Mikrotubuli erfolgt in MTOCs (*microtubule organizing center*) (Caviston und Holzbaur, 2006) oder am Golgi-Apparat (Efimov *et al.*, 2008). Aktinfilamente sind dagegen vornehmlich für protrusive und kontraktile Prozesse sowie für die Verankerung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten an das Zytoskelett verantwortlich. In den weiteren Ausführungen wird vor allem diese Komponente des Zytoskeletts behandelt.

1.3.1. Das Aktin-Zytoskelett

Aktin besitzt eine molekulare Masse von 43 kDa und ist in allen eukaryotischen Zellen vertreten. Es kommt in monomerer (globuläres „G-Aktin“) und filamentöser (F-Aktin) Konformation vor (Übersicht bei Dos Remedios *et al.*, 2003). Die Umwandlung in die filamentöse Form ist ATP-abhängig. Die helikale Überstruktur besteht aus zwei Strängen von Aktinpolymeren. Die gebildete Helix ist linksgängig und weist einen Durchmesser von ca. 8 nm auf (Kabsch und Vandekerckhove, 1992). Innerhalb der Helix weisen alle Aktinmoleküle die gleiche Ausrichtung auf, daraus resultiert eine Polarität des gebildeten Filaments mit zwei verschiedenen Enden. Am so genannten stumpfen Ende (*barbed end*) erfolgt eine schnellere Bindung von Monomeren als am spitzen Ende (*pointed end*) (Pollard, 1986; Kuhn und Pollard, 2005), da die kritische Konzentration freier Monomere für das spitze Ende unter physiologischen Bedingungen 12-15 mal höher ist als für das stumpfe Ende (Wegner und Isenberg, 1983). Der kontinuierliche Austausch von Aktin-Monomeren zwischen dem spitzen und stumpfen Ende wird als „Tretmühlen-Mechanismus“ (*actin treadmilling*) bezeichnet. Das an die Aktinmoleküle gebundene ATP wird während der Bindung des einzelnen Moleküls an das wachsende Filament zu ADP und anorganisches Phosphat (P_i) hydrolysiert. Es entsteht ein ADP-Aktin- P_i -Komplex (Carlier *et al.*, 1984, 1986 und 1987; Pollard und Weeds, 1984; Ohm und Wegner 1994; Pieper und Wegner, 1996). Nach einer Verzögerungsphase erfolgt die Abgabe des Phosphatrestes an die Umgebung, wobei ADP-Aktin entsteht (Melki *et al.*, 1996; Blanchoin *et al.*, 2000; Blanchoin und Pollard, 2002). Durch die zeitliche Verzögerung dieses Vorgangs entsteht ein Filament, das sich hauptsächlich aus ADP-Aktin zusammensetzt und am stumpfen Ende eine Kappenstruktur aus ATP-Aktinmonomeren besitzt (*ATP-cap*) (Korn *et al.*, 1987).

1.3.2. Die Dynamik des Aktinzytoskeletts

Dynamische Aktinnetzwerke bilden die Grundlage für Zellmotilität, Phagozytose und intrazelluläre Motilität von Vesikeln, Organellen und bestimmten Pathogenen (Welch und Mullins, 2002). Die Ausbildung dynamischer Strukturen beruht vor allem auf dem Bereitstellen neuer freier Filament-Enden. Dies wird durch das Zusammenspiel von *de novo* Synthese und Polymerisation sowie Depolymerisation und dem *capping*, bzw. *uncapping* der Aktin-Filamente bewirkt. *Capping* Proteine binden fest an das stumpfe Ende und verhindern so die Abgabe oder Anlagerung von Aktin-Monomeren (Übersicht bei Wear und Cooper, 2004).

Neben Forminen (Cdc12 und For 3), die die Bündelung unverzweigter Aktin-Filamente organisieren, ist der Arp 2/3 (*actin-related protein 2/3*)-Komplex die Schlüsselkomponente für den

Aufbau des Aktin-Netzwerkes. Das „dendritische Modell“ der Aktinnukleation nach Pollard *et al.* (2001) beschreibt die Arp2/3-abhängige Verzweigung des Aktin-Netzwerkes und die daraus resultierende Bildung von Membranprotrusionen (s. Abb. 1.2.). Der Arp2/3-Komplex besteht aus sieben Untereinheiten (Arp2, Arp3, ARPC1-5) und bewirkt die *de novo* Filament-Nukleation in der Gegenwart von F-Aktin, was vermutlich die Bildung von Neuverzweigungen zur Folge hat (Mullins *et al.*, 1998; Pollard, 2007). In der Anwesenheit von ATP, Aktinmonomeren und nukleationsfördernden Faktoren bindet der Arp 2/3-Komplex seitlich an das Mutterfilament und initiiert die Bildung eines Tochterfilaments, welches an seinem frei liegenden spitzen Ende wächst. Die Untereinheiten Arp 2 und Arp3 bilden vermutlich die ersten beiden Einheiten des neuen Filaments (Rouiller *et al.*, 2008).

Die Depolymerisierung von Aktin erfolgt über Vertreter der Familie der ADF (Aktin-Depolymerisierungs-Faktor)/Cofilin-Proteine. Diese Proteine sind mit 15-19 kDa relativ klein und kommen in drei verschiedenen Isoformen vor: Cofilin-1 (Cfl-1), Cofilin-2 (Cfl-2) und

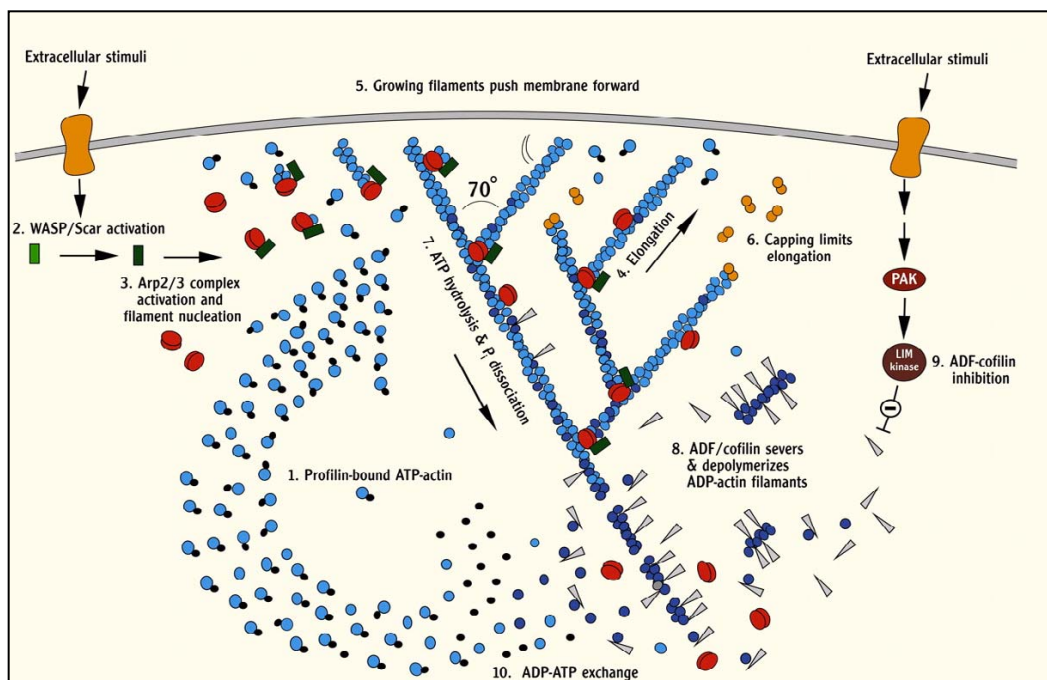


Abb. 1.2. Dendritisches Modell der Aktinnukleation (Pollard *et al.*, 2001)

Die Assemblierung neuer Aktinfilamente wird durch die Bereitstellung freier Aktinmonomere durch Profilin gewährleistet (1). Durch aktivierte Proteine der WASP/Scar-Familie wird der Arp2/3-Komplex aktiviert (2), der daraufhin mit konstanter Geschwindigkeit neue *barbed ends* bereitstellt (3). Durch das eingeleitete schnelle Filamentwachstum (4) wird die Protrusion der Membran (5) bewirkt. Nach kurzer Zeit wird das Wachstum durch das sogenannte *capping* beendet. Das System ist somit von der kontinuierlichen Aktivierung des Arp2/3-Komplexes abhängig. Die nachfolgende Hydrolyse von ATP am Aktinfilament (7) führt zum Abbau älterer Filamente durch ADF/Cofilin (8). Der Nukleotidaustausch durch Profilin überführt die Aktin-Untereinheiten wieder in den ATP-Monomer-Pool (10).

ADF (*actin-depolymerising factor*) (Übersicht bei van Troys *et al.*, 2008). Die Expression der verschiedenen Isoformen ist abhängig vom Zell-, bzw. Gewebetyp und Entwicklungsstufe. Ihre Hauptfunktion ist das schnelle Recycling von Aktinmonomeren, was vor allem im Zusammenhang mit Membran *ruffling* und dem Prozess der Zytokinese eine bedeutende Rolle spielt (Übersicht bei Dos Remedios *et al.*, 2003). Cofiline besitzen eine höhere Affinität zu ADP-beladenem als zu ATP-beladenem Aktin (Carlier *et al.*, 1997). Sie fördern die Freisetzung von P_i von den ADP- P_i -beladenen Monomeren innerhalb des Filaments. Zusätzlich binden sie freigesetzte ADP-Aktinmonomere und inhibieren den Austausch der gebundenen Nukleotide (Nishida, 1985). Die Aktivität von ADF/Cofilin wurde daher lange Zeit als förderlich für die Dissoziation von Aktinmonomeren vom Filament betrachtet. Neuere Studien konnten allerdings dieses Modell weiter ausbauen. Offensichtlich sorgt der intrazelluläre Gradient der ADF/Cofilin-Konzentration für eine Veränderung seiner Funktion von der Nukleation neuer Filamente über die Stabilisierung und das „Altern“ der Monomere (durch Bildung von ADP-Aktin) zum Schneiden derselben, wodurch neue „stumpfe“ Enden entstehen. Diese Enden können durch sogenannte *capping*-Proteine stabilisiert werden (s. Abb. 1.2.), woraus eine Nettoverkürzung des Gesamtfilaments resultiert (Andrianantoandro und Pollard, 2006). Auch zwischen den einzelnen Vertretern der AFD/Cofilin-Familie bestehen Unterschiede in Funktion und Aktivität (Übersicht bei van Troys *et al.*, 2008).

Der Nukleotid-Austausch an monomerem Aktin erfolgt durch Profilin (Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1990). Profilin bindet anschließend fest an ATP-Aktinmonomere und stellt damit weitere ATP-Aktinmonomere bereit. Damit werden sowohl die spontane Nukleation als auch die Anlagerung an spitze Enden unterbunden (s. Abb. 1.2.). Profilin erhöht die Umsatzrate der Filamente in Anwesenheit von Cofilin (Didry *et al.*, 1998), da beide Proteine an den gegenüberliegenden Enden des Filaments wirken, wobei Profilin ATP-Aktin an das stumpfe Ende hinzufügt und Cofilin den Abbau von ADP-Aktin vom spitzen Ende bewirkt.

Die Aktindynamik wird ebenfalls durch die Rho-Familie kleiner GTPasen reguliert. Rho-Proteine, vor allem Rho, Rac und Cdc42, werden als Reaktion auf viele extrazelluläre Signale aktiviert und steuern vermutlich die räumlich und zeitlich koordinierte Aktivierung des Arp2/3-Komplexes (zur Übersicht s. Bompert und Caron, 2004). Diese Aktivierung wird durch Proteine der WASP (*Wiscott-Aldrich-Syndrome-Protein*)-Familie übermittelt, welche Arp2/3 durch eine Erleichterung der Konformationsänderung aktivieren und das erste Aktinmonomer für die Bildung des Tochterfilaments rekrutieren (Nolen und Pollard, 2008). Es wurde ebenfalls

festgestellt, dass das *uncapping* der Aktin-Filamente durch Rac1 reguliert wird (Sun *et al.*, 2007).

1.3.3. Die Rolle des Zytoskeletts in der Migration

Die dynamische Natur des Aktinzytoskeletts ermöglicht den Prozess der Zellmigration, welcher in vielzelligen Organismen von entscheidender Bedeutung, zum Beispiel bei der Neubildung von Zellgewebe im Rahmen der embryonalen Entwicklung, der Wundheilung oder der Immunantwort ist (Le Clainche und Carlier, 2008). Die Migration ergibt sich aus einem komplexen Zusammenspiel von Protrusion, Adhäsion, Polarisierung und Retraktion der Zelle. Aus dem koordinierten Ablauf der in Punkt 1.3.2. als „dendritisches Modell“ (s. Abb. 1.2.) beschriebenen Prozesse der Aktinverzweigung und -depolymerisierung, sowie durch das *capping* der Aktinfilamente kann der dynamische Kern zur Bildung von Lamellipodien entstehen (Pollard und Borisy, 2003). Die weitere Polymerisierung von Aktin treibt das sogenannte *leading edge* migrierender Zellen an (Zigmond, 1993). Um die gebildeten Protrusionen für die gerichtete Migration nutzen zu können, müssen Adhäsionsstrukturen zwischen Zellmembran und extrazellulärer Matrix ausgebildet und auch wieder gelöst werden. Über diese Strukturen ist es der Zelle möglich, Zug und Druck auszuüben, wodurch die Fortbewegung gewährleistet werden kann. Bei dem für die gerichtete Migration nötigen, gezielten Zyklus von Auf- und Abbau der Adhäsionsstrukturen spricht man vom sogenannten *adhesion turnover* (Webb *et al.*, 2004).

Die Regulierung der Aktinpolymerisation erfolgt hauptsächlich über Rho-GTPasen. Für die Regulation von RhoGTPasen wiederum sind drei Gruppen von Proteinen notwendig: GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*), die den Austausch von GDT zu GTP, und damit die Aktivierung der GTPasen fördern; GAPs (*GTPase-activating proteins*), welche die intrinsische GTPase-Aktivität des molekularen Schalters stimulieren und somit als negative Regulatoren wirken; und GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*), die vermutlich den GTPase-Zyklus blockieren, indem sie mit der GDP-gebundene Form einen löslichen Komplex im Zytoplasma bilden.

Die Aktivierung von Rho, Rac oder Cdc42 führt zur Ausbildung kontraktile Aktin-Myosin-Filamente, bzw. protrusiver Aktin-reicher Lamellipodien (Etienne-Manneville und Hall, 2002). Jede RhoGTPase kontrolliert einen spezifischen Signaltransduktionsweg, der zu der Ausbildung (durch Polymerisierung) und Organisation (zum Beispiel durch Bündelung) der Aktinfi-

lamente führt (Übersicht bei Jaffe und Hall, 2005). Rac bewirkt beispielsweise über WAVE und Arp2/3 die Aktinpolymerisation am *leading edge*, was die Ausbildung von Membran-Protrusionen fördert. Für Kontraktions- und Retraktionsprozesse innerhalb des Zellkörpers und am *trailing edge* wird die GTPase Rho verantwortlich gemacht. Rho induziert die Assemblierung von Aktin-Myosin-Filamenten über die Serin/Threonin-Kinase ROCK. Diese bewirkt die Inaktivierung der MLC (*myosin light chain*)-Phosphatase (Riento und Ridley, 2003). Dadurch kommt es zunehmend zur Phosphorylierung der MLC, was wiederum eine verstärkte Aktin-Filament-Quervernetzungsaktivität von Myosin II zur Folge hat.

Die Invasion stellt eine spezielle Form der Migration dar, da sie das Hindurchtreten von Zellen durch Gewebe beschreibt. Sie spielt bei verschiedenen Prozessen eine wichtige Rolle. So würde ohne die Diapedese im Rahmen der Entzündungsantwort das Immunsystem schwere Defekte aufweisen. Allerdings dient die Invasion auch pathologischen Vorgängen, zum Beispiel der Besiedelung von Geweben durch Tumore. Der Abbau und die Penetration der extrazellulären Matrix erfordert das Vorhandensein spezieller Adhäsionsstrukturen, die die Invasion der extrazellulären Matrix durch Metastasen, und damit die Neubildung und Verbreitung von Tumorgewebe ermöglichen. Man spricht in diesem Fall von Invadopodien bzw. Podosomen. Sie stehen den vornehmlich der Adhäsion dienenden Strukturen wie fokalen Komplexen und Adhäsionen sowie fibrillären Adhäsionen gegenüber. Da Podosomen und Invadopodien in Aufbau und Zusammensetzung viele Parallelen aufweisen, wurde der Begriff „Invadosomen“ oder „PTAs“ (*podosome type adhesions*) (Linder, 2007) geprägt, um diese beiden Strukturen zusammenzufassen. Beiden Strukturen ist beispielsweise eine enge Verbindung zum Substrat sowie die Fähigkeit zum Abbau der extrazellulären Matrix gemein. Eine Unterscheidung zwischen Invadopodien und Podosomen kann zum Beispiel anhand der Tiefe der Substrat-Penetration (Linder, 2007) und möglicherweise auch über die Anwesenheit des Proteins Vinkulin (Gimona *et al.*, 2008) getroffen werden. Zudem besitzen Podosomen eine höhere Dynamik und kommen in größeren Ansammlungen (oft über 100 pro Zelle) als Invadopodien vor (meist 1-10) (Linder, 2007). Im folgenden Abschnitt soll vor allem auf die Struktur und Funktion von Podosomen eingegangen werden, da Endothelzellen ausschließlich diese Form der Invadosomen bilden.

1.4. Podosomen

1.4.1. Vorkommen und Struktur von Podosomen

Podosomen sind punktförmige, aktinreiche Adhäsionsstrukturen, die sich auf der ventralen Seite der Zelle befinden. Podosomen kommen vor allem in migratorischen und invasiven Zelltypen vor, zum Beispiel hämatopoietischen Zellen wie Makrophagen (Lehto *et al.*, 1982; Linder *et al.*, 1999), (unreifen) dendritischen Zellen (Burns *et al.*, 2001) und Osteoklasten (Marchisio *et al.*, 1984). Allerdings konnten sie auch in anderen Zelltypen wie glatten Muskelzellen (Gimona *et al.*, 2003), src-transformierten Fibroblasten (Tarone *et al.*, 1985; Marchisio *et al.*, 1987; Mizutani *et al.*, 2002) und Endothelzellen (Moreau *et al.*, 2003; Osiak *et al.*, 2005) beobachtet werden. Podosomen sind in der Lage, zu übergeordneten Strukturen zu aggregieren. Auf Glas ausgesäte Osteoklasten weisen beispielsweise ein Podosomen-„clustering“ auf (Destaing *et al.*, 2003). Auch in primären bovinen arteriellen Endothelzellen wurde die Zusammenlagerung zu podosomalen Überstrukturen, sogenannten „Rosetten“, beobachtet (Varon *et al.*, 2006).

Die Hauptkomponenten der zellulären Adhäsion bilden Integrine, zytoskelettale Elemente, sowie eine Reihe von Signal- und Adapterproteinen. Trotz dieser die Zusammensetzung betreffenden Übereinstimmungen heben sich Podosomen durch ihren speziellen Aufbau und ihre Funktion von anderen Adhäsionsformen ab: Podosomen besitzen eine zweigeteilte Architektur, die sich in einen F-Aktin-haltigen Kern, welcher einen Durchmesser von ca. 0,5 µm und eine Höhe von ca. 0,4 µm besitzt (Linder und Aepfelbacher, 2003; Linder, 2007), sowie eine diesen Kern umgebende Ringstruktur, welche sich aus Plaqueproteinen, wie zum Beispiel Vinkulin

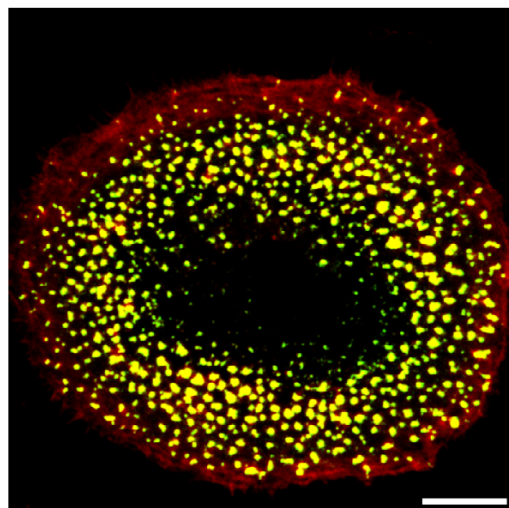


Abb. 1.3. Podosomen in primären humanen Makrophagen (Linder, 2007)

(A) Immunfluoreszenzfärbung von F-Aktin (rot) und WASP (grün) in einem humanen Makrophagen. Die konfokalmikroskopische Aufnahme zeigt, dass beide Proteine in der Kernstruktur der Podosomen co-lokalisieren (gelb); weißer Balken: 10 µm

und Talin, zusammensetzt (s. Abb. 1.4.). Diese Ringstruktur um einen Aktinkern ist einzigartig unter den verschiedenen Matrix-Adhäsionstypen. Der Podosomenkern ist ein Ort hoher Aktindynamik. Neben F-Aktin ist hier auch Arp2/3 vertreten (Linder *et al.*, 2000a; Burns *et al.*, 2001), zudem verschiedene aktinregulatorische Proteine: WASP/N-WASP (Linder *et al.*, 1999; Mizuntani *et al.*, 2002), Cortactin und Gelsolin (Buccione *et al.*, 2004). Der Kern ist von einer Wolke aus monomerem G-Aktin umgeben (Akisaka *et al.*, 2001; Destaing *et al.*, 2003). Vom Kern gehen sternförmig F-Aktinfilamente aus, wodurch einzelne Podosomen miteinander verbunden werden (Trotter, 1981; Evans *et al.*, 2003). In der Ring- und Kernstruktur befinden sich Integrine (β_1 , β_2 , β_3) (Linder und Aepfelbacher, 2003), womit eine Verankerung am Substrat gewährleistet wird. Die Verbindung zwischen Ring- und Kernstruktur erfolgt vermutlich über F-Aktinbindeproteine wie α -Actinin. Podosomen beinhalten ebenfalls die Proteinkinase Src (Gavazzi *et al.*, 1989), Proteinkinase C (PKC) (Teti *et al.*, 1992), Protein Tyrosin Kinase 2

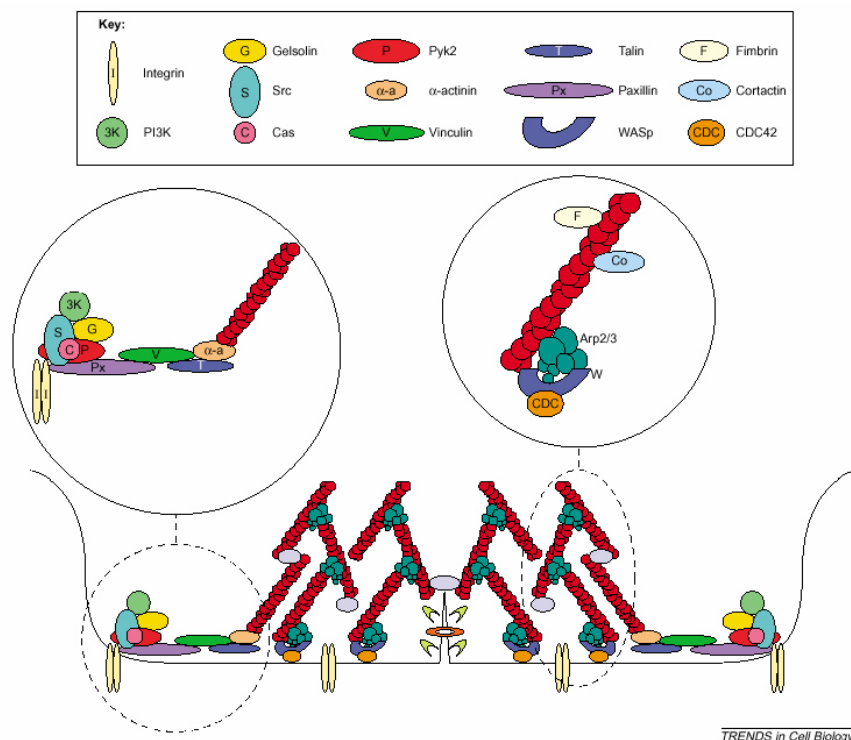


Abb. 1.4. Podosomenmodell (nach Linder und Aepfelbacher, 2003)

Schematische Darstellung der zweigeteilten Architektur eines einzelnen Podosoms (Querschnitt senkrecht zum Substrat); Oben links: Ausschnitt aus der podosomalen Ringstruktur (vereinfachte Darstellung). Integrine binden an die extrazelluläre Matrix, während Paxillin als Gerüst für einen intrazellulären Komplex aus Src, Pyk2/FAK, Gelsolin und Phosphoinositolkinase (PI3K) und p130cas dient. Dieser Komplex ist über Vinculin, Talin und α -Actinin an F-Aktin des Kerns gebunden; Oben rechts: Ausschnitt aus dem Podosomenkern. Die Aktivierung von WASP/N-WASP durch Cdc42 führt zu einem aktivierten Arp2/3-Komplex, an dem Aktinfilamente an der Membran polymerisieren. Die Aktinfilamente sind über Cortactin und Fimbrin miteinander verbunden; Unten: Die Plasmamembran (schwarze Linie) enthält säulenförmige Membraneinstülpungen, die wahrscheinlich durch Dynamin (roter Kreis) vermittelt werden und an denen vermutlich Metallomatrixproteasen sekretiert werden (gelbe „Schwalbenschwänze“).

(Pyk2) (Bruzzaniti *et al.* 2005) und Vertreter der der Rho-Familie der Rho-Kinasen (Linder und Aepfelbacher, 2003; Chellaiah, 2006). Diese Zusammensetzung ist eine Voraussetzung für die hohe Dynamik der Podosomen. Im Gegensatz zu fokalen Adhäsionen, deren Synthese ca. 3h dauert, können Podosomen 1h nach Substratkontakt ausgebildet werden. Podosomen können entweder durch *de novo*-Synthese entstehen oder durch Spaltung aus sogenannten Podosomen-Vorläufern hervorgehen. Des Weiteren können sie miteinander fusionieren und sich auflösen, bzw. aufspalten (Evans *et al.*, 2003; Kopp *et al.*, 2006).

1.4.2. Funktion und Regulation von Podosomen

Durch *in vitro* Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass Podosomen einen engen Kontakt zum Substrat ausbilden (Linder und Kopp, 2005). Da sie zusätzlich Integrine (Gimona *et al.*, 2008) und Integrin-aktivierende Proteine wie zum Beispiel Talin (Zambonin-Zallone *et al.*, 1989) und Kindlin (Ussar *et al.*, 2006) beinhalten, kann auf eine Rolle in adhäsiven Prozessen geschlossen werden. Zudem besitzen Podosomen die Fähigkeit zur Degradation der extrazellulären Matrix (Burgstaller und Gimona, 2005; Osiak *et al.*, 2005). So wurde zum Beispiel die Anreicherung von Matrix-Metalloproteinasen wie MT-1-MMP und MMP-9 in Podosomen dokumentiert (Sato *et al.*, 1997; Delaissé *et al.*, 2000). Da Podosomen mit einer Halbwertszeit von 2-12 min (Chen, 1989; Destaing *et al.*, 2003) hochdynamische Strukturen sind und sich meistens in größerer Anzahl zu Aggregaten zusammenschließen, ist der Abbau der Matrix eher großflächig und oberflächlich im Vergleich zur Matrixdegradation durch Invadopodien. Letztere weisen eine geringere Dynamik auf (> 1 h Persistenz möglich) und penetrieren das Substrat tiefer als Podosomen (Linder, 2007). Da in migrierende Zellen Podosomen vor allem an der Zellfront ausgebildet werden (Evans und Matsudaira, 2006) ist es wahrscheinlich, dass sie ebenfalls eine Rolle in der Vermittlung der gerichteten Migration spielen. Zukünftige Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet werden vor allem die Übertragung dieser Feststellungen auf *in vivo* Modelle behandeln.

Für die Stimulierung der Invadosomen-Bildung ist die Übertragung extrazellulärer Einflüsse zum Beispiel über Wachstumsfaktoren wie EGF (Yamaguchi *et al.*, 2005), VEGF (Osiak *et al.*, 2005; Hiratsuka *et al.*, 2006), TGF β (*transforming growth factor* β) (Varon *et al.*, 2006) und CSF-1 (*colony-stimulating factor* 1) (Kheir *et al.*, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2006) von großer Bedeutung. Allerdings stellt die Anheftung an das Substrat selbst einen bedeutenden Auslöser

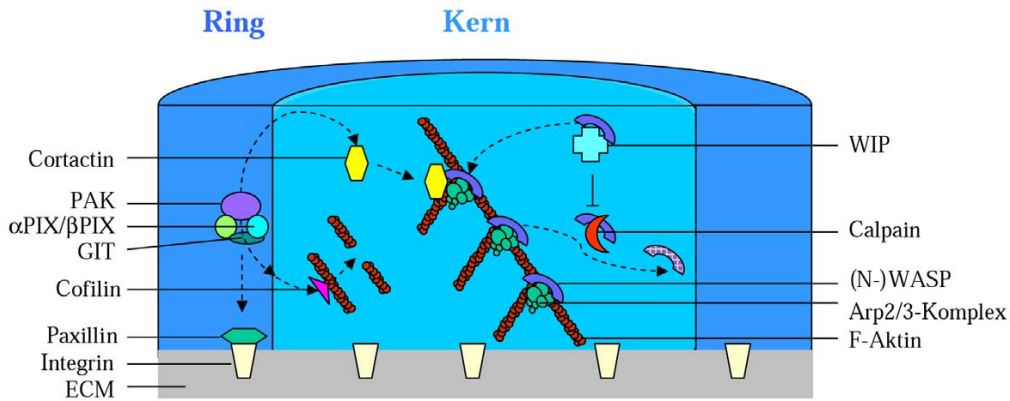


Abb. 1.5. Modell zur Aktinregulation an podosomalen Adhäsionsstrukturen (nach Linder, 2007, modifiziert)

Ein Komplex aus PAK, α - und β -PIX, sowie GIT lokalisiert in der Ringstruktur podosomaler Adhäsionsstrukturen und vermittelt vermutlich über Cofilin und Cortactin die Aktindynamik. WIP reguliert den Transport von (N-)WASP in den Kern, sowie die (N-)WASP-Degradation durch Calpain.

für die Bildung podosomaler Adhäsionen dar (Linder und Aepfelbacher, 2003). Dieser Reiz wird über Integrine und Rezeptor-Tyrosinkinasen übertragen und löst intrazelluläre Signalkaskaden aus, die die Aktivität von Proteinkinase C (PKC), *non-receptor* Tyrosinkinasen (c-Src, *focal adhesion kinase* FAK) und GTPasen der Rho-Familie (hauptsächlich Rac1, RhoA und Cdc42) mit einschließen (Übersicht bei Gimona und Buccione, 2006; Linder, 2007). Die Aktivität von Src-Familien-Kinasen ist sowohl notwendig (Suzuki *et al.*, 1998) als auch ausreichend (Chen, 1989) für die Podosomenbildung. Ein aktuelles Modell zur Regulation von podosomalen Adhäsionen (s. Abb. 1.5.) beschreibt eine Abhängigkeit des Podosomen *turnovers* vom Abbau des in der Kernstruktur lokalisierten WASP durch die Protease Calpain. Die Stabilisierung von WASP, sowie die Rekrutierung von (N-)WASP wird vermutlich durch WIP (*WASP interacting protein*) ermöglicht. In der Ringstruktur wird die (Paxillin-vermittelte) Lokalisierung und Komplexbildung von PAK (*p21 associated kinase*) zusammen mit seinen Regulatoren α PIX (*PAK-interacting exchange factor*), β PIX und GIT vermutet. In der Grenzzone zwischen Kern- und Ringstruktur könnte dieser Komplex die Aktindynamik im Kern regulieren. Dieser Vorgang wäre durch die Beeinflussung der Cofilin-Aktivität oder Phosphorylierung von Cortactin durch PAK möglich (s. Linder, 2007). Die Bildung und Dynamik von Podosomen ist ebenfalls abhängig von Mikrotubuli (Linder *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2003). Die Dynamik von Podosomen in Makrophagen beruht auf wiederholtem Kontakt zu Mikrotubuli-Plusenden (Kopp *et al.*, 2006). Die Funktion der Mikrotubuli liegt in diesem Zusammenhang vermutlich im Transport von Enzymen (zum Beispiel zum Abbau der extrazellulären Matrix) und regulatorischen Komponenten an die Podosomen.

1.4.3. Podosomen in Endothelzellen

Auch in Endothelzellen kommen Podosomen vor (Moreau *et al.*, 2003). In humane Endothelzellen aus der Nabelschnur (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) werden diese Strukturen entweder vereinzelt oder zu größeren, ringförmigen Aggregaten zusammengelagert beobachtet, was auch schon für arterielle Endothelzellen gezeigt werden konnte (s. Punkt 1.4.1.). Durch die Arbeit von Osiak *et al.*, (2005) konnte festgestellt werden, dass sich Podosomen auch in HUVEC auf der dem Substrat zugewandten Seite befinden und Orte des engen Kontakts zum Substrat darstellen. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass sie den Abbau der Matrix bewirken. Die Beobachtung, dass Podosomen vor allem in subkonfluenten Endothelzellen und Zellen, die sich in direkter Nachbarschaft zu einer Wundstelle befinden, gebildet werden, weist darauf hin, dass HUVEC-Podosomen eventuell für migratorische Prozesse benötigt werden.

Konfokale Mikroskopie-Aufnahmen haben gezeigt, dass Aktin-bindende und -regulatorische Komponenten wie N-WASP, der Arp2/3-Komplex, c-src und Integrine an HUVEC-Podosomen lokalisieren. Obwohl sie in ihrer äußeren Erscheinung den entsprechenden Strukturen in anderen Zelltypen (zum Beispiel Makrophagen, Osteoklasten) sehr ähnlich sind, konnten bezüglich des molekularen Aufbaus von HUVEC Podosomen Unterschiede zu der bisher beschriebenen zweigeteilten Architektur (s. Punkt 1.4.1.) gefunden werden: sie weisen eine zweilagige Struktur auf, in der eine Aggregation aus F-Aktin einer Schicht aus adhäsionsvermittelnden Proteinen wie Vinkulin, Paxillin und Talin aufliegt. Im Bereich der Kontaktebene überschneiden sich diese Schichten.

1.5. **Drebrin**

Auf der Suche nach aktinregulatorischen Proteinen, die eine Rolle bei der Bildung und Regulation von Zellprotrusionen und Podosomen spielen könnten, wurde in unserer Arbeitsgruppe das Protein Drebrin identifiziert. Drebrin wurde stark angereichert in HUVEC Podosomen und Aktin *waves* (s. Punkt 1.6.) nachgewiesen. Durch die vornehmliche Lokalisierung dieser Strukturen an der Zellperipherie stellte sich die Frage, welche Funktionen das Protein dabei ausübt.

Das Aktin-Bindeprotein Drebrin (*developmentally regulated brain protein*) besitzt ein molekulares Gewicht von ca. 70 kDa. Mittels SDS-Gelelektrophorese weist es allerdings einen ungewöhnlichen Lauf und eine damit korrespondierendes molekulares Gewicht von 120 kDa auf

(Peitsch *et al.*, 2001). Erstmals identifiziert wurde es in Zellen des sich entwickelnden Hühnergehirns (Shirao und Obata, 1985). In Säugetieren kommt Drebrin in den Isoformen „E“ (embryonal) und „A“ (adult) vor, die durch alternatives *splicing* entstehen (Kojima *et al.*, 1993). Die Aminosäuresequenzen von Drebrin A und E sind beinahe identisch, abgesehen von einer internen 46 Aminosäuren langen Insertsequenz („ins2“) in Drebrin A. Drebrin E ist in vielen verschiedenen Zellformen vertreten, kommt aber besonders stark in sich entwickelnden Neuronen vor. Drebrin A ist neuronenspezifisch und findet sich vor allem in Dendriten des adulten Gehirns (Shirao und Obata, 1986; Shirao *et al.*, 1987; Shirao *et al.*, 1990; Kojima *et al.*, 1993). Es wurde als notwendig für die Neuritenverlängerung beschrieben (Hayashi *et al.*, 1999). Innerhalb der Dendriten lokalisiert Drebrin A hauptsächlich an die Dornfortsätze (*dendritic spines*) (Shirao *et al.*, 1987; Hayashi *et al.*, 1996). Es handelt sich bei diesen Strukturen um dynamische Protrusionen am neuronalen Dendriten, die für gewöhnlich von einzelnen Axonen über Synapsen kontaktiert werden und eine Größe von 0,2 bis 2 μm besitzen. Die Signalübertragung über erregende Synapsen kann durch Form, Größe und biochemische Eigenschaften der Dornfortsätze beeinflusst werden. In kultivierten Neuronen kolokalisieren Drebrin A und F-Aktin an der postsynaptischen Membran. Drebrin ist notwendig für das synaptische *clustering* von PSD-95 (*post-synaptic density protein 95*) und übt offensichtlich großen Einfluss auf die Morphogenese der Dornfortsätze und auf die synaptische Plastizität aus (Hayashi *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2006). Das Drebrin-Expressionslevel scheint auch im adulten Gehirn wichtig für die Stabilität der Dornfortsätze zu sein. So werden niedrige Drebrinkonzentrationen in Verbindung mit Morbus Alzheimer und dem Down Syndrom gebracht (Horigaya *et al.*, 1996; Hatanpää *et al.*, 1999; Shim und Lubec, 2002).

Auch in nicht-neuronalen Zelltypen und deren aktinreichen Zellstrukturen scheint Drebrin eine Rolle zu spielen: Drebrin wurde zum Beispiel in epithelialen, endothelialen und glattem Muskelgewebe gefunden, wo es vor allem an Lamellipodien, Filopodien und in F-Aktin-reichen *Granulae* lokalisiert (Peitsch *et al.*, 1999; Peitsch *et al.*, 2001). Insbesondere die Isoform Drebrin E2 ist involviert in die Umorganisation des Aktinzytoskeletts sowie in die Bildung von Zellfortsätzen. Die Transfektion von Fibroblasten mit Drebrin bewirkt eine Reorganisation der Aktinfilamente von geraden Bündeln in dicke und teilweise gebogene Bündel (Shirao *et al.*, 1994), da es vermutlich kompetitiv die Aktinbindeaktivität von Tropomyosin, Fascin und α -Actinin inhibiert (Ishikawa *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, 1996). Drebrin interagiert über eine prolinreiche Region ebenfalls mit Profilin (Mammoto *et al.*, 1998). Durch Peitsch *et al.*

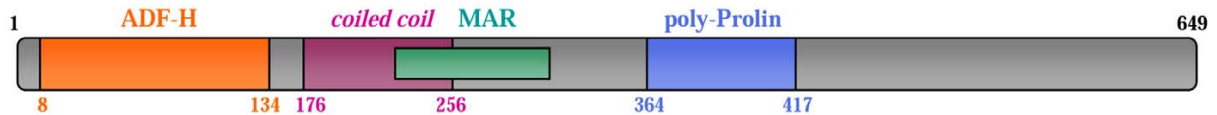


Abb.1.6. Molekülstruktur von Drebrin

Drebrin besitzt eine N-terminal lokalisierte ADF-H (*actin depolymerization factor homology*)-Domäne. Die zentral gelegene Aktin-Binderegion „MAR“ (*minimal actin remodeling*, grün) überschneidet sich mit einer helicalen Domäne (*coiled coil*, violett). Auf der C-terminalen Seite befindet sich ein Prolin-reicher Abschnitt („poly-Prolin“, blau)

(2006) wurde festgestellt, dass Drebrin E2 in verschiedenen Zelltypen (Fibroblasten, Melanomzellen) sowohl an migratorischen Prozessen als auch an der Ausbildung verzweigter Zellfortsätze beteiligt ist. Die zellphysiologische Aufgabe des Proteins scheint damit vor allem in der Umorganisation des Aktinzytoskeletts zu bestehen.

Drebrin besitzt eine ADF (*actin depolymerization factor*)/Cofilin-Homologie-Domäne (ADF-H) auf der N-terminalen Seite des Moleküls (s. Abb. 1.6., orange). Im Gegensatz zu den Proteinen der ADF/Cofilin-Familie, die für die hohen Umsatzraten von Aktinfilamenten mit verantwortlich sind, besitzen ADF-H-Proteine keine aktindepolymerisierenden Eigenschaften. Auch für die Bindung an Aktin ist diese Domäne nicht unbedingt notwendig. Durch Klonierungsversuche konnte festgestellt werden dass die sogenannte „*minimal actin remodeling site*“ („MAR“, s. Abb. 1.6., grün) den kleinsten Bereich darstellt, der für die Aktinbindung notwendig ist und teilweise mit einer *coiled coil*-Domäne überlappt (Hayashi *et al.*, 1999). Aufgrund ihres spezifischen Bindeverhaltens können *coiled coil*-Strukturen, welche geladene, helikale Domänen bilden, für die Dimerisierung von Molekülen genutzt werden. Drebrin besitzt eine hohe Homologie zu mAbp1 (*mammalian actin binding protein 1*), welches ebenfalls zur Familie der ADF-H-Proteine gehört und eine vergleichbare *coiled coil* Region aufweist. Ebenso wie mAbp1 besitzt Drebrin einen prolinreichen Abschnitt am C-Terminus (s. Abb. 1.6., blau). Die Bindung Drebrins an Profilin könnte über die poly-Prolinregion erfolgen und damit zur Stimulation der Aktinpolymerisierung beitragen (Hayashi und Shirao, 1999). Zusätzlich ist Drebrin – ebenso wie mAbp1 – in der Lage, in Abhängigkeit von ARF (*ADP-ribosylation factor*)1 an die Membranen des Golgi-Apparates zu binden (Xu und Stames, 2006).

1.6. Aktin waves in HUVEC

Zusätzlich zur seiner Lokalisation an Podosomen wurde Drebrin in unserer Arbeitsgruppe als Bestandteil von sog. Aktin-„Wellen“ (Aktin waves) entdeckt. Diese aktinreichen Strukturen

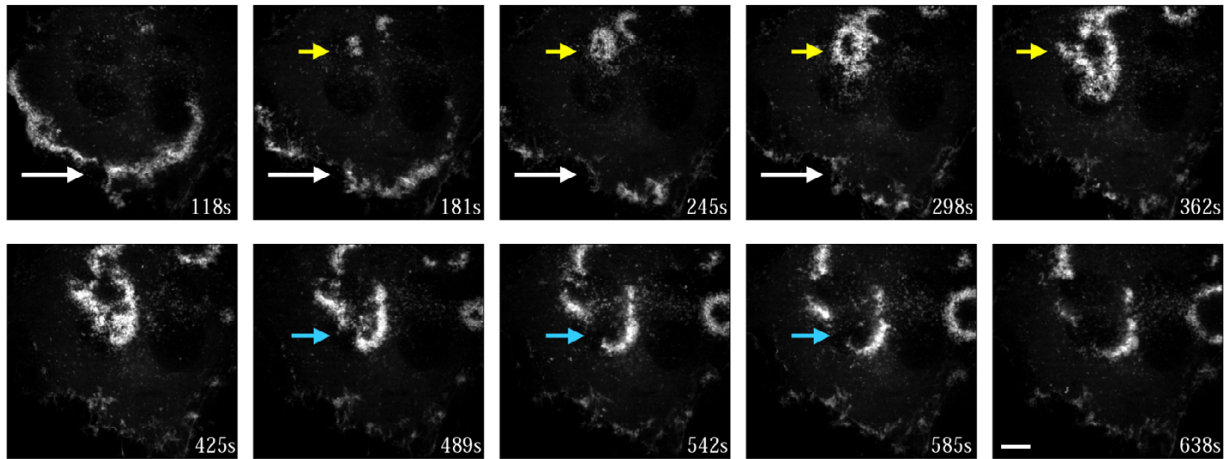


Abb. 1.7. Dynamik von Aktin waves in HUVEC (mit freundlicher Genehmigung von Dr. S. Linder)

HUVEC wurden mit Drebrin-GFP transfiziert und nach 16 h Expressionsdauer mittels konfokaler *live cell* Mikroskopie untersucht. Aktin waves werden im zentralen Zellbereich als dichte Aggregate gebildet, die sich schnell kreisförmig ausbreiten (gelber Pfeil); diese Strukturen brechen im weiteren Prozess auf (blauer Pfeil) und bewegen sich wellenartig in Richtung Zellperipherie aus (weißer Pfeil); weißer Balken: 10 μm .

befinden sich ebenso wie Podosomen an der ventralen Zellseite und lokalisieren bisweilen ebenfalls an der Zellperipherie. Trotz dieser Gemeinsamkeiten bestehen gravierende Unterschiede zwischen diesen beiden Strukturen, die vor allem durch *live cell* Mikroskopie belegt werden konnten. So entstehen Aktin waves als dichte Aggregate im Zellmittelpunkt (s. Abb.1.7., gelber Pfeil; Anhang: Film 1) und bewegen sich von dort aus weiter in Richtung der Zellperipherie. Auf diesem Weg erfolgt sukzessiv eine kreisförmige, und nach dem „Aufbrechen“ der kreisförmigen Struktur, wellenartige Ausbreitung der Strukturen (s. Abb. 1.7., blauer Pfeil). Im Anschluss erfolgt ein „Verschmelzen“ der Wellenstruktur mit der Zellperipherie (s. Abb. 1.7., weißer Pfeil). Dieser Entwicklungszyklus führt die Aktin waves über das aggregierte, das kreis- und wellenförmige Stadium und kann sich über einen Zeitraum von 5-25 min erstrecken. Im Vergleich zu Podosomen besitzen Aktin waves dadurch eine weit aus größere räumliche Dynamik, da Podosomen sich in HUVEC vornehmlich in der Zellperipherie befinden, wo sie sich ggf. zu übergeordneten Strukturen zusammenschließen können. In fixierten Präparaten kann es dadurch zur Verwechslung von kreisförmig angeordneten Überstrukturen aus HUVEC-Podosomen mit Aktin waves in ihrem kreisförmigen Stadium kommen. Allerdings gibt es Unterschiede bzgl. Größe und Lokalisation der gebildeten Strukturen. Aktin waves können einen Durchmesser bis zu 30 μm aufweisen und sich im Zellmittelpunkt befinden, während die peripher lokalisierten podosomalen Überstrukturen in HUVEC höchstens 5-10 μm umschließen.

Die Funktion der Aktin waves war bisher unbekannt. Ebenso war nicht bekannt, ob HUVEC Podosomen und Aktin waves aufgrund ihres ähnlichen Aufbaus und der gemeinsamen Lokali-

sierung an der ventralen Zellseite und (zumindest teilweise) der Zellperipherie einen ähnlichen Funktionsbereich übernehmen.

1.7. Aufgabenstellung

Durch die dieser Arbeit vorangegangene Dissertation von A.-E. Osiak konnte gezeigt werden, dass es sich bei den in primären humanen Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC) beobachteten punktförmigen Strukturen um podosomale Adhäsionsstrukturen handelt, die auch matrixdegenerative Eigenschaften besitzen. Neben klassischen Komponenten wie Vinculin, Talin, c-Src und Integrinen wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie auch das Aktinbindeprotein Drebrin als Bestandteil dieser Strukturen identifiziert.

Da Drebrin sowohl in peripher lokalisierten, aktinreichen podosomal Adhäsionsstrukturen als auch in den dynamischeren Aktin *waves* vorkommt, sollte seine Funktion in der vorliegenden Arbeit in mehrfacher Hinsicht geklärt werden. Dabei standen adhäsive Prozesse zwischen Endothelzellen, bzw. zwischen Endothelzellen und der Matrix, im Vordergrund. Insbesondere die folgenden Fragen galt es in dieser Arbeit zu beantworten:

- 1 – Was ist die Funktion von Aktin *waves* und welche Rolle spielt Drebrin in diesem Zusammenhang?
- 2 – Welche Domänen von Drebrin sind für die Ausbildung und Funktion von Aktin *waves* in HUVEC relevant?
- 3 – Mit welchen Proteinen interagiert Drebrin in HUVEC?
- 4 – Welche endothelialen Funktionen werden durch Drebrin reguliert?

3. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Laborausstattung

Autoklav	Bioclav (Fa. Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen, Deutschland)
Eismaschine	Flockeneisbereiter AF-10 (Fa. Scotsman, Vernon Hills, IL, USA)
Feinwaage	Fa. Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Gelapparaturen	Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Gel-Dokumentation	UV-Illuminator Model N90M (Fa. UniEquip, Martinsried, Deutschland) Canon PowerShot S5Is, 8,0 MP (Fa. Canon, Tokyo, Japan)
Grobwaage	Fa. Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Inkubatoren	Fa. Binder Labortechnik, Tuttlingen, Deutschland
Isoelektrische Fokussierung	Ettan™ IPGphor 3 IEF System (Fa. GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien)
Netzgeräte	Power Pac 200 und Power Pac 300 Power Supply (Fa. Biorad, Hercules, CA, USA)
Petrischalen	Fa. Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
pH-Meter	Fa. Knick (Elektronische Messgeräte GmbH & Co., Berlin, Deutschland)
Pinzetten	Fa. neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs-GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pipetten	Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Magnetrührer	MR 3001 (Fa. Heidolph, Schwabach, Deutschland) IKA® colorsquid wildcat (Fa. IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)
Schüttelinkubatoren	GFL-3031, (Gesellschaft f. Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland)
Spektrophotometer	SmartSpec™Plus Spectrophotometer, Bio-Rad (Fa. Hercules, CA, USA)
Sterilbank	Fa. BDk Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Transfektions-Geräte	Nucleofector I und II (Fa. Lonza Cologne AG, Köln, Deutschland) Microporator (Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)
Tankblot-kammer	Modell EB-10 (Fa. Scie-Plas, Gainsborough, Großbritannien)
Thermocycler	Uno-Thermoblock (Fa. Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) Mastercycler gradient (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) Primus25 advanced (Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)
Vortex-Gerät	REAX top, (Fa. Heidolph, Schwabach, Deutschland)
Zentrifugen	Centricon H-401 (Fa. Kontron Instruments, Watford, UK) Omnifuge 2.0RS (Fa. Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland) Biofuge <i>fresco</i> (Fa. Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland) Biofuge A (Fa. Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland) Universal 320R (Fa. Hettich, Tuttlingen, Deutschland) MiniSpin® (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Allgemeines zu *Escherichia coli*

Bakterienstamm:

- *Escherichia coli* DH5 α : F- ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rK⁻,mK⁺) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1(GibcoBRL)

Das für die Kultivierung von *Escherichia coli* verwendete LB- Medium wurde vor dem Gebrauch für 20 min bei 121°C im Autoklav (Bioclav, Fa. Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen) sterilisiert. Alle Komponenten wurden mit deionisiertem und filtriertem Wasser (Ionenaustauscher, Fa. Millipore) hergestellt. Hitzelabile Zusätze, wie Glucose und Antibiotika, wurden steril filtriert und nach dem Autoklavieren des Mediums zugegeben.

E. coli wurde bei 37°C in LB-Medium kultiviert. Die Selektion von Bakterien, die mit einem resistenzverleihenden Plasmid transformiert wurden, erfolgte mittels Anzucht auf LB-Medium in Anwesenheit von Ampicillin (100 μ g/ml) oder Kanamycin (30 μ g/ml) (Fa. Sigma-Aldrich). Die Inokulation von LB-Agarplatten erfolgte mit Hilfe einer Impfföse mit anschließender Bebrütung über Nacht bei 37°C. Kleinere Volumina (5 ml LB-Medium) wurden mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht schüttelnd inkubiert. Für die Kultivierung größerer Volumina (100 ml) wurde eine Vorkultur angelegt und nach einer Inkubationszeit von ca. 8 h in einer Verdünnung von 1: 500 zu LB-Medium gegeben und schüttelnd erneut bei 37°C inkubiert.

Zur längerfristigen Aufbewahrung transformierter Bakterien wurden 0,5 ml einer über Nacht angezogenen Kultur mit 0,5 ml LB-Medium inkl. 40 % Glycerin in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

Die optische Dichte von Bakterienkulturen wurde in Plastikkuvetten gegen unbeimpftes LB-Medium bei einer Wellenlänge von 600 nm im Spektrophotometer bestimmt. Eine OD₆₀₀-Einheit entspricht hierbei ungefähr einer Konzentration von 10⁸ Zellen/ml Medium bei OD<1.

2.2.2. Plasmide

Für die Generierung von GST- bzw. MBP-Fusionsproteinen wurden die bakteriellen Expressionsvektoren pGEX-2T/pGEX-4T-2 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien) und pMAL-p2X (New England Biolabs, Deutschland) verwendet.

Bei den verwendeten eukaryontischen Expressionsplasmiden für GFP, bzw. RFP-Fusionsproteine handelte es sich um pEGFP-N1, pEGFP-C1 (Clontech, vertrieben über BD Biosciences, Palo Alto, USA) und ptagRFP-N (Fa. Evrogen, Moskau, Russland), sowie das psiSTRIKE U6 hairpin Cloning System (human)-hMGFP Expressionsvektor für RNAi-*knockdown* Versuche (Fa. Promega, Madison, USA).

Eine Auflistung der freundlicherweise von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellten Konstrukte ist in Tabelle 2.1. zu finden.

Tabelle 2.1. Verwendete Konstrukte von Kooperationspartnern

Konstrukt	Insert	Vektor	tag	Spezies	Herkunft
Drebrin-GFP-C1	Wildtyp	pEGFP-C1	GFP	Mensch	W. Peitsch
VE-Cadherin-GFP	Wildtyp	pEGFP-N1	GFP	Mensch	D. Cheresch
α -Actinin-GFP	Wildtyp	p-EGFP-N1	GFP	Mensch	C. Otey
Vinculin-YFP	Wildtyp	pEGFP-C3	YFP	Mensch	A. Bershadsky
pME-HA-STAM 1	Wildtyp	pME-HA	HA	Mensch	M. Komada
pME-HA-STAM 2	Wildtyp	pME-HA	HA	Mensch	M. Komada
Connexin43	Wildtyp	pEGFP-N1	GFP	Mensch	P. Martin

2.2.3. Transformation von Plasmiden in kompetente Zellen

2.2.3.1. Herstellung hitzekompetenter Bakterien

100 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* wurden bis zu einer optischen Dichte von 0,4 bei 37°C kultiviert und anschließend durch 15-minütige Zentrifugation (1900 x g, 4°C) geerntet. Das Sediment wurde in 50 ml eiskaltem 100 mM MgCl₂ aufgenommen, für 30 min auf Eis inkubiert, erneut zentrifugiert und in 50 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert. Nach einer weiteren 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Sedimentierung der Bakterien durch Zentrifugation. Die Zellen wurden in 2 ml 100 mM CaCl₂ aufgenommen und für 24 h bei 4 °C inkubiert, mit 0,5 ml Glycerin und 2,5 ml 100 mM CaCl₂ versetzt und in 100 μ l Aliquots bei -80°C gelagert.

2.2.3.2. Hitzeschocktransformation

Es wurden 1-5 µl des jeweiligen Ligationsansatzes zu den kompetenten Zellen gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock (80 sek bei 42° C) und eine sofortige Inkubation auf Eis für ca. 3 Minuten. Nach einer Zugabe von 300 µl LB-Medium und 15 µl Sucrose (20%) wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37° C schüttelnd inkubiert und danach auf LB-Agarplatten mit dem selektivem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert.

Bei Verwendung des Alligator-DNA-Ligations-Kits (Fa. Genaxxon, Stafflangen, Deutschland) erfolgte die Transformation hitzekompetenter Bakterien gemäß Anleitung.

2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese diente der Auftrennung, Reinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA.

1% [w/v] Agarose (Biozym LE GP Agarose, Fa. BiozymScientific GmbH, Oldendorf, Deutschland) wurde in 0,5 x TBE Elektrophoresepuffer (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 1 mM EDTA) gelöst und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die flüssige Agaroselösung wurde in einen Elektrophoresetank der (Sub-Cell GT Agarosegelelektrophoresesystem, Fa. Bio-Rad, München, Deutschland) gegeben und nach dem Erkalten mit 0,5 x TBE Puffer übergossen. Aufzutragende DNA-Proben wurden mit DNA-Auftragspuffer (0,25 % [w/v] Bromphenolblau, 0,25 % [w/v] Xylencyanol, 30 % [v/v] Glycerol, 50 mM EDTA) versetzt und in die Taschen des Agarosegels gegeben. Für die Ermittlung der Größe und der ungefähren Konzentration der DNA wurden zusätzlich 5 µl Smart-Ladder (Fa. PeqLab Biotechnologies, Erlangen, Deutschland) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80-110 Volt. Zur Visualisierung der elektrophoretisch aufgetrennten DNA wurde das Gel mit UV-Licht (312 nm) bestrahlt (UV-Illuminator Model N90M; Fa. UniEquip, Martinsried, Deutschland). Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer digitalen Kamera (Canon PowerShot S5Is, 8,0 MP, Fa. Canon, Tokyo, Japan).

2.2.5. Plasmid-Isolierung

Die Isolierung von Plasmiden erfolgte mit dem „QIA[®] Spin Miniprep Kit“ (Fa. Quiagen, Hilden, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers.

Für die Durchführung von Transfektionsversuchen wurden Endotoxin-freie Plasmid-Präparationen verwendet. Die Präparation Endotoxin-freier Plasmide erfolgte mit dem „Endofree[®] Plasmid Maxi Kit“ der Firma Quiagen (Hilden, Deutschland). Dadurch wurden aus der Bakterienmembran stammende Endotoxine entfernt. Die Durchführung erfolgte gemäß Anleitung des Herstellers.

2.2.6. DNA-Isolierung mittels Gelelution

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten, die mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, erfolgte mit dem „QIAquick[™] Gel-Extraction Kit“ der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers.

2.2.7. DNA-Restriktionshydrolyse

Der enzymatische Verdau mit Typ II Restriktionsendonukleasen wurde zur Vorbereitung von Insert- und Vektor-DNA für die Ligation, sowie zur Kontrolle von Vektoren eingesetzt. Die Menge der eingesetzten DNA betrug ca. 100-200 ng bei einem Gesamtvolumen des Ansatzes von 20 µl. Das optimale Ionen- und pH-Milieu wurde spezifisch für das oder die jeweils eingesetzten(n) Enzym(e) durch die Wahl des entsprechenden Restriktionspuffers gewährleistet. Das Endvolumen wurde durch die Zugabe von H₂O_{dd} erreicht. Für den präparativen Restriktionsverdau, z. B. für eine anschließende Aufreinigung per Gelelution, wurde das Volumen auf 40-100 µl erhöht.

Bei der Verwendung von zwei verschiedenen Restriktionsenzymen wurde entweder ein simultaner Verdau unter kompatiblen Pufferbedingungen durchgeführt oder, falls eine Inkompatibilität bestand, ein sequentieller Verdau. In diesem Fall wurde die DNA nach dem ersten Verdau mittels „QIAquick[™] PCR Purification Kit“ (Fa. Quiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt.

Tabelle 2.2. Allgemeiner Reaktionsansatz zum Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen.

Substanz	Menge
DNA	100 – 200 ng
10 x Puffer	2 µl
Restriktionsenzym 1	1 µl
ggf. Restriktionsenzym 2	1 µl
H ₂ O _{dd}	ad 20 µl

Restriktionshydrolysereaktionen wurden für 1h bei der für das jeweilige Restriktionsenzym vom Hersteller angegebenen optimalen Temperatur durchgeführt.

2.2.8. Ligation

Für die Ligation eines DNA-Fragments in einen Vektor wurden Zielvektor und Insert mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut, so dass kompatible Schnittstellen entstanden. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung per Gelelektion. Zur Ligation wurden 50 ng des geschnittenen und aufgereinigten Vektors und 250-500 ng des präparierten DNA-Fragments eingesetzt. Die Ligationsansätze wurden mit Hilfe des Alligator™-Kits (Fa. Genaxxon GmbH, Stafflangen, Deutschland) oder der T4-Ligase (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) nach den jeweiligen Herstellerangaben prozessiert, in hitzekompetente *E. coli*-Bakterien transformiert, in 300 µl LB-Medium mit 1% Glucose 30 min bei 37°C schüttelnd inkubiert und auf LB-Agarplatten mit dem selektivem Antibiotikum ausplattiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C über Nacht.

2.2.9. PCR-Reaktionen

2.2.9.1. Oligonukleotide

Zur Klonierung verwendete Oligonukleotide:

Name	Zielvektor	Sequenz
C-term-f	EGFP-N1	tgg aca gcc aca agc tta tgg cgc c
C-term-rev2	EGFP-N1	aac tgg gtc tgg atc cca gca tgt g
PP-f	EGFP-N1	acc gcc tcc aag ctt gtc gct gag
PP-r	EGFP-N1	agc cag gac agg atc ctc tgc aga
DrebrinEGFPN1-f	EGFP-N1	ggc ccg gtc gaa ttc gaa gca tg
CC-f	EGFP-N1	gaa gac gga tgg aat tct gga aat g
CC-r	EGFP-N1	gtg ggt ctc tgg atc ctc atc ccg
CC-253-R	EGFP-N1	acc aaa gat agg atc ctc ctt caa c
CC-187-F	EGFP-N1	gag cag gga att cag gaa gaa g
PPmal-for	pMAL-p2X	acc gcc tcc gga tcc gtc gct gag
PPmal-rev	pMAL-p2X	agc cag gac aaa gct ttc tgc aga c

Zur Mutation verwendete Oligonukleotide:

Name	Zielvektor	Sequenz
CC-T241A-F	EGFP-N1	gga aac agc agg ctt tag aag
CC-T241A-R	EGFP-N1	ctt cta aag cct gct gtt tcc
CC-T241EE-F	EGFP-N1	gga aac agc agg aag aat tag aag
CC-T241EE-R	EGFP-N1	ctt cta att ctt cct gct gtt tcc
CC-revS255A	EGFP-N1	ggg tct ctg gat cct cat ccc gat ggt cac caa aga tag cct gct c
CC-revS255EE	EGFP-N1	ggg tct ctg gat cct cat ccc gat ggt cac caa aga ttt ctt cct gct c

Sequenzierungs-Oligonukleotide:

Name	Bindungsort	Zielvektor	Sequenz (5' 3')
EGFP-N1-f	<i>upstream</i> der MCS	EGFP-N1	gca gag ctg gtt tag tga acc g
EGFP-N1-r2	<i>downstream</i> der MCS	EGFP-N1	cgtc gcc cgc gtc cag ctc gac cag
EGFP-C1-f	<i>upstream</i> der MCS	EGFP-C1	atc act ctc ggc atg gac
EGFP-C1-r	<i>downstream</i> der MCS	EGFP-C1	tct aca aat gtg gta tgg c
TagRFP-f	<i>upstream</i> der MCS	ptagRFP	acg gtg gga ggt cta tat aag
TagRFP-r	<i>downstream</i> der MCS	ptagRFP	agc ttc atg tgc atg ttc tcc
Mal-f	<i>upstream</i> der MCS	pMal-p2x	aag ccc tga aag acg cgc aga c
Mal-r	<i>downstream</i> der MCS	pMal-p2x	ggg gat taa gtt ggg taa cgc c

2.2.9.2. PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte. Sie wurde mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide („Primer“) im Thermocycler (Mastercycler gradient, Fa. Eppendorf, Hamburg; Primus 25 advanced, Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) durchgeführt. Die Temperatur des Annealing-Schrittes, sowie die Dauer der Extension variierten in Abhängigkeit der Länge der zu amplifizierenden DNA, sowie des verwendeten Oligonukleotid-Paares.

Standard-Reaktionsansatz

Substanz	Menge
10x Reaktionspuffer	5 µl
dNTP-Mix	1 µl (200 µM)
<i>forward</i> -Primer	0,5 µl (100 pmol)
<i>reverse</i> -Primer	0,5 µl (100 pmol)
DNA- <i>template</i>	100 ng
Taq-Polymerase	2 U pro Ansatz
H ₂ O _{dd} , steril	ad 50 µl

Standard-PCR-Protokoll

Schritt	Dauer
1. Denaturierung (95-98°C)	0,5 - 5 min
2. Denaturierung (95-98°C)	0,5 – 1 min
3. Annealing (55-72°C)	0,5 min
4. Elongation (72°C)	0,5 min / 1 kbp
5. 30-40 Zyklen der Schritte 2-4	
Finale Extension (72°C)	10 min

2.2.9.3. Bakterien- / Kolonie-PCR

Mit Hilfe der Bakterien-PCR ist es möglich, positive Klone direkt mittels PCR-Analyse zu identifizieren, ohne zuvor Plasmid-DNA isolieren zu müssen.

Pro kultivierter LB-Platte wurden 10-15 Klone mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 15 µl sterilem H₂O_{dd} resuspendiert. 5 µl der Bakteriensuspension wurden in 5 ml LB-Medium (mit selektivem Antibiotikum) überführt. Die übrige Menge wurde bei einer Temperatur von 95°C gekocht, um den Zellaufschluss zu gewährleisten. Die freigesetzte Plasmid-DNA wurde direkt für die PCR eingesetzt.

2.2.9.4. Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit dem „QIAquick™ PCR-Purification Kit“ oder per Gelelution mit dem „QIAquick™ Gel-Extraction Kit“ der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt.

2.2.10. Mutagenese

Punktmutationen in eukaryotischen Expressionvektoren wurden mit Hilfe des QuikChange™ Mutagenesis Kits (Fa. Stratagene, La Jolla, USA) nach Herstellerangaben, bzw. über PCR-Mutagenese mit den in Punkt 2.2.9.1. aufgeführten Oligonukleotiden eingeführt.

2.2.11. RNA-Interferenz (RNAi)

Vektorkodierte siRNA wurde mit Hilfe des psiSTRIKE™ U6 hairpin Cloning System hMGFP (Fa. Promega, Madison, USA) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden nach Herstel-

lerangaben geeignete Oligonukleotide entworfen und in den psiSTRIKE-Vektor eingesetzt. Dieser Vektor kodiert zusätzlich für (human)-hMGFP, wodurch eine Identifikation und Lokalisation transfizierter Zellen gewährleistet wird. Die Transfektion humaner Endothelzellen mit vektorkodierter siRNA erfolgte mit dem Microporator-System (Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) (s. 2.3.4.2.). Es wurden 5 µg vektorkodierte siRNA pro 1 Mio. Zellen eingesetzt.

Der *knock-down* von zellinternem Drebrin erfolgte alternativ durch Transfektion von HUVEC mit dem siGENOME SMARTpool DBN1 der Firma Dharmacon, (Lafayette, CO, USA). Für die Transfektion mit dem Microporator-System (MP-100) wurden 500 nmol siRNA pro 1 Mio. HUVEC eingesetzt. Als Kontrolle wurde eine unspezifische Sequenz eingesetzt.

Tabelle 2.3. Für Knock-down-Versuche eingesetzte Oligonukleotide und Sequenzen

Name	Sequenz (5'-3')
DrebrinU6-2-F	acc gtg cca ccc ttc tca act taa gtt ctc taa gtt gag aag ggt ggc act ttt tc
DrebrinU6-2-R	tgc aga aaa agt gcc acc ctt ctc aac tta gag aac tta agt tga gaa ggg tgg ca
shDreb2Csrc-F	acc gtc tcc ccc aat ctt tga caa gtt ctc tgt caa aga ttg ggg gag act ttt tc
shDreb2Csrc-R	tgc aga aaa agt ctc ccc caa tet ttg aca gag aac ttg tca aag att ggg gga ga
non spec. control	agg uag ugu aac cgc cuu gtt

2.3. Zellbiologische Methoden

2.3.1. Allgemeines

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank (Fa. BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland) mit Einmal-Kunststoffkulturflaschen (Fa. Corning, Corning, NY, USA) durchgeführt.

Alle Medien, Lösungen und Supplemente, die nicht bereits steril erworben wurden, wurden für die Zellkultur mit einem an eine Vakuumpumpe angeschlossenes 0,2-µm Filtermembranfiltrationssystem (Stericup, Fa. Millipore, Bedford, USA) oder mit 0,2-µm Spritzenfilter sterilisiert.

2.3.2. Isolierung und Kultur primärer humaner Endothelzellen aus der Nabelschnur

Die Präparation humaner primärer Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) erfolgte aus der Nabelschnur. Nach der äußerlichen Desinfektion der Nabelschnur mit 70% Isopropanol wurde dieselbe an einem sterilen Stativ vertikal aufgehängt. Mit Hilfe einer Knopfkanüle wurde die Nabelschnurvene penetriert. Die Kanüle wurde mittels Arterienklemmen fixiert. Durch das Spülen der Nabelschnurvene mit einer sterilen 37°C warmen PBS/Gentamycin-Lösung wurden Blutreste entfernt. Um verbleibende Reste dieser Lösung aus der Vene zu entfernen, wurde anschließend einmal mit einer Chymotrypsin-Lösung gespült, die ebenfalls Gentamycin enthielt. Nachdem das untere Ende der Nabelschnur ebenfalls abgeklemmt wurde, und die Nabelschnur mit der Chymotrypsin-Lösung bis zum leichten „Aufblähen“ gefüllt wurde, erfolgte ein 20-minütiger Inkubationsschritt bei 37°C, in dessen Verlauf sich die Endothelzellen von der Vene ablösten. Um die Endothelzellen zu ernten, wurde der Inhalt der Vene in einem sterilen 50 ml Röhrchen aufgefangen. Durch erneutes Spülen der Nabelschnurvene mit PBS/Gentamycin konnten zurückbleibende Zellen ebenfalls aufgefangen werden. Das Eluat wurde für 10 min bei 1400 rpm (Omnifuge 2.0RS) zentrifugiert. Das entstandene Zell-Sediment wurde in Kulturmedium aufgenommen, in einen sterilen Zellkulturkolben ausgesät und bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Der Überstand wurde frühestens nach 2 h gewechselt. Alle 3-4 Tage erfolgte ein erneuter Wechsel des Kulturmediums.

Zur Präparation verwendete Lösungen und Medien:

Chymotrypsin-Lösung: 100 mg/ml α -Chymotrypsin

Gentamycin-Lösung: 50 μ g/ml Gentamycin in PBS

Kulturmedium: ECGM (Fa. PromoCell, Heidelberg, Deutschland)

Für die Kultivierung von HUVEC wurden alle Zellkulturflaschen, Petrischalen und Deckgläser mit 75 μ g/ml steriler Kollagenlösung G (Fa. Biochrom KG, Berlin, Deutschland) gelöst in PBS (Dulbecco's PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺, Fa. PAA, Linz, Österreich) für 15 min bei RT beschichtet.

2.3.3. Ablösung von Endothelzellen

Humane Endothelzellen aus der Nabelschnur wurden nach Entfernung des Wachstumsmediums einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin aus Schwein und 0,2 g/l EDTA-Na₄ in HBSS, Fa. PAA Laboratories, Linz, Österreich) pro 75 cm²-Kolben für 1.2 min bei 37°C inkubiert. Die Trypsin-Aktivität wurde jeweils mit der doppelten Menge an Medium abgestoppt und die Zellen mittels Zentrifugation für 5 min bei 450 x g und 24°C (Omnifuge 2.0RS; Fa. Heraeus, Osterode, Deutschland) sedimentiert und subkultiviert, auf *coverslips* ausgesät oder für die Transfektion eingesetzt.

2.3.4. Transfektion / Elektroporation von HUVEC

HUVEC wurden entweder mit Hilfe des Nucleofektor-Systems, Modell I und II, der Firma Amaxa (Köln, Deutschland) oder des Microporator-Systems der Firma Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland) transfiziert.

2.3.4.1. Transfektion mit dem Nucleofektor-System

Für die transiente Transfektion von HUVEC wurde das HUVEC-Transfektionskit verwendet. Die Transfektion wurde laut Herstellerangaben durchgeführt. Für die Transfektion von 1 Mio. Zellen wurden durchschnittlich 2 µg DNA eingesetzt. Die optimale DNA-Menge musste für jedes Konstrukt individuell ermittelt werden.

2.3.4.2. Elektroporation mit dem Microporator-System

Für die transiente Transfektion von HUVEC mit dem Microporator-System der Firma Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland) wurden die in Tabelle 2.4. angegebenen Parameter eingestellt. Die Transfektion wurde laut Herstellerangaben im 10 µl- („MP-10“), bzw. 100 µl- („MP-100“) Maßstab durchgeführt. Für die Transfektion von 1 Mio. Zellen wurden durchschnittlich 5 µg DNA eingesetzt. Die optimale DNA-Menge musste für jedes Konstrukt individuell ermittelt werden.

Tabelle 2.4. Für die Transfektion von HUVEC verwendete Einstellung des Microporator-Systems

Parameter	
Pulsintensität	1350 V
Pulslänge	30 ms
Anzahl Pulse	1

2.3.5. Spreading assay

Um HUVEC auf ihre Fähigkeit zur Adhäsion und Ausbreitung hin zu untersuchen, wurden die Zellen nach der Transfektion mit GFP-Konstrukten, bzw. nach dem Drebrin-*knockdown* wie in Punkt 2.3.4. beschrieben abgelöst und auf mit Kollagen beschichtete *coverslips* ausgesät. Für den Drebrin *knockdown* wurden die Zellen für 4 Tage nach Transfektion kultiviert, um eine optimale Reduktion der Drebrin-Expression zu gewährleisten. Nach 15-240 min Adhäsionsdauer wurden die Zellen fixiert (s. Punkt 2.4.1.) und anschließend mittels spezifischer Antikörper und fluoreszenzmarkiertem Phalloidin gefärbt. Die Auswertung der Zellausbreitung erfolgte mit Hilfe des Programms „imageJ“.

2.3.6. FACS (fluorescence-activated cell sorting)

Die Sortierung von Endothelzellen nach der Intensität der exprimierten GFP-Konstrukte wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Michael Sixt (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) mit Hilfe des BD FACSAria *cell-sorting* Systems der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden HUVEC mittels Microporator-System (s. Punkt 2.3.4.2.) entweder mit Drebrin-GFP, bzw. dem GFP-Leervektor oder mit Drebrin-shRNA, bzw. einer Kontroll-shRNA transfiziert und über Nacht kultiviert. Für den Drebrin *knockdown* wurden die Zellen für 4 Tage nach Transfektion kultiviert, um eine optimale Reduktion der Drebrin-Expression zu gewährleisten. Am nächsten Tag erfolgte die Ablösung (s. Punkt 2.3.3.) und Resuspension der Zellen in PBS. Diese Zellsuspension wurde direkt für die FACS-Analyse eingesetzt.

Die sortierten Zellen wurden in PBS aufgefangen und anschließend in 15 ml-Röhrchen für 5 min bei 450 x g und 24°C (Omnifuge 2.0RS; Fa. Heraeus, Osterode, Deutschland) sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und auf Kollagenbeschichtete *coverslips* ausgesät.

2.3.7. Scratch wound assay

Für die Untersuchung ihrer Wundschlussfähigkeit wurden Endothelzellen mit einer Dichte von $1-1,5 \times 10^5$ auf Kollagen-beschichtete *cover slips* ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Für die Simulation einer Verletzung des Endothels wurde die konfluente Zellschicht mit einer sterilen 100 μ l Pipettenspitze (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) im 45°-Winkel X-förmig eingeritzt. Vom Zeitpunkt der Verletzung an wurden mittels Fixierung mit Formaldehyd (s. Punkt 2.4.1.1.) Zeitwerte von 0-4,5 h genommen und die Zellen anschließend gefärbt. Die Auswertung des Fortschritts der Wundheilung erfolgte mit dem Programm *imageJ*.

2.3.8. Tube formation assay

Die Fähigkeit zur Gefäßneubildung von HUVEC wurde untersucht, indem die Zellen auf Matrigel™ (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) ausgesät wurden. Zu diesem Zweck wurden 10 μ l Matrigel™, welches zuvor über Nacht auf Eis aufgetaut wurde, pro *well* auf μ -*slides angiogenesis* der Firma ibidi (Martinsried, Deutschland) pipettiert und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 10 μ l der vorbereiteten Zellsuspension mit einer Dichte von 7.500 Zellen pro *well* (entsprechend 60.000 Zellen/cm²) ausgesät. In Abständen von 60 min wurde die Entwicklung der *tubes* über 1-6 h mit Hilfe mikroskopischer Aufnahmen dokumentiert.

Die Auswertung erfolgte durch Immunfluoreszenzfärbung, sowie durch den „*tube formation assay evaluation – Service*“ der Firma S.CO-LifeScience (Garching b. München, Deutschland).

2.4. **Immunfluoreszenz und Mikroskopie**

2.4.1. Fixierung und Permeabilisierung

2.4.1.1. Formaldehyd / Aceton

Die auf *cover slips* ausgesäten Zellen wurden für 10 min in 3,7% [v/v] Formaldehyd in PBS bei RT fixiert. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung der Zellen durch Inkubation in eiskaltem Aceton bei -20°C. Um restliches Aceton abzutrennen wurden die *coverslips* abschließend in PBS + 1% [w/v] BSA gewaschen.

2.4.1.2. Methanol

Die auf *coverslips* ausgesäten Zellen wurden in eiskaltem Methanol bei -20°C für 60 sec fixiert und gleichzeitig permeabilisiert. Danach wurden die *coverslips* sofort in PBS + 1% [w/v] BSA gewaschen, um das restliche Methanol zu entfernen.

2.4.2. Färbung mittels spezifischer Antikörper

Die Immunfluoreszenzfärbung der fixierten und permeabilisierten Zellen erfolgte in einer feuchten Kammer. Zu diesem Zweck wurde in einer Plastikpetrischale eine Lage Parafilm (Fa. American National Can, Chicago, IL, USA) auf einem mit Wasser befeuchteten Zellstofftuch platziert, und 30 μl der vorbereiteten Antikörperlösung darauf pipettiert. Auf diese Weise konnte die Menge des eingesetzten Antikörpers so gering wie möglich gehalten und die Verdunstung eingeschränkt werden. Die *coverslips* wurden mit der Zellseite nach unten auf die vorpipettierte Lösung gegeben.

Die Färbung selbst erfolgte in drei Schritten. Zuerst erfolgte die Inkubation der Zellen mit PBS + 1% [w/v] BSA, 5% [v/v] NGS und 5% [w/v] NHS. Auf diese Weise wurden unspezifische Bindungen abgesättigt. Nach einem Waschschrift mit PBS + 1% [w/v] BSA wurden die Zellen für 45 min bei RT mit dem primären Antikörper inkubiert. Falls mehrere Proteine detektiert werden sollten, wurden die entsprechenden primären Antikörper sukzessive in mehreren Inkubationsschritten auf die Zellen gegeben. Durch dreimaliges Waschen mit PBS + 1% [w/v] BSA wurden nichtgebundene primäre Antikörpermoleküle von den Deckgläschen entfernt. Anschließend erfolgte die Färbung mit dem, bzw. den sekundären Antikörper(n) für 30 min bei RT. Die Färbung von F-Aktin erfolgte durch die Zugabe von fluoreszenzmarkiertem Phalloidin zeitgleich mit dem (den) sekundären Antikörper(n). Nach diesem Färbeschritt wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS + 1% [w/v] BSA gewaschen und anschließend auf einem Objektträger in Mowiol eingebettet. Zu diesem Zweck wurden 4 μl auf 37°C vorgewärmtes Mowiol auf den Objektträger pipettiert und die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf den Mowioltropfen gelegt. Mowiol enthält *p*-Phenylendiamin, welches als Anti-bleichmittel wirkt. Abschließend wurden die Deckgläschen mit Nagellack auf dem Objektträger versiegelt und fixiert.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.5. Verwendete primäre Antikörper

Antikörper gerichtet gegen	aus Spezies	Hersteller
Abl2	Maus	Fa. Abcam
α -Actinin	Maus	Fa. Santa Cruz
N-Cadherin	Kaninchen	Fa. Santa Cruz
VE-Cadherin [BV9]	Maus	Fa. GeneTex
VE-Cadherin	Maus	Fa. PharMingen
β -Catenin	Maus	Fa. BD Transduction Laboratories
Connexin 43	Kaninchen	Fa. Sigma
Crk	Maus	Fa. BD Transduction Laboratories
Drebrin E2A2	Meerschwein	Fa. Progen
Drebrin 823	Maus	W. Peitsch
Myosin IIa	Kaninchen	Fa. Sigma
PECAM-1	Kaninchen	Fa. Santa Cruz
Spectrin	Maus	Fa. Abcam

Tabelle 2.6. Verwendete sekundäre Antikörper

gekoppelter Farbstoff	Isotyp	aus Spezies	gerichtet gegen	Hersteller
Alexa Fluor® 488	IgG (H+L)	Ziege	Kaninchen	Molecular Probes
Alexa Fluor® 488	IgG (H+L)	Ziege	Maus	Molecular Probes
Alexa Fluor® 488	IgG (H+L)	Ziege	Meerschwein	Molecular Probes
Alexa Fluor® 568	IgG (H+L)	Ziege	Kaninchen	Molecular Probes
Alexa Fluor® 568	IgG (H+L)	Ziege	Maus	Molecular Probes
Rhodamin (TRITC)	IgG (H+L)	Ziege	Meerschwein	Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.
Alexa Fluor® 647	IgG (H+L)	Ziege	Kaninchen	Molecular Probes
Alexa Fluor® 647	IgG (H+L)	Ziege	Maus	Molecular Probes

2.4.3. Fluoreszenzmikroskopie

Die Analyse fluoreszenzmarkierter Zellpräparate erfolgte mittels der konfokalen *laser scanning* Mikroskope Leica DM IRB und Leica TCS SP5 (Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland).

Die Bildverarbeitung erfolgte anhand der Programme „imaging“ (Fa. Microsoft, Seattle, U-SA), „imageJ“ (National Institutes of Health, Washington, USA), „Photoshop“ (Fa. Adobe, San Jose, USA) und „CorelDraw“ (Fa. Corel, Ottawa, Kanada).

2.4.4. Live cell Mikroskopie

In vivo-Aufnahmen von humanen Endothelzellen wurden mit Hilfe des konfokalen „spinning disc“-Systems *UltraView Confocal Live Cell Imaging* (Fa. Perkin Elmer, Wellesley, USA) durchgeführt. Bei dem verwendeten Mikroskop handelte es sich um das inverse Mikroskop Eclipse TE300 der Firma Nikon (Düsseldorf, Deutschland). Die an das Mikroskop angeschlossene Inkubationskammer Modell Incubator Controller (EMBL, Heidelberg) sorgte für eine konstante Inkubation der beobachteten Zellen bei 37°C und 5% CO₂. Die Aufnahme und Erstellung der Filme erfolgte mit der UltraView Software Version 5.5.0.2 von Perkin Elmer (weitere Details s. Tabelle 2.7.)

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit einer Dichte von 5-8 x 10⁴ auf Kollagen-beschichtete *Glass Bottom Dishes* (Fa. MatTek, Ashland, USA) bzw. mit einer Dichte von 1,5-3 x 10⁵ auf *ibitreat*-Schälchen der Firma ibidi (Martinsried, Deutschland) pro Schälchen ausgesät. Zuvor erfolgte die Transfektion mit dem gewünschten GFP-, mRFP- oder YFP Konstrukt wie unter Punkt 2.3.4. beschrieben. Die Dauer der *in vivo*-Aufnahmen betrug je nach Experiment 10 bis 60 min.

Tabelle 2.7. Einzelkomponenten des konfokalen „spinning disc“-Systems *UltraView LCI* der Fa. Perkin Elmer.

Mikroskop	Eclipse TE300 (Fa. Nikon, Düsseldorf, Deutschland)
Objektive	Plan Apo 60x/1,4 Öl, Ph3 DM, ∞/0,17 WD 0,21 (Fa. Nikon, Düsseldorf, Deutschland) Plan Apo 100x/1,4 Öl, DIC H, ∞/0,17 WD 0,13 (Fa. Nikon, Düsseldorf, Deutschland)
Konfokale Einheit	CSU10 (Fa. Yokogawa Electric Corporation, Tokio, Japan)
Laser	Argon Laser Serie 43; optimiert für die Linien: 488 nm/514 nm; Argon/Krypton Mischgas-Laser Serie 43; optimiert für die Linien: 568 nm/674 nm (Melles-Griot, Carlsbad, USA)
<i>shutter-driver</i>	Lambda 10-2 (FA. Sutter Instruments, Navato, USA)
Laser Combiner	Prairie Technologies (Middleton, USA)
Quecksilber-Kurzbogen-Lampe	HBO; Osram (München, Deutschland)
Kamera	Orca ER, „scan interline“ CCD-Kamera (1344x1024, 12-bit); Hamamatsu (Herrsching am Ammersee, Deutschland)
Piezo-Stepper („Z-Stepper“)	Servo Position Controller PZ73E; Physik Instrumente, Waldbronn - Deutschland
Inkubationskammer	EMBL (Heidelberg, Deutschland)
CO ₂ -Regelung	GP 168; EMBL (Heidelberg, Deutschland)
Steuerung für die Inkubationsbox	EMBL (Heidelberg, Deutschland)

2.5. Proteinbiochemische Methoden

2.5.1. Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BIO-RAD Protein *Assay*, das auf der Methode nach Bradford (1976) beruht.

Als Proteinstandard für den Protein-*Microassay* (1-20 µg Protein; 25 µg/ml) wurde BSA in den Konzentrationen 20 µg/ml, 15 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml und 1 µg/ml eingesetzt.

Zur Bestimmung der Proteinmenge wurden zu 800 µl Probe (Proteinstandard in der oben angegebenen Konzentration) 200 µl *Dye Reagent Concentrate* gegeben. Als "Nullwert" wurden 800 µl Puffer eingesetzt. Die so entstandenen Lösungen wurden mit Hilfe des Vortex-Gerätes gemischt. Nach einer Inkubationsdauer von 5 min bis 1 h erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm. Die Standardwerte der BSA-Proben wurden gegen die eingesetzte Proteinmenge aufgetragen und dienten als Eichkurve. Aus der Eichkurve ließen sich dann die Proteinkonzentrationen ablesen.

2.5.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli

Zur Auftrennung von Protein nach ihrer Größe wurden die Proben mit Probenpuffer nach Laemmli (0,5 M Tris-HCL, 20 % Glycerin, 8 % [w/v] SDS, 10 % [v/v] Bromphenolblau) versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Die Auftragsmenge betrug je nach Gelgröße 30, bzw. 60 µl. Auf jedes Gel wurde zusätzlich eine Spur eines Größenstandards (10 µl, *peqGOLD Prestained Protein-Marker III*; Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) aufgetragen, um die Größe der aufgetrennten Proteine abschätzen zu können (5 bzw. 15 µl, je nach Gelgröße).

Die Gelelektrophorese erfolgte bei konstant 100 V (kleines Gel) oder bei konstant 45 mA (großes Gel).

2.5.3. Molekulargewichtsbestimmung

Zur Abschätzung der molekularen Masse der aufgetrennten Proteine wurden die Laufstrecken der Markerproteine (s. Punkt 2.5.2.) vom oberen Rand des Trenngels gemessen und gegen den Logarithmus der molekularen Massen aufgetragen. Die apparenten molekularen Massen der zu bestimmenden Proben wurden aus der so erhaltenen Eichkurve abgelesen.

2.5.4. Coomassie-Färbung (Weber und Osborn, 1969)

Die Polyacrylamidgele wurden für 30 Minuten in Coomassie-Färbelösung (0,25 % [w/v] Serva-Blau-R250, 22,7 % [v/v] Methanol) inkubiert und anschließend bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes in Entfärber (33 % [v/v] Methanol, 10 % [v/v] Eisessig) gewaschen.

2.5.5. Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987, modifiziert)

Die Polyacrylamidgele wurden für 1 h in Fixierlösung (50% [v/v] Methanol, 0,8% [v/v] Eisessig, 0,002% [v/v] Formaldehyd) fixiert. Anschließend wurden die Gele 3 x 10 min mit 50 % [v/v] Ethanol gewaschen und für 1 min in Thiosulfatlösung (0,02% Na₂SO₄O₃ x 5 H₂O) geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen für je 20 s in H₂O_{dd} wurden die Gele 20 min imprägniert (Imprägnierlösung: 0,2% [w/v] AgNO₃, 0,075% [v/v] Formaldehyd). An erneutes Waschen mit H₂O_{dd} schloss sich die Entwicklung mit 9% [w/v] Na₂CO₃ x 10 H₂O, 1% [v/v] Thiosulfatlösung, 0,1% [v/v] Formaldehyd) an. Sobald die Proteine deutlich zu sehen waren, wurde die Entwicklung mit 0,186% [w/v] EDTA gestoppt.

2.5.6. Western Blot

Diese Methode diente dem immunologischen Nachweis von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen. Der Transfer vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran (Fa. Pall, Portsmouth, Großbritannien) erfolgte nach dem Tankblot-Verfahren (Tankblotkammer Modell EB10, Fa. Scie-Plas, Gainsborough, Großbritannien). Zum Äquilibrieren der Membran wurde diese für wenige Sekunden in 100% Methanol geschwenkt und anschließend für 10 min bei RT in *Blotting*-Puffer (25 mM Tris-Base, 96 mM Glycin) mit 20% Methanol inkubiert. Die Membran, das Gel und das Filterpapier (Fa. Whatman, Maldstone, USA) wurden direkt vor Gebrauch in *Blotting*-Puffer getränkt. Der Transfer erfolgte für 1 h bei konstant 80 V. Anschließend wurde die Membran entnommen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h in TBST-Puffer (20 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, 0,3 % Tween, pH 7,4) mit 2,5% BSA (Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland) und 5% Magermilchpulver (Fa. Biorad, München, Deutschland) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST wurde die Membran für 1 h in TBST geschwenkt, dem der primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 bis 1:2000 zugesetzt worden war. Nicht gebundene und nichtspezifisch gebundene primäre Antikörper wurden durch dreimaliges 10-minütiges Waschen mit TBST entfernt. Anschließend

wurde die Membran für 1 h mit HRP-gekoppelten Antikörpern (Fa. Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) in TBST inkubiert. Nach weiterem dreimaligem 10-minütigen Waschen wurde die Membran für 10 min in *Super Signal® West Pico Luminol Enhancer* und *Super Signal® Stable Peroxide Solution* Detektionslösung (Fa. Pierce, Rockford, IL, USA) inkubiert. Die Lichtemission bei der Umsetzung der Detektionslösung durch die Meerrettichperoxidase wurde durch (zeitlich der Stärke des Signals entsprechendes) Auflegen eines Röntgenfilmes (Fa. Kodak AG, Stuttgart, Deutschland) dokumentiert.

2.5.7. Expression und Aufreinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie

2.5.7.1. GST-Fusionsproteine

Für die Expression von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen wurden 37°C Übernachtskulturen von Bakterien, die das zu exprimierende Plasmid enthielten, in 100 ml LB Medium mit selektivem Antibiotikum angeimpft. 1 ml der jeweiligen Übernachtskultur wurde am nächsten Tag zu 1 l LB-Medium mit selektivem Antibiotikum gegeben und bei 37°C schüttelnd inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4 wurde die Expression des GST-Fusionsproteins mit 1 mM IPTG induziert und weitere 2,5 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation (5 min, 4400 x g) sedimentiert, die Sedimente in vorgekühltem PBS gelöst und in einem 50 ml Reaktionsgefäß vereinigt. Die Suspension wurde mit kaltem PBS auf 50 ml aufgefüllt und erneut für 20 min mit 3020 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 10-20 ml Lysepuffer (50 mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin, 475 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Pefabloc) resuspendiert.

Die Bakteriensuspension wurde mit 65 W insgesamt sechsmal für 10 sec mit Ultraschall aufgeschlossen und die Zellreste für 30 min bei 50000 g (Ultrazentrifuge OptimaTM, Rotor TLA-100, Fa. Beckman Coulter, Fullerton, USA) abzentrifugiert. Währenddessen wurden 1-2 ml GST-Sepharose-beads 3 min bei 4°C in Lysepuffer äquilibriert und danach bei 121 x g für 2 min bei 4°C zentrifugiert (Zentrifuge Centricon H-401, Kontron Instruments, Watford, Großbritannien; Rotor A8.24). Der Proteinüberstand der Ultrazentrifugation wurde auf die Kugeln gegeben und 1h bei 4°C inkubiert. Die Kugeln wurden anschließend fünfmal mit Lysepuffer ohne DTT und einmal mit Resuspensionspuffer (50 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, 5 mM

MgCl₂, 2,5 mM NaCl, 1 mM DTT) gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert und das Protein von den Kugeln eluiert.

2.5.7.2. Elution mit Glutathion

Zur Elution des Fusionsproteins wurden die Sephadrose-*beads* sechs- bis achtmal mit je 1 ml Resuspensionspuffer plus 10 mM Glutathion behandelt. Dabei wurden die Kugeln bei jedem Schritt vier- bis sechsmal mit der Puffer/Glutathion-Lösung gevortext und anschließend 5 min bei 3020 x g (Zentrifuge Centricon H-401, Kontron Instruments, Watford, Großbritannien; Rotor A8.24) abzentrifugiert. Die aus den Elutions- und Zentrifugationsschritten resultierenden Überstände wurden vereinigt und gegen Dialysepuffer (10 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM DTT) dialysiert. Nach der Dialyse wurde die Proteinmenge wie unter Punkt 2.5.1 beschrieben bestimmt.

2.5.8. MBP-Fusionsproteine

Zur Expression eines MBP (*maltose-binding protein*)-Fusionsproteins wurde eine 37°C Übernachtskultur von Bakterien, die das zu exprimierende Plasmid enthielten, in 100 ml LB-Medium mit selektivem Antibiotikum angeimpft. 1 ml der Übernachtskultur wurde am nächsten Tag zu 1 l LB-Medium mit selektivem Antibiotikum gegeben, mit 2 g Glucose versetzt und für 2,5 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Danach wurde die Expression des Fusionsproteins mit 0,5 M IPTG induziert und erneut bei 37°C 2,5 h schüttelnd inkubiert.

Anschließend wurden die Bakterien durch fünfminütige Zentrifugation bei 4350 x g, 4°C (Zentrifuge Centricon H-401, Kontron Instruments, Watford, Großbritannien; Rotor A8.24) geerntet und danach mittels Sonifikation aufgeschlossen. Die Zellreste wurden in der Ultrazentrifuge (OptimaTM, Rotor TLA-100, Fa. Beckman Coulter, Fullerton, USA) für 10 min bei 100000 x g abzentrifugiert.

Währenddessen wurden 2 ml Säulenmaterial in Säulenpuffer (20 mM Tris pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA) für 1h bei 4°C äquilibriert und anschließend bei 121 x g, 4°C (Centricon H-401, Kontron Instruments, Watford, Großbritannien; Rotor A8.24) zentrifugiert. Das Sediment nach der Ultrazentrifugation wurde verworfen, der Überstand zum äquilibrierten Säulenmaterial gegeben und für 1h bei 4°C inkubiert. Nicht gebundenes Protein wurde durch

sechsmaliges Waschen mit Säulenpuffer entfernt und das MBP-Fusionsprotein anschließend fünfmal mit 1 ml Maltoselösung (3,6 g/ml in Säulenpuffer) eluiert.

2.5.9. Interaktionsstudien

2.5.9.1. Herstellung von Lysaten aus humanen Zellen

HUVEC wurden zweimal mit PBS (Dulbecco's PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , Fa. PAA; Linz, Österreich) gewaschen und mit Hilfe eines Zellschabers (Fa. TPP, Trasadingen, Schweiz) in 600 μl entsprechendem Lysepuffer vom Kulturgefäß entfernt. Die Zusammensetzung des Lysepuffers variierte je nach zu präzipitierendem Protein. Der Zellaufschluss erfolgte durch 30-minütige Inkubation in detergenschaltigem Lysepuffer bei 4°C. Durch 10-minütige Zentrifugation bei 3500 x g bei 4°C wurden Zelltrümmer entfernt und der Überstand in Immunpräzipitationsversuchen, bzw. im GST- / MBP-*pulldown* eingesetzt.

2.5.9.2. Immunpräzipitation

Zur Immunpräzipitation wurde das μMACS -Kit (Fa. Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland) verwendet. 2 μg des jeweiligen Antikörpers wurden mit 50 μl Protein A oder Protein G gekoppelten Magnet-*beads* zum Zell-Lysat gegeben und für 1 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. μMACS -Säulen wurden im μMACS -Multi-Ständer mit 400 μl Lysepuffer äquilibriert und das Gemisch aus Zell-Lysat, Antikörper und Protein A-, bzw. G- *beads* darauf gegeben. Der Durchlauf wurde aufgefangen, die Säulen wurden viermal mit je 200 μl Lysepuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 50 μl 95°C heißem SDS-Puffer nach Lämmli.

2.5.9.3. GST- / MBP- *pulldown*

200 μl einer Glutathion-Sepharose 48-Lösung (Fa. GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, Großbritannien) bzw. einer Amylose-Lösung (Fa. New England Biolabs, Beverly, USA) wurden dreimal mit 1 ml PBS gewaschen und dabei jeweils durch Zentrifugation bei 4°C und 500 x g für 1 min sedimentiert. Nach Äquilibrieren mit 1 ml RIPA-Puffer (50 mM Tris pH 7,4; 1% [v/v] Triton X-100, 75 mM NaCl, 10 mM MgCl_2) wurde nach Sedimentieren der Sepharose, bzw. Amylose das GST- bzw. MBP-Fusionsprotein in 1 ml RIPA zugegeben und für 1 h bei 4°C im Überkopfschüttler gemischt. Anschließend wurde die Sepharose

bzw. Amylose durch erneutes Zentrifugieren sedimentiert. Das Zell-Lysat wurde wie unter Punkt 2.5.12.1. beschrieben mit RIPA-Puffer hergestellt und zu der Glutathion-Sepharose, bzw. Amylose gegeben und für 1 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 1 ml RIPA wurde das Sediment in 100 µl SDS-Probenpuffer nach Lämmli aufgenommen.

2.5.9.4. GFP-Immunpräzipitation

Zur Präzipitation von in Endothelzellen synthetisierten GFP-Fusionsproteinen wurde das µMACS GFP *Tagged Protein Isolation Kit* der Firma Miltenyi (Bergisch-Gladbach, Deutschland) verwendet. Zum Zell-Lysat wurden 50 µl anti-GFP Magnet-*beads* gegeben und für 30min bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. µMACS-Säulen wurden im µMACS-Multi-Ständer mit 400 µl Lysepuffer äquilibriert und das Gemisch aus Zell-Lysat und Magnet-*beads* darauf gegeben. Der Durchlauf wurde aufgefangen, die Säulen wurden viermal mit je 200 µl Lysepuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 50 µl 95°C heißem SDS-Puffer nach Lämmli.

2.5.9.5. SH3 domain array

Proteininteraktionsstudien zur Prolin-reichen Domäne innerhalb des Drebrinmoleküls wurden anhand des „TranSignal™ SH3 *Domain array I*“ der Fa. Panomics (Redwood City, CA, USA) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die Versuchsanordnung beruht auf einer Anordnung aufgereinigter SH3-Domänen unterschiedlicher Proteine, welche auf einer Membran als immobilisierte *spots* vorliegen. Für diesen Versuch wurde der bakteriell generierte, aufgereinigte prolinreiche Abschnitt des Drebrinmoleküls (als MBP-Fusionsprodukt „DrebPP-MAL“) eingesetzt. Nach der Inkubation der Membran mit DrebPP-MAL ließen sich mittels Chemolumineszenz Aussagen zur Interaktion von Drebrin mit den isolierten SH3-Domänen treffen.

2.5.10. G-LISA

Für die Messung von aktiviertem RhoA in HUVEC wurde der RhoA G-LISA™ *Activation Assay Biochem Kit*™ (Fa. Cytoskeleton, Denver, USA) verwendet. Es handelt sich um ein auf dem ELISA-Prinzip beruhendes Verfahren, mit dessen Hilfe RhoA-GTP gemessen wird. HUVEC wurden laut Herstellervorgaben zu Lysaten verarbeitet und in mit der RBD-Domäne

der Rho-Familien-Effektoren beschichteten 96-well Platten inkubiert. Auf diese Weise wurde im Lysat vorliegendes RhoA-GTP gebunden, jedoch nicht die inaktive GDP-Form. Die Detektion erfolgte sukzessiv über einen spezifischen primären Antikörper und einen HRP (*horse radish peroxidase*)-gekoppelten sekundären Antikörper. Die Detektion erfolgte kolorimetrisch nach Zugabe eines HRP-Detektionsreagenz bei einer Wellenlänge von 490 nm.

3. ERGEBNISSE

3.1. Lokalisierung von Drebrin in HUVEC: Podosomen und Aktin waves

In einer früheren Arbeit aus unserem Labor (A.-E. Osiak, 2007) konnte gezeigt werden, dass HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*), vergleichbar zu Makrophagen und Osteoklasten, in der Lage sind, podosomale Adhäsionsstrukturen zu bilden. Es wurde beobachtet, dass einzelne HUVEC-Podosomen sich zu sich zu kreisförmigen Überstrukturen zusammenschließen können. Ein wichtiger Befund bei der Untersuchung ihrer Funktion war dabei einerseits der Nachweis Matrix-degenerativer Eigenschaften. Zudem wurden klassische Komponenten von Podosomen als Bestandteile der endothelialen Strukturen identifiziert (z. B. N-WASP, Talin, Vinkulin, etc.). In HUVEC treten Podosomen vor allem bei Subkonfluenz oder nach Verwundung eines bereits vollständig ausgebildeten Monolayers in Erscheinung. Es wurde ebenfalls die vornehmliche Lokalisierung an der Zellperipherie festgestellt (Osiak *et al.*, 2005). Diese Phänomene sprechen für eine Beteiligung der Podosomen an Adhäsion und Migration.

Das Protein Drebrin konnte in einem umfangreichen *screening* Verfahren ebenfalls als Bestandteil von HUVEC-Podosomen identifiziert werden. Mit seiner Hilfe ist es möglich, HUVEC-Podosomen in mikroskopischen Analyseverfahren gegen den relativ hohen Aktin-Hintergrund abzuheben, wie in Abb. 3.1. A erkennbar ist, da es sich spezifisch in Podosomen und der Zellperipherie anlagert. Mikroskopische Präparate fixierter Zellen lassen allerdings nur wenig Spielraum bezüglich der Unterscheidung zwischen podosomalen Überstrukturen und den ebenfalls Drebrin enthaltenden Aktin waves zu (s. Abb. 3.1. A und B). Mit Hilfe der *live cell* Mikroskopie konnte in unserer Arbeitsgruppe festgestellt werden, dass sich Aktin waves durch eine weitaus größere räumliche Dynamik und ihre subzelluläre Lokalisation von Podosomen-Überstrukturen unterscheiden (s. Punkt 1.6., Abb. 1.7.). In Abb. 3.2. ist dieser Unterschied in der subzellulären Lokalisation schematisch dargestellt. Während Podosomen, vornehmlich in der Zellperipherie zu finden sind, erstreckt sich das Vorkommen von Aktin waves über die gesamte Zelle. Letztere unterliegen einem Entwicklungsprozess, der sie von ihrem Entstehungsort im zentralen Bereich der Zelle, wo sie als dichte Aggregate erscheinen, in Richtung der Zellperipherie führt. Auf diesem Weg breiten sie sich wellenförmig aus. Anschließend erfolgt meist „Verschmelzen“ der Wellenstruktur mit der Zellperipherie. Die zellphysiologische Bedeutung von Aktin waves war – im Gegensatz zu Podosomen – bisher nicht klar und sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit, vor allem im Zusammenwirken mit dem Protein Drebrin, untersucht werden.

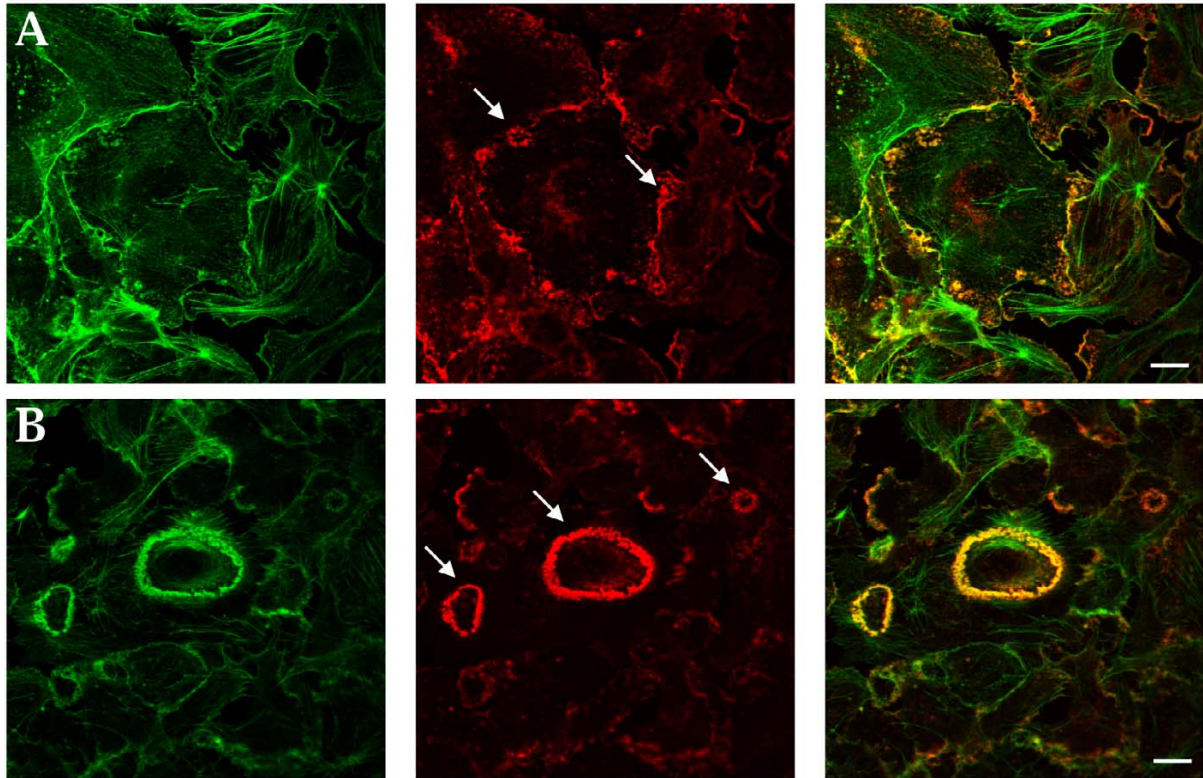


Abb. 3.1. Drebrin lokalisiert an Podosomen und Aktin waves in HUVEC

Immunfluoreszenzaufnahmen von HUVEC mit Drebrin (rot) und Aktin (grün). Überlagerung der Fluoreszenzsignale in gelb. (A) Obwohl sowohl Aktin als auch Drebrin Bestandteile podosomaler Strukturen (Pfeil) sind, ermöglicht die Fluoreszenzmarkierung von Drebrin eine leichtere Lokalisierung dieser Strukturen innerhalb der Zelle; (B) Drebrin ist in Aktin waves (Pfeile) ebenfalls stark angereichert; weiße Balken: 10 μm

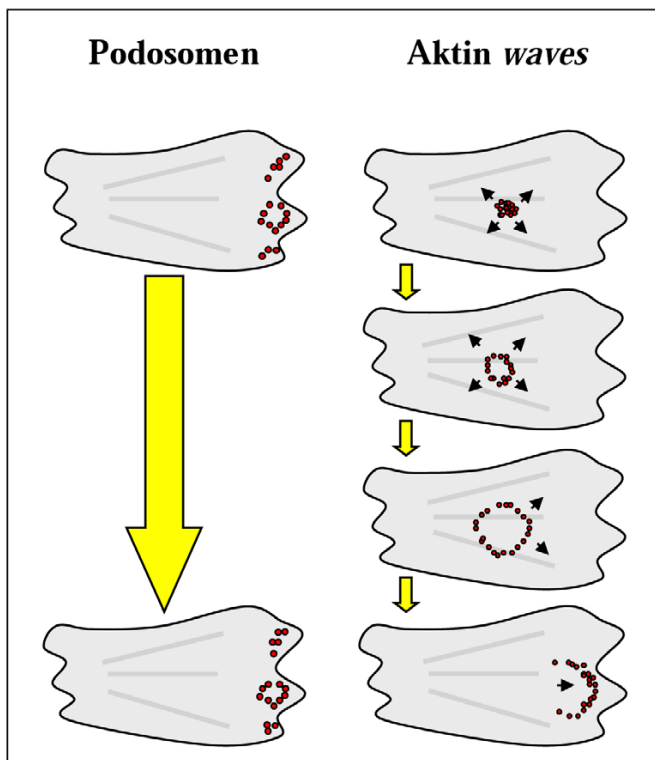


Abb. 3.2.

Schematischer Vergleich zwischen Drebrin-reichen Strukturen in HUVEC

Die Unterscheidung zwischen Podosomen und Aktin waves erfolgte vor allem mit Hilfe der *live cell* Mikroskopie.

Linke Seite: Podosomen befinden sich in der Zellperipherie und können sich zu kreisförmigen Überstrukturen zusammenlagern. Es besteht nur eine geringe räumliche Dynamik;

Rechte Seite: Aktin waves entstehen im zentralen Bereich der Zelle und breiten sich innerhalb weniger Minuten kreis- und wellenförmig in Richtung Zellperipherie aus, wo zeitgleich protrusive Strukturen gebildet werden können.

3.2. Drebrin ist essentiell für die Bildung von Aktin waves

Durch den *knockdown* von Drebrin in HUVEC und die anschließende Quantifizierung der gebildeten Aktin waves sollte nachgewiesen werden, welche Relevanz Drebrin bei der Bildung dieser Strukturen spielt. HUVEC wurden für diesen Versuch mit Drebrin-spezifischer siRNA, bzw. einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert und für vier Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen erneut auf Kollagen ausgesät und nach einer Stunde fixiert, da zu diesem Zeitpunkt die Rate an gebildeten Aktin waves besonders hoch ist (s. Punkt 3.3.). Die Zellen wurden mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin markiert, um die Aktin waves zu visualisieren.

Die Effektivität des Drebrin *knockdowns* wurde durch die Analyse von Zell-Lysaten im Western Blot Verfahren bestätigt. Es wurden spezifische Antikörper gegen Drebrin, bzw. β -Tubulin für die Detektion eingesetzt. Der Drebringehalt geht vier Tage nach der Transfektion mit der spezifischen siRNA bis unter die Nachweisgrenze zurück während das Kontrollprotein β -Tubulin weiterhin konstant gebildet wird (s. Abb. 3.3. B). Mit Hilfe konfokalmikroskopischer Aufnahmen konnte beobachtet werden, dass die Transfektion von HUVEC mit Drebrin-spezifischer siRNA zu einem signifikanten Rückgang der Aktin waves auf $6,7\% \pm 1,9\%$ im Vergleich zu Zellen, die mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert worden waren, führt (s. Abb. 3.3 A). Drebrin besitzt somit offensichtlich eine regulatorische Funktion beim Aufbau oder der Aufrechterhaltung von Aktin waves.

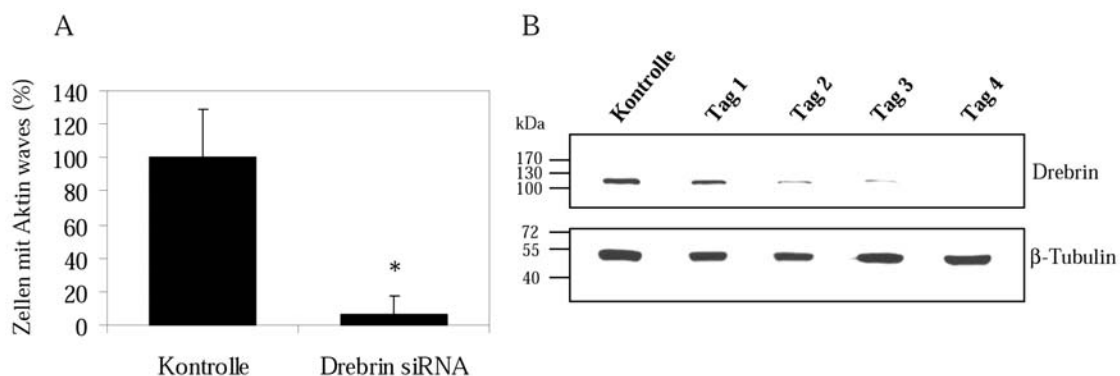


Abb. 3.3. Drebrin *knockdown* führt zur Abnahme von Aktin waves in HUVEC

HUVEC wurden mit Drebrin-spezifischer siRNA, bzw. unspezifischer Kontroll-siRNA transfiziert. (A) Vier Tage nach der Transfektion wurden die Zellen für eine Stunde erneut auf Kollagen kultiviert. Nach der Fixierung der Zellen erfolgte die Fluoreszenzfärbung von Aktin, um Aktin waves zu visualisieren und zu quantifizieren; * $p < 0,01$; (B) Einen bis vier Tage nach der Transfektion wurden Lysate angefertigt und im Western Blot Verfahren auf ihren Drebrin-(oben) bzw. β -Tubulingehalt (unten) hin untersucht. Es wurden vergleichbare Proteinkonzentrationen eingesetzt. Die Drebrinkonzentration geht innerhalb von vier Tagen bis unter die Nachweisgrenze zurück während die β -Tubulin-Menge konstant bleibt (Kontrolle in B= nicht transfizierte HUVEC).

3.3. Untersuchung der Rolle von Drebrin in der Ausbreitung (*spreading*) von HUVEC

Durch Adhäsionsversuche konnte festgestellt werden, dass die Bildung von Drebrin-reichen, hochdynamischen Aktin *waves* in HUVEC in verschiedenen Stadien der Adhäsion unterschiedlich stark ausgeprägt ist (s. Abb. 3.4.). HUVEC wurden auf Kollagen kultiviert, nach 1 oder 24 h mit Formaldehyd fixiert, in Aceton permeabilisiert und F-Aktin mit Alexa-568-fluoreszenzmarkiertem Phalloidin markiert. Zellen, die nur 1h kultiviert worden waren, zeigten eine Aktin *wave* Bildungsrate von bis zu 60%. Dagegen weisen Zellen, die 24h auf Kollagen kultiviert worden waren eine Bildungsrate von 20-30 % auf.

In dem beobachteten kurzen Zeitraum der Kultivierung, in dem die Aktin *waves* Bildungsrate erhöht ist, spielen sich wichtige Prozesse der Adhäsion, Zellausbreitung und Protrusion, aber auch der Zellkontaktbildung, -morphologie und -migration ab. Daher stellte sich die Frage, welche Funktion Aktin *waves* im allgemeinen, und Drebrin im spezifischen Zusammenhang mit diesen Prozessen zukommt.

Um eine Aussage über die Beeinflussung der Ausbreitungsfähigkeit von HUVEC durch Drebrin treffen zu können, wurde dessen Proteinlevel modifiziert. Zu diesem Zweck wurden HUVEC entweder mit Drebrin-GFP transfiziert, oder mit Hilfe spezifischer siRNA behandelt. Die daraus resultierende Überexpression, bzw. der *knockdown* von Drebrin, wurden anhand eines sogenannten *spreading assays* evaluiert. Die behandelten Zellen wurden zu diesem

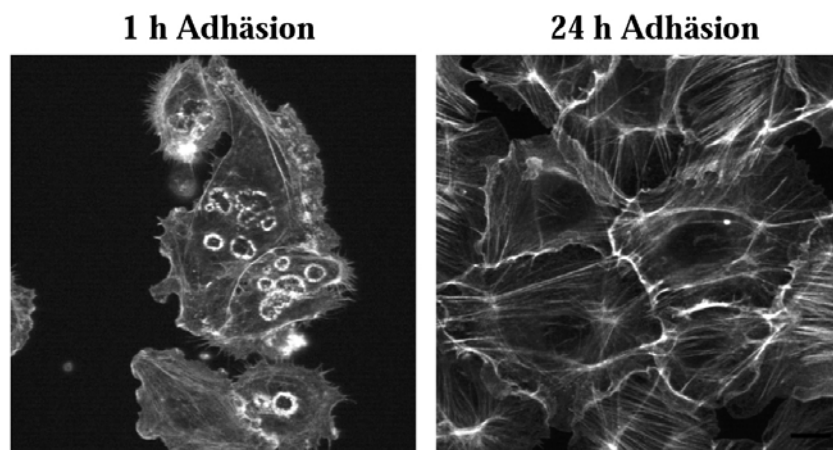


Abb. 3.4. Nach kurzer Adhäsionsdauer ist die Ausbildung Drebrin-reicher Aktin *waves* in HUVEC stark erhöht

HUVEC wurden für 1 bzw. 24 h auf Kollagen kultiviert und anschließend fixiert. F-Aktin wurde mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin visualisiert; Rechte Seite: HUVEC nach 24 h auf Kollagen; Linke Seite: HUVEC nach 1 h Adhäsion auf Kollagen; Die Ausbildung von Aktin *waves* ist nach einer Stunde deutlich stärker ausgeprägt als nach 24 h (s. Text); weißer Balken: 10 µm

3. Ergebnisse

Zweck auf Kollagen-beschichtete *coverslips* ausgesät und nach 15, 30, 45, 60, 90 und 240 Minuten fixiert. Anschließend erfolgte die Visualisierung von F-Aktin mit Alexa-568-fluoreszenzmarkiertem Phalloidin. Die gefärbten Zellen wurden mit Hilfe eines 40er Objektivs des Leica TCS SP5 Konfokalmikroskops aufgenommen. Die erhaltenen Bilder wurden mit dem Programm „imageJ“ ausgewertet, indem der jeweils größte Zelldurchmesser erfasst wurde.

Abb. 3.5. A zeigt, dass der Adhäsions- bzw. Ausbreitungsverlauf Drebrin-transfizierter HUVEC sich nur in geringem Maßstab vom Kontrollansatz unterscheidet. Bereits nach einer Stunde Adhäsionsdauer ist ein durchschnittlicher Zelldurchmesser von $56,1 \pm 19,3 \mu\text{m}$ erreicht. Nach 240 Minuten ist er mit $56,8 \pm 23,6 \mu\text{m}$ nur geringfügig größer. Die Kontrollzellen wiesen zu den angegebenen Zeitpunkten einen durchschnittlichen Durchmesser von $50,9 \pm 17,2 \mu\text{m}$ (60 min), bzw. $61,3 \pm 26,4 \mu\text{m}$ (240 min) auf.

Der *knockdown* von zellinternem Drebrin (s. Abb. 3.5. B) hatte ebenfalls keine signifikante Beeinträchtigung oder Verbesserung der Zelladhäsion und -ausbreitung zur Folge. Die Kontrollzellen wiesen nach 60, bzw. 240 min einen durchschnittlichen Durchmesser von $49,7 \pm$

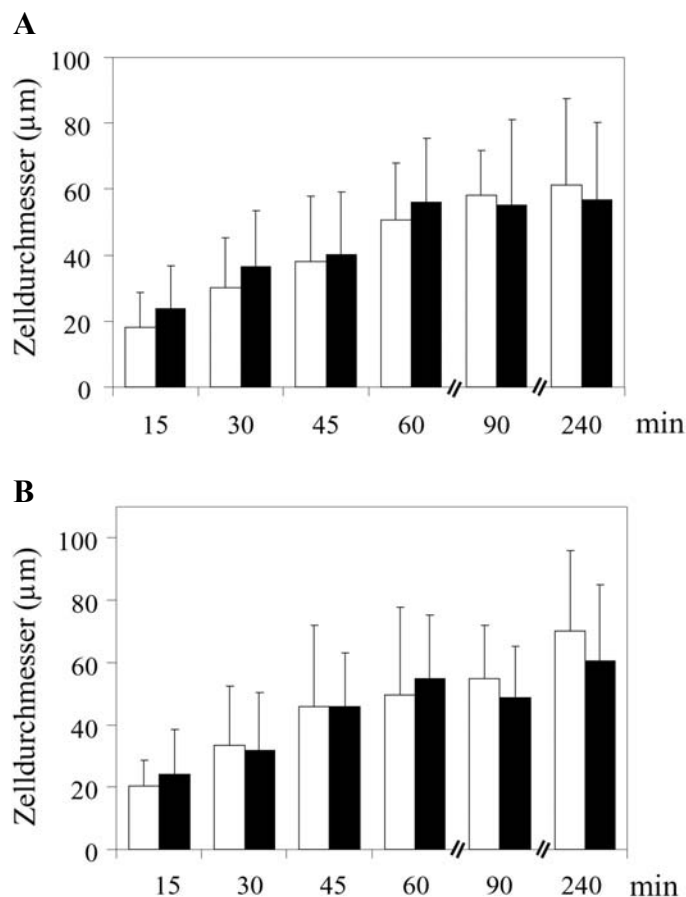


Abb. 3.5. Quantifizierung der Ausbreitung von HUVEC nach Überexpression von Drebrin-GFP bzw. Drebrin *knockdown* durch spezifische siRNA (*spreading assay*)

(A) HUVEC wurden mit Drebrin-GFP (schwarz), bzw. dem GFP-Leervektor (weiß) transfiziert, nach 16 Stunden auf mit Kollagen beschichtete *coverslips* ausgesät und nach 15 bis 240 min fixiert. Nach der Anfärbung von F-Aktin mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin erfolgte die Auswertung des Zelldurchmessers.

(B) Quantifizierung der Ausbreitung von HUVEC nach Drebrin *knockdown* (*spreading assay*)

HUVEC wurden mit Drebrin-spezifischer (schwarz), bzw. einer unspezifischen Kontroll-siRNA (weiß) transfiziert, um zellinternes Drebrin herunterzuregulieren. Nach 4 Tagen wurden die Zellen auf mit Kollagen-beschichtete *coverslips* ausgesät und in einem Zeitraum von 15 bis 240 min fixiert. Nach der Anfärbung von F-Aktin mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin erfolgte die Auswertung des Zelldurchmessers.

28,2 bzw. $70,1 \pm 25,8 \mu\text{m}$ auf. Drebrin *knockdown* Zellen wichen mit $54,9 \pm 20,5 \mu\text{m}$ (60 min), bzw. $60,5 \pm 24,7 \mu\text{m}$ (240 min) nicht signifikant von den Kontrollwerten ab.

Weder die Überexpression noch der *knockdown* von Drebrin führen somit zu einer signifikanten Beeinträchtigung oder Verbesserung der Zellausbreitung von HUVEC in einem Zeitraum von 15 bis 240 min. Offensichtlich ist die (übermäßige) An- oder Abwesenheit von Drebrin für diesen Prozess in HUVEC nicht entscheidend. Somit stellte sich die Frage, ob die auffallend starke Rekrutierung Drebrins an die Zellperipherie in den ersten zwei Stunden der Adhäsion eventuell auf eine Rolle in der Migration oder Zell-Zellkontaktherstellung hinweist, da auch diese Prozesse während der frühen Adhäsion stattfinden. Ebenso sollte der Einfluss Drebrins auf die Morphologie von HUVEC geklärt werden, da mit der Adhäsion von Endothelzellen eine umfangreiche Umorganisation der Zellstruktur einhergeht.

3.4. Drebrin beeinflusst die Ausbildung der Morphologie von HUVEC

3.4.1. Die Überexpression von Drebrin-GFP in HUVEC führt zu Dosis-abhängigen Veränderungen der Zellmorphologie

Die Überexpression von Drebrin löst in vielen Zelltypen dramatische Veränderungen der Zellmorphologie aus (Peitsch *et al.*, 2001; 2006). In HUVEC führt die Überexpression von Drebrin, unabhängig von der Art des Expressionsvektors (myc, EGFP-N1,-C1, pTagRFP) vor allem zu einer verstärkten Bildung von filopodienartigen Zellfortsätzen und bäumchenartigen Verzweigungsstrukturen. Anhand unserer Untersuchungen zum Einfluss Drebrins auf Zellform und -funktion konnte beobachtet werden, dass unterschiedliche Quantitäten an exprimiertem Drebrin-GFP – erkennbar an der Fluoreszenzintensität – einen unterschiedlich starken Einfluss auf die Zellmorphologie ausüben. Während Zellen mit moderat erhöhtem Drebrinlevel sich lediglich durch die verstärkte Ausbildung von filopodienartigen Zellextensionen auszeichnen, führt eine stark erhöhte intrazelluläre Drebrinkonzentration zur Bildung bäumchenartiger Verzweigungsstrukturen bei ca. 40-50% der Gesamtheit der transfizierten Zellen (Abb. 3.7. E). Durch ein Auftrennungsverfahren dieser beiden Populationen (moderat und stark Drebrin überexprimierende HUVEC) mittels FACS-Analyse ließen sich die intrazellulären Drebrinkonzentrationen miteinander vergleichen. Zu diesem Zweck wurden mit Hilfe des BD FACSAria Systems der Firma Becton Dickinson zwei Subpopulationen von Drebrin-GFP, bzw. GFP-exprimierenden HUVEC definiert (s. Abb. 3.6.) und sortiert. Die vorangegangene Expressi-

onsdauer betrug 16 h. Aus den erhaltenen Zellen wurden Lysate angefertigt. Mittels SDS-PAGE wurden vergleichbare Proteinmengen aufgetrennt und im Western Blot Verfahren auf ihren Drebrin Gehalt untersucht. Die Quantifizierung der erhaltenen Signale mit Hilfe des Programmes „imageJ“ ergab, dass moderat überexprimierende Zellen ein ca. 6,4-fach erhöhtes Drebrinlevel im Vergleich zu den mit dem GFP-Leervektor transfizierten Kontrollzellen aufweisen. In stark überexprimierenden Zellen ist die Drebrin-Konzentration bis um den Faktor 9,1 erhöht (Abb. 3.7. A, C). Damit ergibt sich eine um den Faktor 1,4 erhöhte Drebrin-Expression zwischen stark und moderat Drebrin-überexprimierenden Zellen. In diesem Versuch wurden sowohl das zellinterne als auch das über den GFP-Vektor exprimierte Drebrin in die Kalkulation einbezogen. Die Analyse der Expressionslevel anhand des GFP-Signals im Western Blot weist allerdings eine um den Faktor 3,3 erhöhte Expression zwischen stark und moderat Drebrin-überexprimierenden Zellen auf. Hier wurde nur das über den GFP-Vektor exprimierte Drebrin ausgewertet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Überexpression von Drebrin auch eine Stabilisierung von zellinternem Drebrin bewirkt. Dieser Effekt ist auch anhand des Western Blots in Abb. 3.7. A erkennbar: das Signal, das zellinternem Drebrin zugeordnet wird (unterste Bande), wird mit der Überexpression verstärkt, obwohl gleiche Proteinkonzentrationen aufgetragen worden sind.

Die über die FACS-Analyse gewonnenen Subpopulationen Drebrin-überexprimierender Zellen wurden mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Tatsächlich fand eine Aufteilung in zwei Klassen morphologisch unterschiedlich stark beeinflusster Zellen je nach Drebrin-Expressionslevel statt (s. Abb. 3.7. E). Somit scheint die Ausbildung filopodiale Strukturen, bzw. bäumchenartiger Verzweigungen in direktem Zusammenhang mit einer erhöhten intrazellulären Konzentration von Drebrin zu stehen.

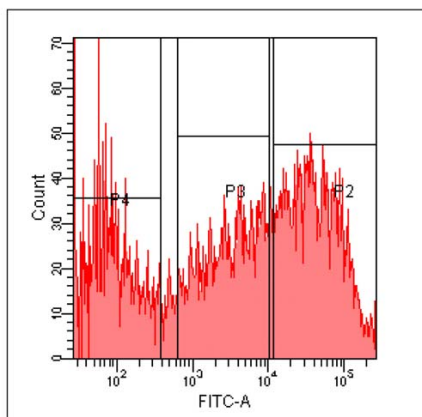


Abb. 3.6. Grafik zum cell sorting Drebrin-überexprimierender Zellen
Drebrin-GFP-überexprimierende HUVEC wurden mit Hilfe des *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) Systems BD FACSAria in zwei Populationen mit unterschiedlicher Fluoreszenz-Intensität geteilt. P3= moderat Drebrin-überexprimierende Zellen; P2= stark Drebrin-überexprimierende Zellen; P4= nicht transfizierte Zellen (verworfen)

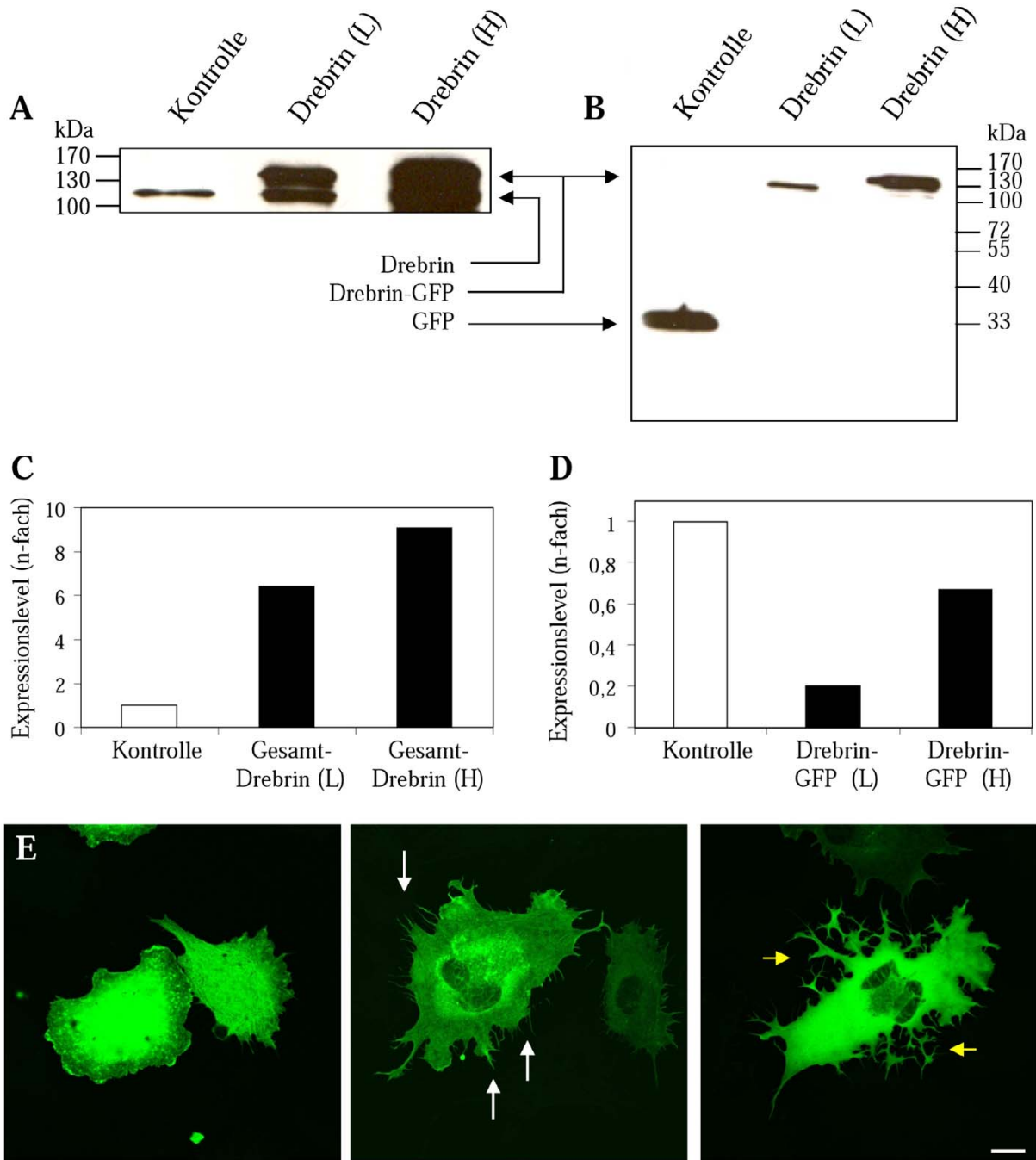


Abb.3.7. Die Morphologie transfizierter HUVEC hängt vom Drebrin-Expressionslevel ab

HUVEC wurden mit Drebrin-GFP transfiziert und mittels FACS-Analyse anhand der Fluoreszenzintensität in zwei Gruppen aufgeteilt; (A und B) Analyse des Drebrin-Gehalts von HUVEC-Lysaten mittels Western Blot-Verfahren: Kontrolle= GFP-transfizierte HUVEC; Drebrin(L)= moderat Drebrin überexprimierende Zellen; Drebrin(H) stark Drebrin überexprimierende Zellen; (A) Detektion von Drebrin; (B) Detektion von GFP; (C und D) Graphische Umsetzung der in (A und B) erhaltenen Signale: der Gesamt-Drebringehalt ist gegenüber GFP-transfizierten Kontrollzellen um den Faktor 1,4 erhöht; (D) Die Auswertung der GFP Signale ergibt eine um den Faktor 3,3 gesteigerte Expression von stark Drebrin exprimierenden Zellen im Vergleich zu “moderaten“ Zellen; (E) Immunfluoreszenzaufnahmen transfizierter Zellen; Links: GFP-transfizierte Kontrollzellen; Mitte: moderat Drebrin-überexprimierende HUVEC besitzen überdurchschnittlich viele filopodiale Zellextensionen (weiße Pfeile); Rechts: stark Drebrin-überexprimierende HUVEC weisen vor allem bäumchenartige Verzweigungsstrukturen auf (gelbe Pfeile); weißer Balken: 10 µm

3.4.2. Die Überexpression von Drebrin-GFP in HUVEC führt zu einer Umorganisation des Zytoskeletts

Wie bereits unter Punkt 1.4.1. beschrieben, bildet das Protein Vinkulin eine Komponente podosomaler Adhäsionsstrukturen, wo es innerhalb der Ringstruktur angereichert ist. Auch in HUVEC konnte Vinkulin als Bestandteil podosomaler Strukturen identifiziert werden (Osiak *et al.*, 2005; s. Abb. 3.8.). Zusätzlich besitzt es eine Schlüsselrolle in der Ausbildung fokaler Adhäsionen. Fokale Adhäsionen sind Proteinkomplexe, die sich an Zell-Matrix-Kontaktstellen befinden und die koordinierte Zellmigration ermöglichen (Critchley, 2000; Geiger, *et al.*, 2001). Vinkulin fungiert hier als Adaptorprotein zwischen Adhäsionsstrukturen und dem Zytoskelett (Bakolitsa *et al.*, 2004). Der Rekrutierung von Vinkulin an fokale Adhäsionen folgt eine Konformationsänderung und damit die Aktivierung des Moleküls. Dadurch wird zum Beispiel die Interaktion mit Talin und α -Actinin ermöglicht (Ziegler *et al.*, 2006). Die Interaktion mit Talin ist für die Bildung fokaler Adhäsionen unerlässlich, da sie das *clustering* von Integrinen in ihrer aktivierten Form bewirkt, was zu einer Vergrößerung der fokalen Adhäsionen führt.

In moderat Drebrin-überexprimierenden HUVEC sind – trotz der morphologischen Modulation der Zelle – mittels Vinkulin-spezifischer Immunfluoreszenzfärbung fokale Adhäsionen identifizierbar (s. Abb. 3.9. A). Bei starker Überexpression ist dies nicht mehr der Fall; die für HUVEC typische subzelluläre Verteilung von Vinkulin ist nicht mehr erkennbar (s. Abb. 3.9. B).

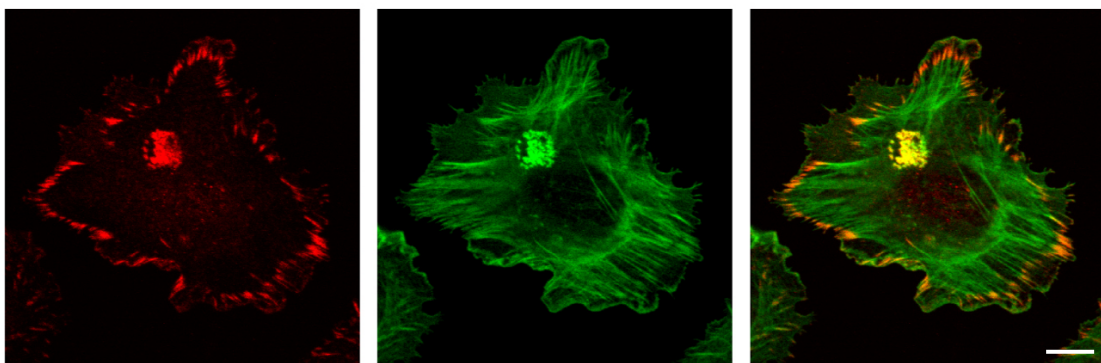


Abb. 3.8. Vinkulin ist ein Bestandteil von fokalen Adhäsionen und Podosomen in HUVEC
HUVEC wurden für 1 h auf Kollagen kultiviert, anschließend erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung von Vinkulin (rot) und Aktin (grün); Vinkulin und Aktin kolokalisieren an fokalen Adhäsionen in der Zellperipherie und an Podosomen (gelb); weißer Balken: 10 μ m

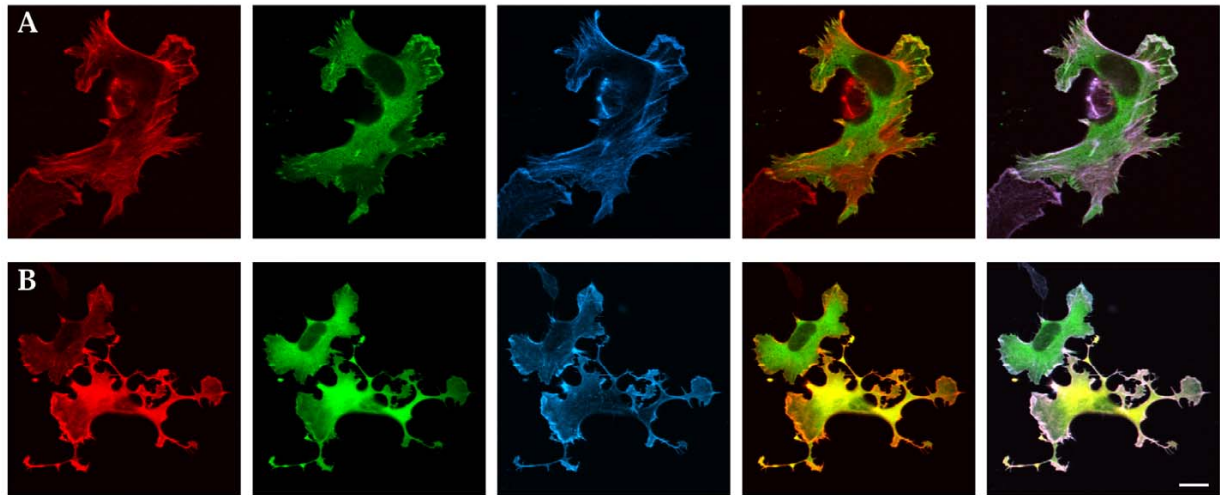


Abb. 3.9. Die subzelluläre Lokalisation von Vinculin wird durch die starke Überexpression von Drebrin-GFP moduliert

HUVEC wurden mit Drebrin-RFP (rot) transfiziert. Nach 16 h wurden die Zellen fixiert und zellinternes Aktin (blau) und Vinculin (grün) fluoreszenzmarkiert. Überlagerungen in Gelb stellen Kolokalisationen von Drebrin und Vinculin dar, weiße Areale geben die Überlagerung aller beteiligten Komponenten wider. (A) moderat Drebrin überexprimierende HUVEC; (B) stark Drebrin überexprimierende HUVEC; weißer Balken: 10 µm

Da auch das Aktinnetzwerk durch den auffälligen Verlust von Aktin-Stressfasern stark beeinträchtigt ist, liegt es nahe, dass die Zellmorphologie durch einen zu hohen Drebringegehalt nachhaltig gestört wird. Weitere Untersuchungen konzentrierten sich somit auf den modulativen Einfluss Drebrins auf die Zellmorphologie.

3.4.3. Die Überexpression von Drebrin beeinträchtigt die Zellretraktion

Die Untersuchung fixierter mikroskopischer Präparate von Drebrin-GFP-transfizierten HUVEC zeigte, dass die Überexpression von Drebrin eine Entstehung bäumchenartiger Zellextensionen fördert (s. Abb. 3.7. E). Ebenso konnte festgestellt werden, dass es sich um einen quantitativen Effekt handelt, bei dem die Menge des überexprimierten Drebrins mit der Stärke der Ausprägung der gebildeten Strukturen korreliert (s. Punkt 3.4.1.). Die Ausbildung der genannten Strukturen findet in allen stark Drebrin-überexprimierenden Zellen in einem Zeitraum von 1-24 Stunden nach dem Aussäen der Zellen statt. Die Dauer der Adhäsion spielt in diesem Zusammenhang somit keine Rolle (Daten nicht gezeigt).

Mit Hilfe der *live cell*-Mikroskopie wurde gezeigt, dass Drebrin-transfizierte HUVEC in verstärktem Maß zelluläre Extensionstrukturen wie Filopodien ausbilden und dass das Drebrin-

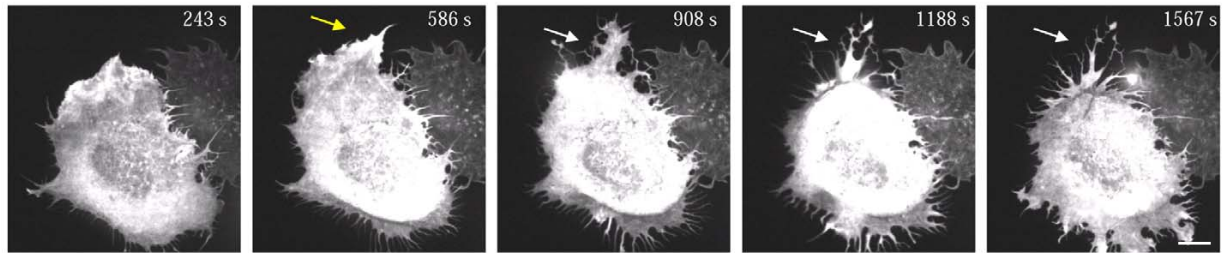


Abb. 3.10. Live cell Mikroskopie-Aufnahme einer humanen Endothelzelle nach Transfektion mit Drebrin-GFP

HUVEC wurden 16 h nach der Transfektion mit Drebrin-GFP erneut auf Kollagen-beschichtete *coverslips* ausgesät. Drebrin-GFP ist in protrusiven Strukturen stark angereichert (gelber Pfeil). Retraktionsversuche der Zelle führen zur Ausbildung bäumchenartiger Verzweigungsstrukturen (weiße Pfeile); weißer Balken: 10 μm

GFP-Fusionsprotein in sich entwickelnden Protrusionen stark angereichert ist (s. Abb. 3.10., gelber Pfeil; Anhang: Film 2). Allerdings konnte ebenfalls festgestellt werden, dass die beobachteten Extensionsstrukturen nicht ausschließlich Protrusionen darstellen, wie zu Beginn der Untersuchungen angenommen wurde. Vielmehr weisen sie auf eine durch das übermäßige Vorhandensein von Drebrin verursachte Fehlfunktion in der Retraktionsfähigkeit der Zelle hin. Die Retraktion dieser Strukturen führt zur Bildung der in fixierten Präparaten beobachteten Verzweigungen (Abb. 3.10., weißer Pfeil).

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte die Ursache dieses Phänomens untersucht werden, wobei hier vor allem eine Untersuchung der regulatorischen Grundlagen im Vordergrund stand. Es ist bekannt, dass Rho-GTPasen maßgeblich an der Regulation der für die Migration wichtigsten biochemischen Prozesse beteiligt sind (zur Übersicht s. Raftopoulou und Hall, 2003). Rho-GTPasen funktionieren als molekulare Schalter, die die Signaltransduktion kontrollieren, indem sie zwischen einer inaktiven, GDP-gebundenen und einer aktiven, GTP-gebundenen Konformation wechseln. In der aktiven Form ist es ihnen möglich, mit nachgeschalteten Effektor-Proteinen zu interagieren und damit intrazelluläre Reaktionen wie zum Beispiel die Regulation der Aktin-Dynamik zu beeinflussen. Für Kontraktions- und Retraktionsprozesse innerhalb des Zellkörpers und am *trailing edge* wird die GTPase RhoA verantwortlich gemacht. Sie bewirkt vor allem den Aufbau von kontraktile Aktin-Myosin-Filamenten und trägt somit zum Wachstum fokaler Adhäsionen und Stressfasern bei (Ridley und Hall, 1992; Chrzanowska-Wodnicka und Burridge 1996). Durch Worthylake *et al.* (2001) wurde zudem festgestellt, dass die GTPase RhoA in Monozyten maßgeblich für die Fähigkeit zur zellulären Retraktion verantwortlich ist.

Um festzustellen, ob die Inhibierung retraktiver Prozesse in Drebrin-transfizierten HUVEC mit einer Modifizierung der RhoA-Aktivität in Zusammenhang steht, wurde der RhoA G-LISATM *Activation Asssay* verwendet. Es handelt sich um ein auf dem ELISA-Prinzip beruhendes Verfahren zur Messung von aktiviertem RhoA in der Form von RhoA-GTP (s. Punkt 2.5.10.). HUVEC wurden mit Drebrin-GFP, bzw. GFP, transfiziert und nach 16 h Expressionsdauer mit Hilfe der FACS-Analyse (s. Punkt 3.4.1.) in die Subpopulationen der moderat und stark Drebrin-überexprimierende Zellen aufgeteilt und analysiert. Graphik B in Abb. 3.11. zeigt die Ergebnisse des RhoA G-LISATM *Activation Asssay*.

Im Vergleich zur GFP-Kontrolle ergab sich mit $73,4 \% \pm 12,0 \%$ eine leicht verminderte RhoA-Aktivität für moderat Drebrin-überexprimierende HUVEC. Stark überexprimierende Zellen besaßen eine Aktivität von $77,4 \% \pm 3,4 \%$ im Vergleich zur GFP-Kontrolle (s. Abb. 3.11. B). Diese Resultate sollten allerdings im Zusammenhang mit der Gesamt-RhoA-Konzentration in der Zelle betrachtet werden. Zu diesem Zweck wurden Lysate mit gleichen Proteinkonzentrationen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot-Verfahren mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers auf ihren RhoA-Gehalt hin untersucht (s. Abb. 3.11. D) und unter Verwendung des Programms *imageJ* evaluiert. Es wurde festgestellt, dass die Menge an zellinternem Gesamt-RhoA in moderat Drebrin-überexprimierenden HUVEC auf einen Wert von $47,0 \%$ und in stark über-exprimierenden Zellen auf $57,0 \%$ im Vergleich zur Kontrolle gesunken ist (s. Abb. 3.11. A). Unter Berücksichtigung dieser Werte ließen sich die jeweiligen Verhältnisse von aktivem RhoA zu Gesamt-RhoA für die einzelnen Ansätze bestimmen (s. Abb. 3.11. C). Die RhoA-Aktivität konnte auf diese Weise in stark Drebrin-überexprimierenden Zellen um den Faktor 1,3 und in moderat überexprimierenden Zellen sogar um den Faktor 1,5 erhöht festgestellt werden.

Diese Ergebnisse weisen auf einen Zusammenhang zwischen der Beeinträchtigung der totalen RhoA-Aktivität und der Ausbildung von Retraktionsartefakten in Drebrin-überexprimierenden HUVEC hin. Allerdings steht die Intensität der modifizierten RhoA-Aktivität nicht in direktem Zusammenhang mit dem Drebrin-GFP-Expressionslevel.

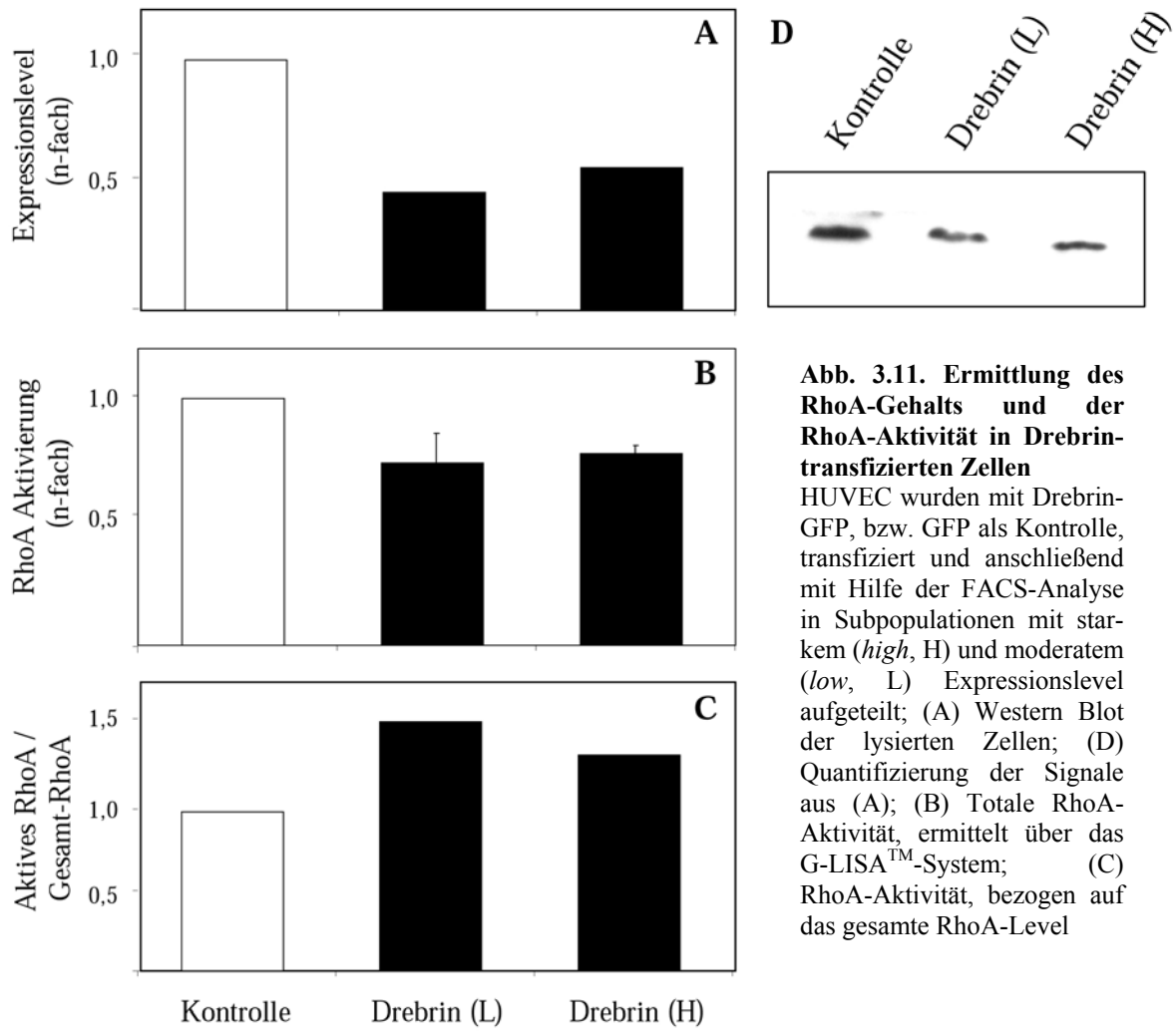


Abb. 3.11. Ermittlung des RhoA-Gehalts und der RhoA-Aktivität in Drebrin-transfizierten Zellen

HUVEC wurden mit Drebrin-GFP, bzw. GFP als Kontrolle, transfiziert und anschließend mit Hilfe der FACS-Analyse in Subpopulationen mit starkem (*high*, H) und moderatem (*low*, L) Expressionslevel aufgeteilt; (A) Western Blot der lysierten Zellen; (D) Quantifizierung der Signale aus (A); (B) Totale RhoA-Aktivität, ermittelt über das G-LISA™-System; (C) RhoA-Aktivität, bezogen auf das gesamte RhoA-Level

3.5. Molekulare Funktion und Interaktion von Drebrin

3.5.1. Untersuchung der *coiled coil* Region

Zur Aufklärung der molekularen Funktionsweise Drebrins wurden verschiedene Trunkationskonstrukte hergestellt. Von besonderer Bedeutung war die Erforschung der auf der N-terminalen Seite des Moleküls lokalisierten *coiled coil* Region (s. Abb. 3.12. A). Durch dieser Arbeit vorangegangene *pulldown* Versuche (nicht gezeigt) konnte festgestellt werden, dass dieser Molekülabschnitt an der durch den N-Terminus vermittelten Fähigkeit zur Oligomerisierung beteiligt, alleine aber dazu nicht ausreichend ist. Zudem ist die *coiled coil* Region in den Prozess der Aktinbindung und der subzellulären Lokalisation von Drebrin involviert (Hayashi *et al.*, 1996; Xu und Stamnes, 2006).

In fixierten HUVEC-Präparaten, die mit Drebrin-CC (*coiled coil*)-GFP-N1 (AS 171-253), s. Schema in Abb. 3.12. A) transfiziert worden waren, konnte die überdurchschnittliche Bildung von Filopodien-ähnlichen Strukturen beobachtet werden. Ebenso wie im Fall des Volllängen-Drebrinkonstrukts (s. Punkt 3.4.3.) sollte auch hier die Entstehung der beobachteten Strukturen via konfokaler *live cell* Mikroskopie dokumentiert werden. Die Auswertung der Filmaufnahmen in Abb. 3.12. C zeigt die Anreicherung des CC171-253-GFP-Fusionsproteins in protrusiven Strukturen (s. Abb. 3.12. C, gelbe Pfeile; Anhang: Film 3). Zusätzlich wurde auch hier die Entstehung von Retraktionsartefakten beobachtet (s. Abb. 3.12. C, weiße Pfeile). Allerdings weisen die transfizierten Zellen eine geringere Verzweigung in deren Aufbau auf als HUVEC, die mit dem Volllängen-Drebrinkonstrukt transfiziert worden waren (vgl. mit Abb. 3.9. B). Durch die Transfektion von HUVEC mit dem Teilkonstrukt CC171-253-GFP-N1 kommt es somit – trotz der offensichtlichen Beeinträchtigung der Retraktion – nicht zur Ausbildung vergleichbar komplexer bäumchenartiger Strukturen.

HUVEC, die mit dem *coiled coil* Fusionsprotein transfiziert worden waren, wiesen bezüglich der Ausbildung filopodienartiger Strukturen, bzw. Retraktionsartefakte, in abgeschwächter Form Parallelen zu Zellen auf, die das vollständige Drebrin-GFP-Konstrukt exprimieren. Dies lässt die Folgerung zu, dass die *coiled coil* Region eine Rolle bei dem modulativen Einfluss Drebrins auf das Zytoskeletts und somit auf die Morphologie von HUVEC spielt.

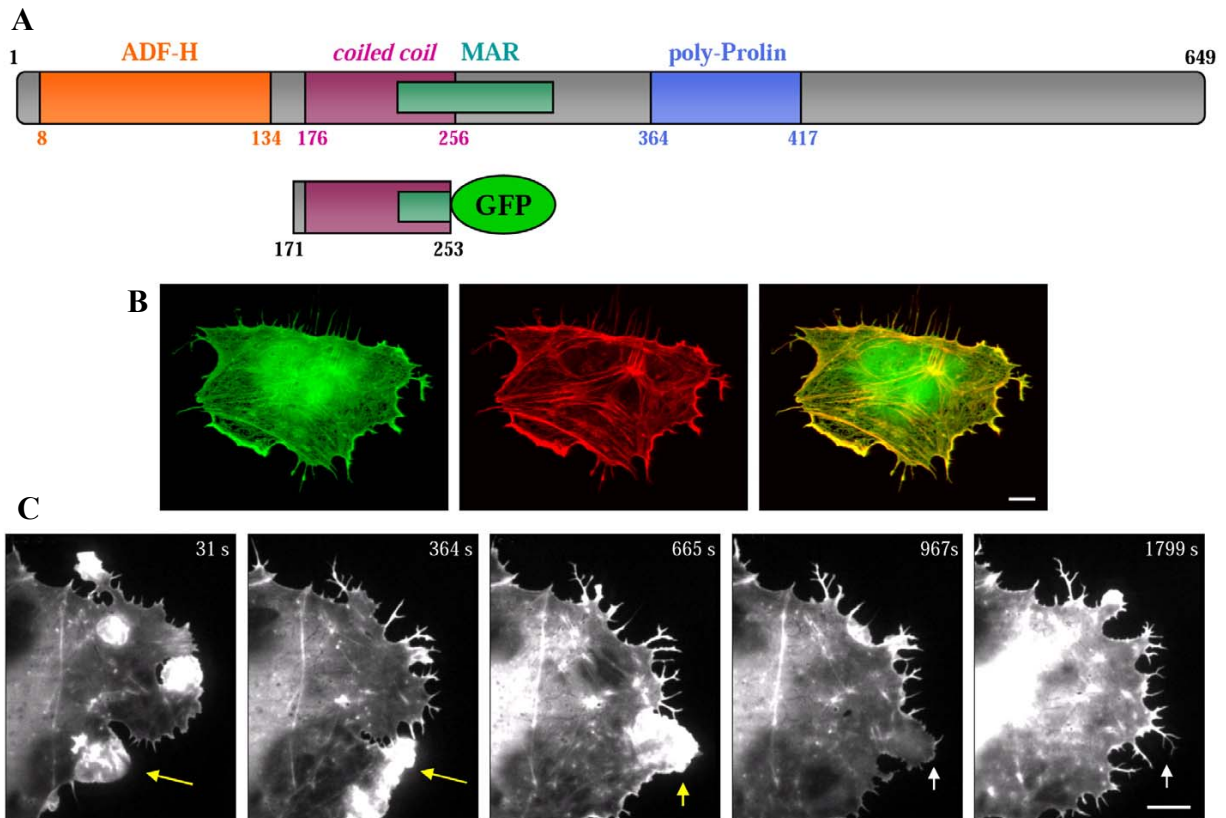


Abb. 3.12. Subzelluläre Lokalisation der *coiled coil* Region von Drebrin nach Überexpression als GFP-Fusionsprotein in HUVEC (CC171-253-GFP)

(A) Schematische Darstellung der Molekularstruktur von Drebrin E2 und dem Teilkonstrukt Drebrin-CC-GFP-N1 (AS 171-253); (B) Konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen von HUVEC nach Transfektion mit Drebrin-CC-GFP (grün): Die Expressionsdauer betrug 16 h. Die Visualisierung von Aktin erfolgte mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin (rot). Das exprimierte Fusionsprotein lokalisiert vor allem an protrusiven Zellstrukturen; (C) *Live cell* Mikroskopie-Aufnahme einer humanen Endothelzelle nach Transfektion mit Drebrin-CC-GFP: HUVEC wurden 16 h nach der Transfektion mit Drebrin-CC-GFP für 2 h auf Kollagen-beschichtete *coverslips* ausgesät; Drebrin-CC-GFP ist stark in protrusiven Strukturen angereichert (s. gelber Pfeil). Die Retraktion dieser Strukturen führt zu der Ausbildung kurzer, verzweigter Zell-Extensionen (weißer Pfeil); weiße Balken: 10 μ m

Durch die Generierung eines weiteren GFP-Konstrukts konnte diese Funktion weiter analysiert werden. Dieses Konstrukt umfasste die Aminosäuren 171-263 und war somit um 10 AS länger als CC171-253-GFP (s. Schema Molekularstruktur 3.13. A, rote Markierung). Somit war ein größerer Teil der sich mit der *coiled coil* Region überschneidenden Aktinbindedomäne (MAR) beteiligt. Die Transfektion von HUVEC mit diesem Konstrukt (CC171-263-GFP) führte zu einer massiven Veränderung der Morphologie in HUVEC im Vergleich zur Transfektion mit CC171-253-GFP. Abb. 3.13. B zeigt, dass vor allem Zellen in konfluenten Verbänden eine auffällig verstärkte kortikale *ruffling* Aktivität aufweisen. Diese Beobachtung wurde ebenfalls nach Transfektion mit dem Volllängen-GFP-Konstrukt gemacht. Die Beteiligung an der Ausbildung von Retraktionsartefakten durch Transfektion mit CC171-263-GFP ist auch diesem Konstrukt mit dem vollständigen Drebrinmolekül gemein, was ebenfalls durch *live cell* mikroskopische Konfokalaufnahmen nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 3.13. C; Anhang: Film

4). Somit löst die Transfektion von CC171-263-GFP in HUVEC einen vergleichbaren Phänotyp wie das Volllängen-Konstrukt aus.

Es konnte somit festgestellt werden, dass die *coiled coil* Region von Drebrin an der Modulation der Zellmorphologie zwar beteiligt ist, aber der Aminosäureabschnitt 254-263 innerhalb der MAR unbedingt erforderlich ist, damit das Volllängen-Konstrukt seinen charakteristischen Phänotyp ausbilden kann.

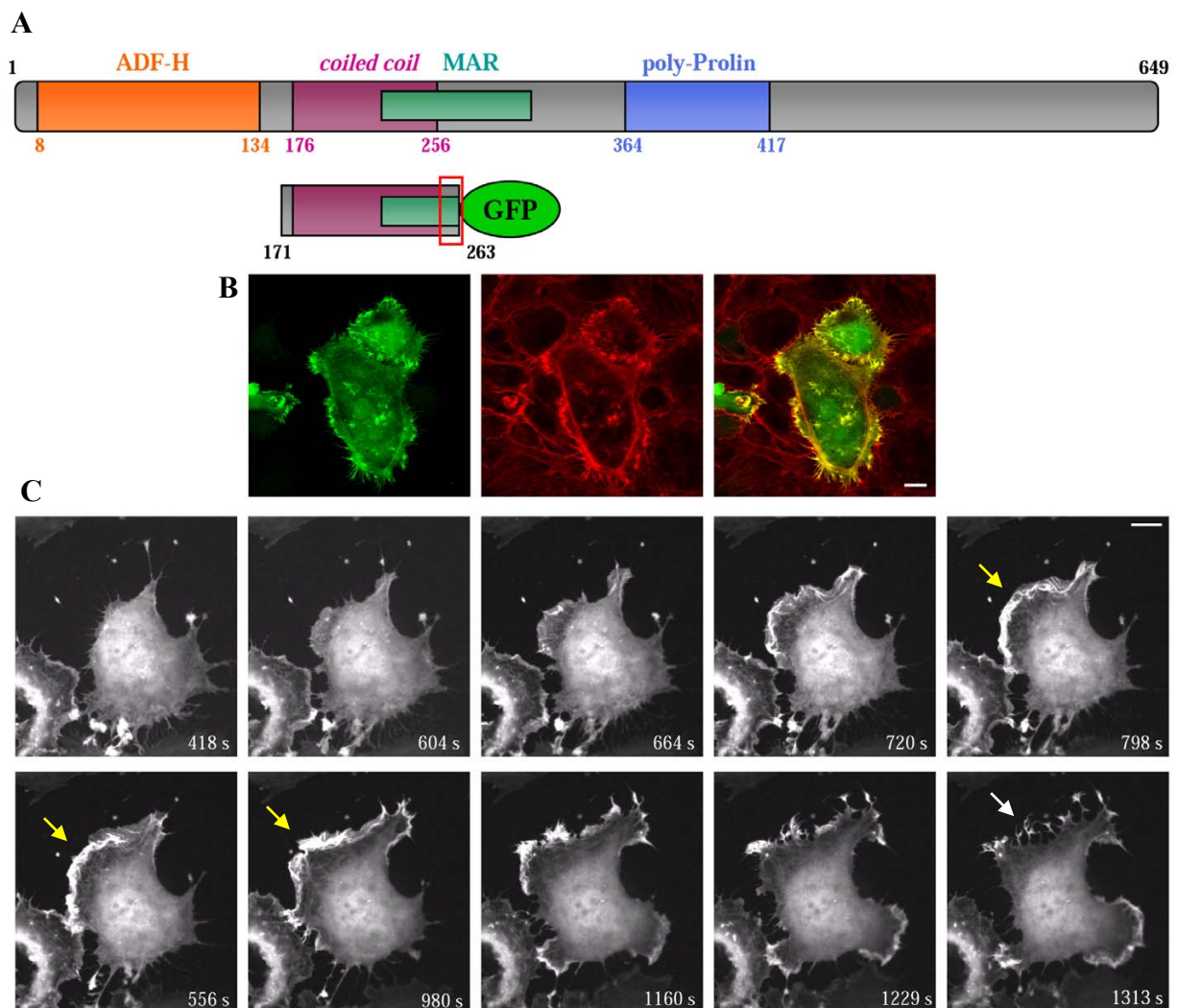


Abb. 3.13. Subzelluläre Lokalisation der verlängerten *coiled coil* Region von Drebrin nach Überexpression als GFP-Fusionsprotein in HUVEC (CC171-263-GFP)

(A) Schematische Darstellung der Molekularstruktur von Drebrin E2 und des Trunktionskonstrukts Drebrin-CC171-263-GFP-N1; die zusätzliche Region der Aminosäuren 154-263 ist mit einem roten Rahmen markiert; (B) Immunfluoreszenzfärbung von Drebrin-CC171-263-GFP(grün)-transfizierten HUVEC, Aktin (rot); (C) *live cell* konfokalmikroskopische Aufnahmesequenz von Drebrin-CC-171-563-GFP-N1-transfizierter HUVEC. HUVEC wurden 16 h nach der Transfektion für 2 h auf Kollagen-beschichtete *coverslips* ausgesät. Das überexprimierte Konstrukt ist stark im sich entwickelnden Lamellipodium angereichert (gelbe Pfeile). Die Retraktion dieser Struktur führt zur Ausbildung bäumchenartiger Verzweigungen (weißer Pfeil); weiße Balken: 10µm

3.5.2. Sequenzanalyse von Drebrin mittels ScanSite 2.0

Für die weitere Untersuchung der molekularen Funktion von Drebrin war es erforderlich, die Proteinsequenz auf konservierte Domänen und Strukturen hin zu untersuchen. Eine MotifScan-Sequenzanalyse mit Hilfe der *open source* Software Scansite 2.0 (Obenauer *et al.*, 2003) ergab verschiedene Ansätze zur Entschlüsselung der molekularen Funktion (s. Abb. 3.14.). Es wurden – bei hoher Stringenz – fünf putative Interaktionsstellen für Serin/Threonin-Kinasen angegeben. Zwei davon (T241 und S255) liegen in der *coiled coil* Domäne und waren für die weitere Erforschung dieser Region von großem Interesse (s. Punkt 3.5.3.).

Zusätzlich ergab sich eine Vielzahl möglicher Interaktionen der poly-Prolinregion mit SH3-Proteinen. So ist die poly-Prolinregion – rein hypothetisch – in der Lage, an die Src *homology 3* Domänen von Abl (Abelson Tyrosin Kinase)1/2, Crk (*avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog*), Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*), Cortactin, PLC γ , Itk (*interleukin-2-inducible T-cell kinase*) und die Phosphotyrosinkinase Src zu binden (s. Punkt 3.5.4. für die weitere Analyse dieser Ergebnisse).

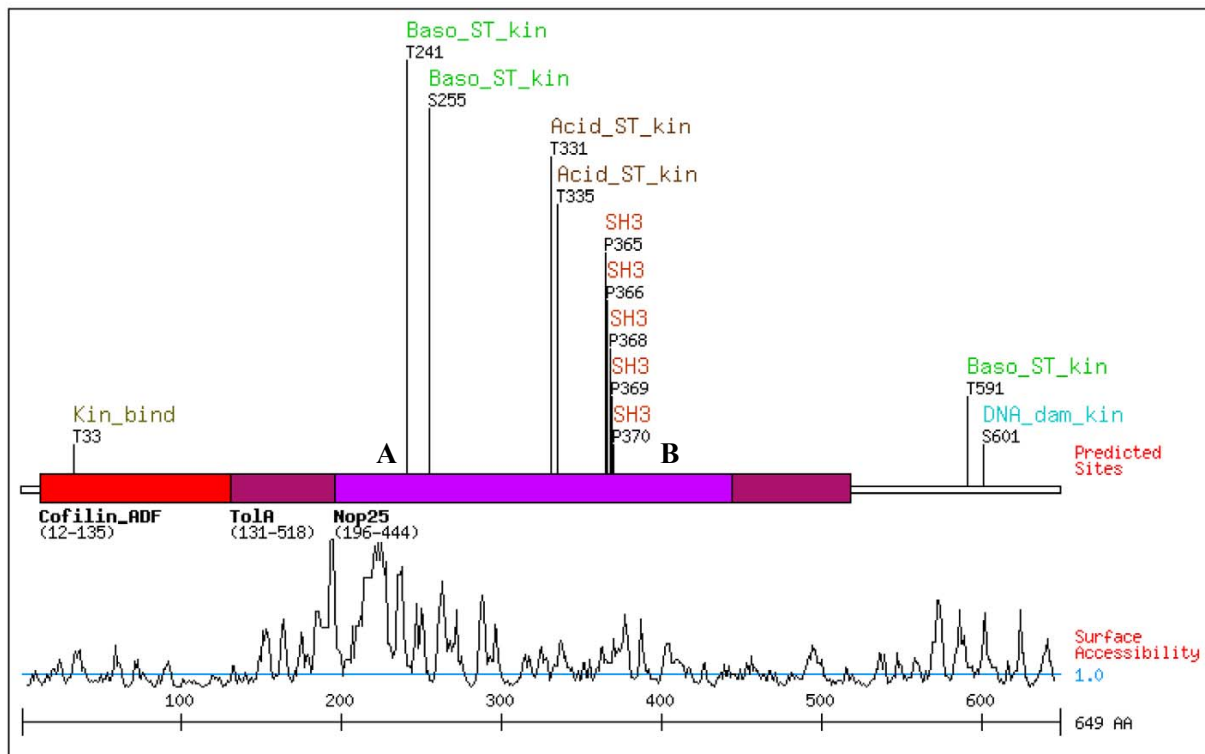


Abb. 3.14. Sequenzanalyse von Drebrin E2 mittels Scansite 2.0

Oben: Die putativen Phosphorylierungsstellen T241 und S255 (A) liegen in der *coiled coil* Region und sind damit von besonderem Interesse für die Erforschung dieser Domäne; (B) die Molekülstruktur erlaubt mehrere putative Interaktionen zu SH3-Proteinen über die poly-Prolinregion (s. Text); Unten: Der *surface accessibility plot* von Drebrin E2 lässt erkennen, welche Regionen durch ihre Exponierung an die Oberfläche des Moleküls für die Interaktion mit anderen Proteinen zugänglich sind.

Der MotifScan lässt mit Hilfe des *surface accessibility plots* zusätzlich diejenigen Regionen des Moleküls bestimmen, die durch ihre Exponierung an die Außenseiten der dreidimensionalen Proteinstruktur v. a. für die Interaktion mit anderen Proteinen in Frage kommen (s. Abb. 3.14. unten). Eine besonders hohe Zugänglichkeit des Moleküls wird somit besonders im Bereich der *coiled coil* Region, der poly-Prolinregion und eines ca. 150 Aminosäuren langen Abschnitts am C-Terminus vorhergesagt.

3.5.3. Mutation putativer Phosphorylierungsstellen innerhalb der *coiled coil* Region von Drebrin

HUVEC bilden nach der Transfektion mit dem Volllängen-Drebrin-GFP-Konstrukt, bzw. der verlängerten *coiled coil* Region (CC171-263-GFP) einen ungewöhnlichen Phänotyp aus, der sich vor allem durch starkes *ruffling* an Zellkontaktstellen und die Entstehung von Retraktion-artefakten auszeichnet (s. Punkt 3.5.1.). Um festzustellen, ob die putativen Phosphorylierungsstellen T241 und S255 innerhalb der *coiled coil* Region mit diesem Effekt in Zusammenhang stehen, wurden mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese Punktmutationen an den Positionen der entsprechenden Aminosäuren in die Sequenz des Konstrukts CC171-263-GFP eingebaut. Die entsprechenden Mutationen wurden mittels PCR mit Hilfe spezifischer Primer generiert. Bei den eingesetzten Punktmutationen handelt es sich um den Aminosäurerest Alanin (A), welche eine Phosphorylierung an dieser Stelle unmöglich macht (*phospho-defective phenotype*), bzw. um einen doppelten Glutaminsäurerest (EE), der eine einer Phosphorylierung ähnliche Konformation des Moleküls bewirkt (*phospho-mimicking phenotype*). Es wurden sowohl Variationen des *coiled coil* Teilkonstruktes (AS 171-263) mit jeweils einer Mutation, als auch Konstrukte mit Mutationen an beiden Phosphorylierungsstellen angefertigt (s. Übersicht in Abb. 3.15.). Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass alle theoretisch möglichen Variationen der Modifizierung untersucht wurden.

3. Ergebnisse

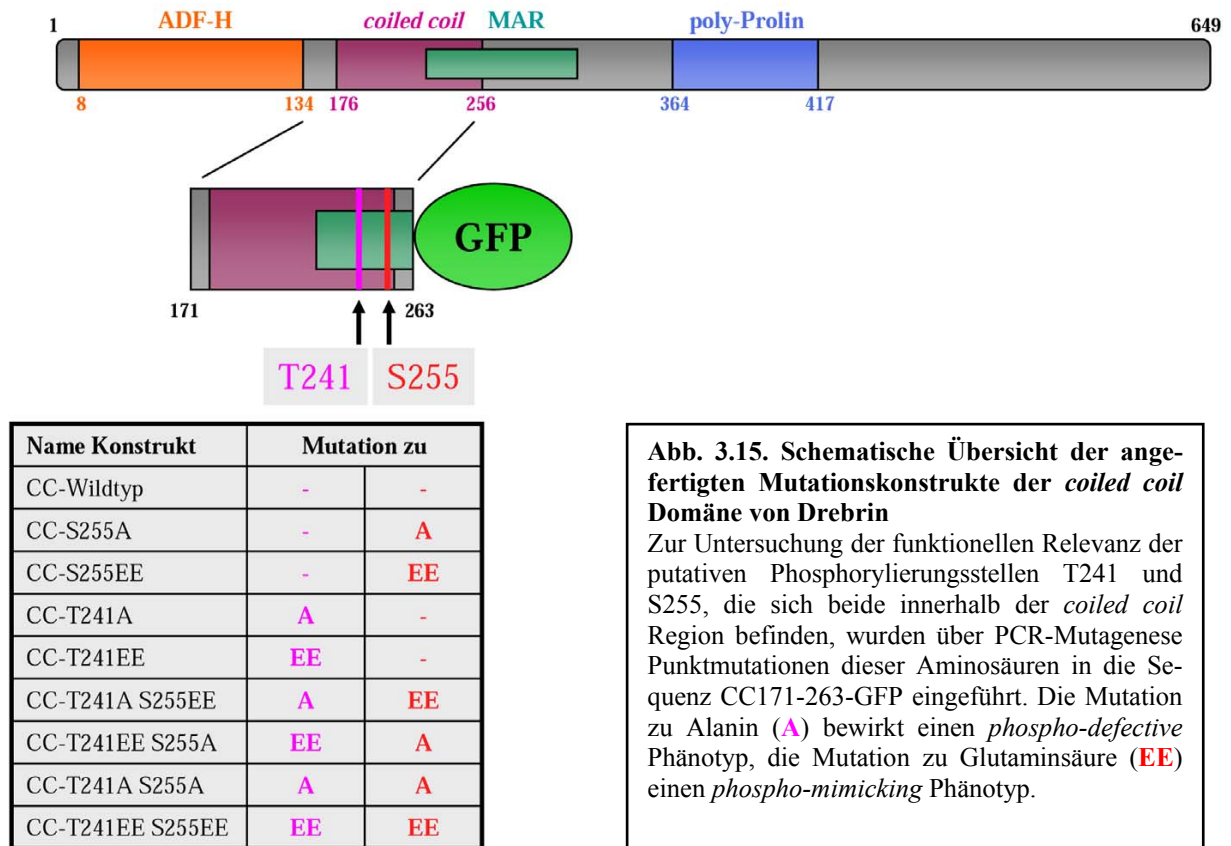


Abb. 3.15. Schematische Übersicht der angefertigten Mutationskonstrukte der *coiled coil* Domäne von Drebrin
 Zur Untersuchung der funktionellen Relevanz der putativen Phosphorylierungsstellen T241 und S255, die sich beide innerhalb der *coiled coil* Region befinden, wurden über PCR-Mutagenese Punktmutationen dieser Aminosäuren in die Sequenz CC171-263-GFP eingeführt. Die Mutation zu Alanin (A) bewirkt einen *phospho-defective* Phänotyp, die Mutation zu Glutaminsäure (EE) einen *phospho-mimicking* Phänotyp.

HUVEC wurden mit den generierten Punktmutations-Konstrukten transfiziert und nach 16h Expressionsdauer fixiert. Zelleigenes Aktin wurde anschließend mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin gefärbt und die Präparate mit Hilfe des Konfokalmikroskops ausgewertet (s. Abb.3.16. und 3.17). Alle Punktmutations-Konstrukte von CC171-263-GFP wiesen die gleichen morphologischen Besonderheiten wie der Wildtyp auf, was vor allem in der Ausprägung einer ungewöhnlich hohen Anzahl filopodiale Zellextensionen als auch einer verstärkten *ruffling* Aktivität zwischen benachbarten Zellen zu erkennen ist. Somit können die Aminosäuren T241 und S255 als mögliche Serin-Theronin-Kinasen-abhängige Regulationsstellen innerhalb der *coiled coil* Region mit Einfluss auf die Aktinmodulation vermutlich ausgeschlossen werden.

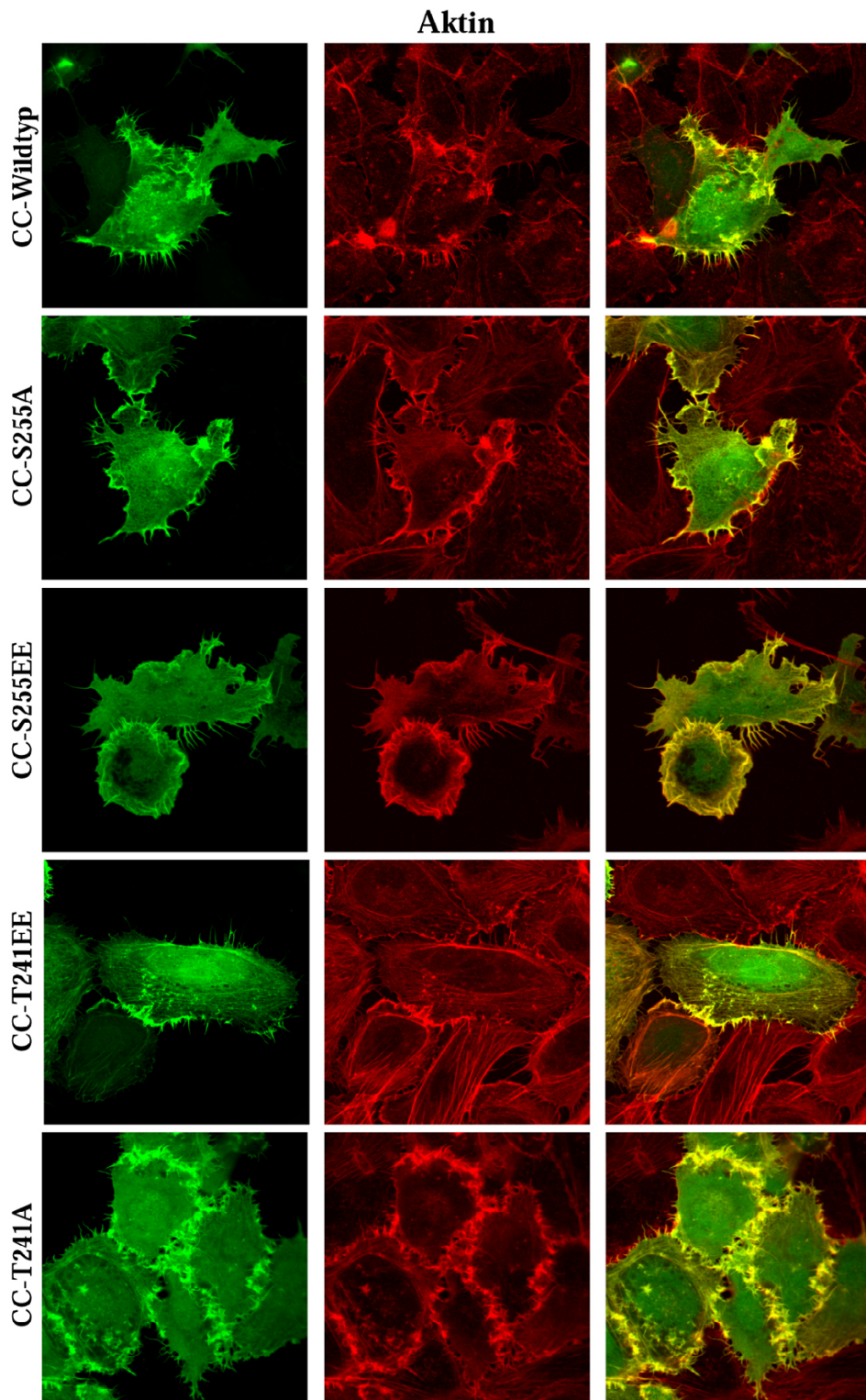


Abb. 3.16. Mutationen der putativen Phosphorylierungsstellen T241 und S255 innerhalb CC171-263-GFP haben keine Beeinträchtigung des durch die Transfektion ausgelösten Phänotyps in HUVEC zur Folge.

HUVEC wurden mit CC171-263-GFP, bzw. mit seinen Punktmutationskonstrukten (grün) transfiziert; anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von Aktin (rot) durchgeführt. Der Phänotyp des Wildtyps lässt sich durch die Mutation der putativen Phosphorylierungsstellen T241 und S255 nicht beeinflussen; weißer Balken: 10 μ m

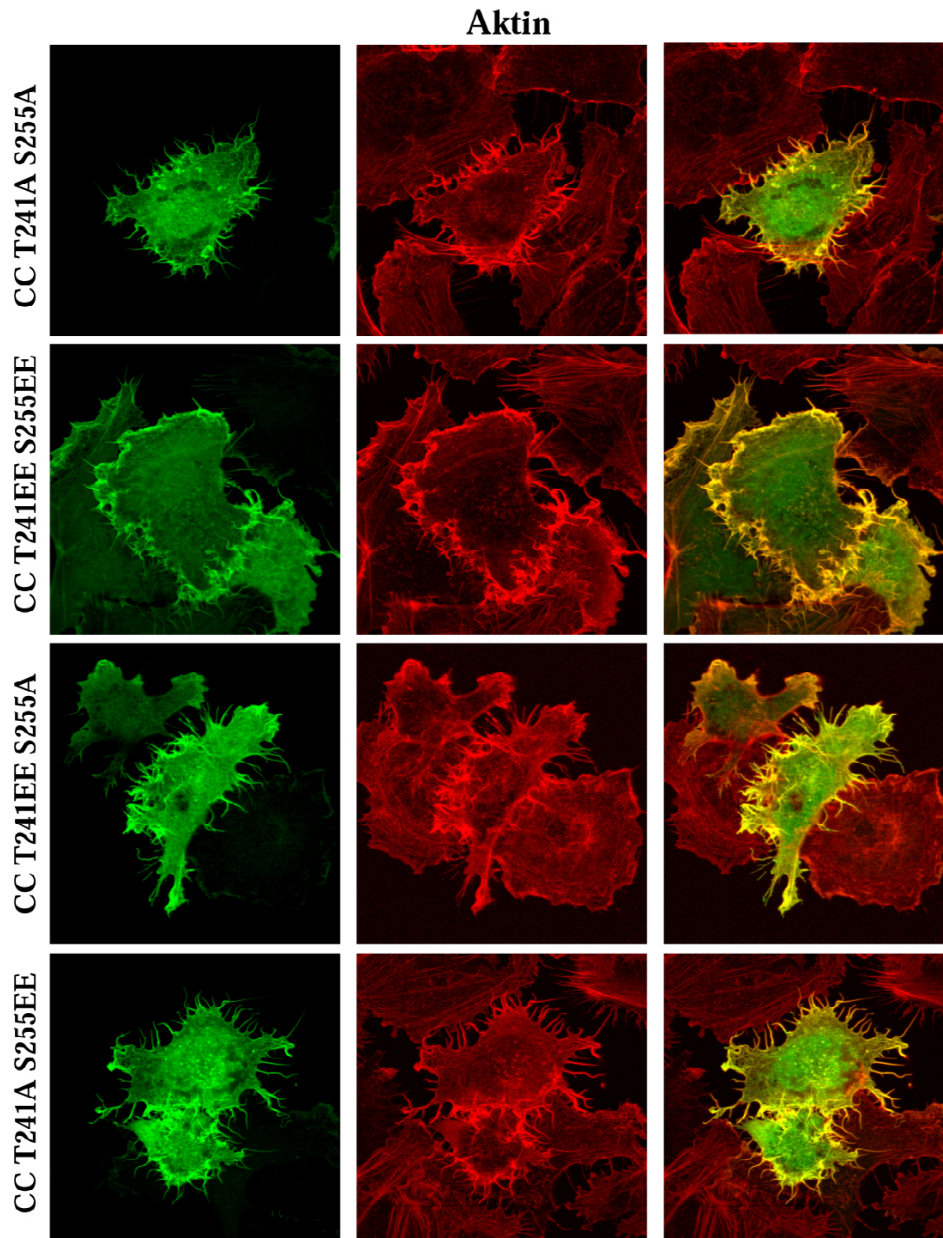


Abb. 3.17. Kombinierte Punktmutationen der putativen Phosphorylierungsstellen T241 und S255 innerhalb CC171-263-GFP haben keine Beeinträchtigung des durch die Transfektion ausgelösten Phänotyps in HUVEC zur Folge.

HUVEC wurden mit Variationen der CC171-263-GFP transfiziert (grün), die kombinierte Punktmutationen an den Aminosäuren T241 und S255 tragen; anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von Aktin (rot) durchgeführt. Auch die kombinierte Modifizierung der putativen Phosphorylierungsstellen T241 und S255 bewirkt keine Reversion des abnormen Phänotyps der Zellperipherie; weißer Balken: 10 μm

3.5.4. Drebrin interagiert über seine poly-Prolinregion mit SH3-Proteinen

Für die Aufklärung seiner Rolle in der Signaltransduktion sowie der Beteiligung an zellmorphologischen Prozessen ist die Identifizierung von Drebrin-Bindepartnern unerlässlich. In den folgenden Untersuchungen sollten speziell Interaktionen über Drebrins C-Terminus identifiziert werden, da die Funktion dieses Molekülabschnitts bisher noch nicht geklärt werden konnte.

Protein-Protein-Interaktionen werden oft über konservierte Domänen vermittelt, zum Beispiel durch die *Src homology 3* (SH3) Domäne. Erstmals wurde sie als Teil des Rous Sarcoma Onkogenprodukts Src identifiziert (Pawson und Gish, 1992). Sie spielt eine wichtige Rolle in der interzellulären Kommunikation und intrazellulären Signaltransduktion. SH3 Domänen sind konservierte Molekülabschnitte aus ca. 60 Aminosäuren, die mit Prolin-reichen Regionen anderer Proteine interagieren können. Da Drebrin innerhalb seines C-terminalen Abschnitts eine solche Region besitzt, wurde versucht, über dessen Interaktionsverhalten mögliche Bindepartner zu identifizieren. In Punkt 3.5.2. wurde mit Hilfe des Programms ScanSite 2.0 bereits gezeigt, welche Interaktionspartner Drebrin theoretisch anhand seiner Molekularstruktur über die poly-Prolinregion binden könnte.

Für die Identifizierung möglicher Interaktionspartner von Drebrin über seine Prolin-reiche Domäne wurde der „TransSignal™ SH3 Domain Array I“ der Firma Panomics verwendet. Hierbei wird das Protein von Interesse mit aufgereinigten und auf Membranen immobilisierte SH3-Domänen unterschiedlicher Proteine inkubiert. In diesem Experiment wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die poly-Prolinregion von Drebrin als MBP (*maltose binding protein*)-Fusionsprotein eingesetzt (s. Schema 3 in Abb. 3.18. „PP-MAL“: AS 348-428). Mit Hilfe eines MBP-spezifischen Antikörpers konnte im Western Blot Verfahren die Interaktion des eingesetzten Fusionsproteins mit den unterschiedlichen SH3-Proteinen untersucht werden. Intensive Reaktionen des poly-Prolin-Fusionsproteins ergaben sich vor allem mit Spectrin und Abl2 (Arg) (s. Abb. 3.18. A, B.: Signale A-5,6; bzw. A-13,14). Des Weiteren konnten mittelstarke Reaktionen mit Cortactin (A-7,8), Crk (A-19,20), Y124 (C-5,6), BTK (C-9,10) und Stam (C-19,20) festgestellt werden. Die durch Scansite 2.0 (s. Punkt 3.5.2.) vorausgesagten Interaktionspartner dieser Domäne konnten somit im Fall von Crk und Cortactin, aber nicht für c-Src und Itk, bestätigt werden. Im Fall der vorhergesagten Interaktion mit Abl1/2 konnte mit Hilfe des „TransSignal™ SH3 Domain Array I“ diese Bindung auf Abl2 (Arg) eingegrenzt werden, da im Gegensatz zu Abl2 (Abb. 3.18. A, Signal A-13,14) lediglich eine sehr schwache Reakti-

3. Ergebnisse

on mit Abl1 hervorgerufen wurde (s. Abb. 3.18., Signal D-3,4). In den folgenden Untersuchungen wurde somit vor allem auf die Interaktionen mit denjenigen Proteinen eingegangen, die sowohl durch die molekularen Vorhersagen als auch durch die Bestätigung im „TransSignal™ SH3 Domain Array als Bindepartner für Drebrin in Frage kommen.

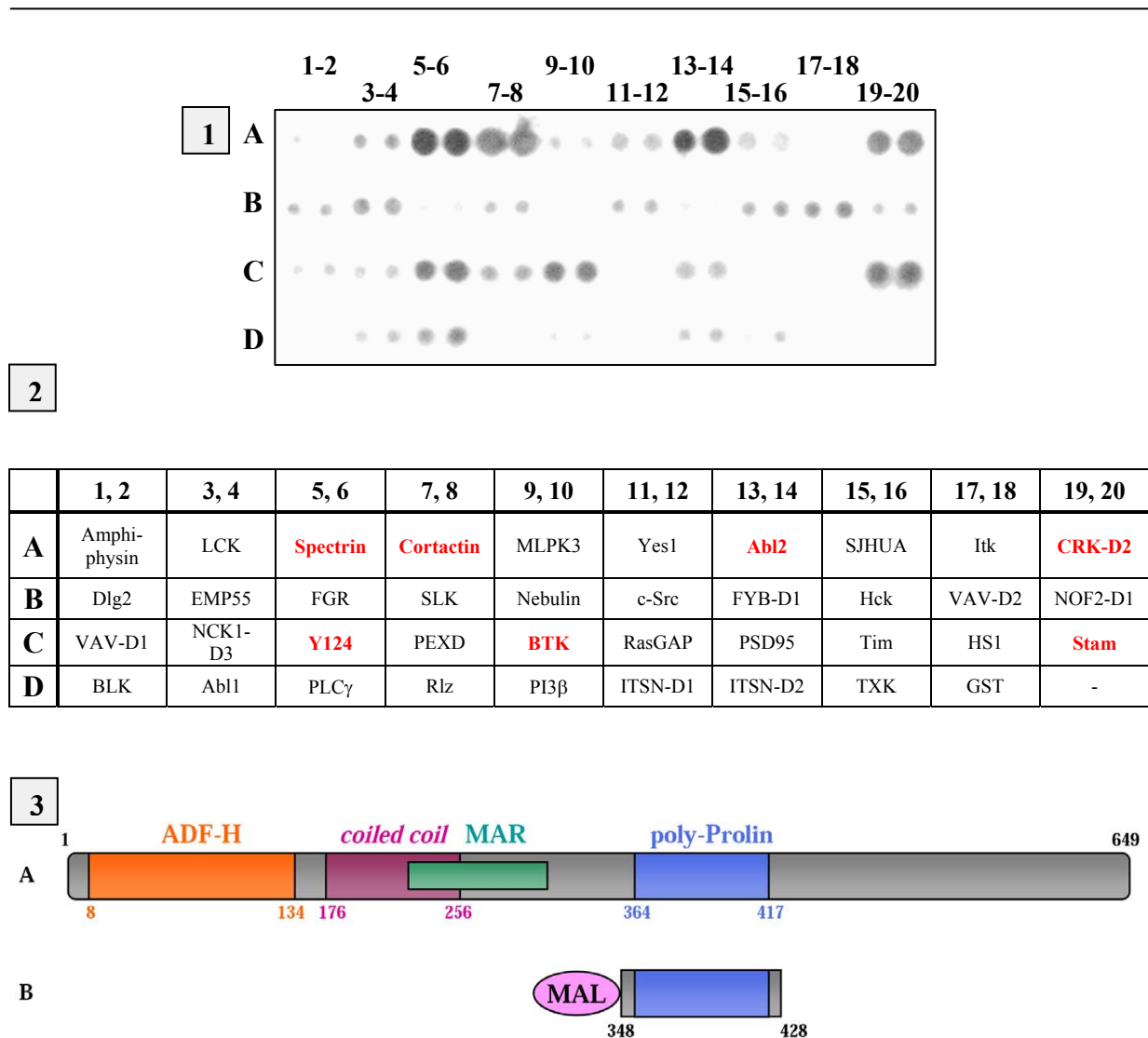


Abb. 3.18. Interaktionen zwischen der poly-Proline-Region von Drebrin mit fixierten SH3-Domänen verschiedener Proteine („TransSignal™ SH3 Domain Array“)

Auf eine Membran fixierte SH3-Domänen verschiedener möglicher Bindepartner von Drebrin wurden mit dem MBP-Fusionsprotein PP(poly-Proline)-MAL (3B, schematisch) inkubiert. Mit Hilfe eines spezifischen MBP-Antikörpers wurden die verschiedenen Interaktionsintensitäten (1) ausgewertet. Die fixierten SH3-spots liegen dupliziert vor. Sehr starke und mittelstarke Interaktionen zwischen PP-MAL und fixierten SH3-Domänen verschiedener möglicher Interaktionspartner sind in der Tabelle (2) **rot** hervorgehoben.

Die subzelluläre Lokalisation in HUVEC bzw. die Interaktionen der entsprechenden Proteine (Abl2, Cortactin, Crk sowie Spectrin) mit Drebrin sollten zusätzlich mittels bildgebender Immunfluoreszenz-Verfahren untersucht werden. In Abb. 3.19. ist mit Hilfe einer Überlagerung mit dem F-Aktin-Fluoreszenzsignal zu erkennen, dass Abl2, Cortactin, Crk und Spectrin vor allem in Aktin *waves*, aber auch in vereinzelt podosomalen Strukturen angereichert sind.

Durch die gleichzeitige Immunfluoreszenzfärbung von Drebrin und diesen putativen Bindepartnern konnte die Interaktion vor allem zwischen Abl2 bzw. Crk und Drebrin bestätigt werden (s. Abb. 3.20.). Sie findet somit nicht nur auf biochemischer Ebene (s. „TransSignalTM SH3 *Domain Array*“; Abb. 3.18.-1, 2) zwischen den untersuchten molekularen Untereinheiten statt, sondern bezieht sich auch auf die subzelluläre Verteilung der Proteine in HUVEC. Im Gegensatz zu Abl2 interagiert Crk allerdings nicht nur in Aktin *waves*, sondern ebenfalls in protrusiven Zellstrukturen mit Drebrin (s. Abb. 3.20. Pfeile).

Basierend auf den mit dem „TransSignalTM SH3 *Domain Array* I“ gewonnenen Ergebnissen besteht die Annahme, dass die Bindung zwischen der SH3-Domäne von Stam und der poly-Prolinregion von Drebrin ebenfalls möglich ist und auf diese Weise eine Interaktion der beiden Moleküle vermittelt werden kann. Diese konnte allerdings mit bildgebenden Verfahren nicht bestätigt werden. HUVEC wurden mit HA-Konstrukten von Stam I und StamII transfiziert. Nach 16h Expressionsdauer wurden die Fusionsproteine mit Hilfe eines gegen HA gerichteten Antikörpers detektiert. Es konnte keine Lokalisation in Podosomen oder Aktin *waves* festgestellt werden (nicht gezeigt).

Es konnte somit gezeigt werden, dass Drebrin in HUVEC möglicherweise in direkter Interaktion mit den Proteinen Abl2 und Crk steht. Ferner besteht eine gemeinsame Anreicherung von Drebrin und Cortactin, bzw. Spectrin, in Aktin *waves*. Diese Interaktionen kommen vermutlich über einen Prolin-reichen C-terminalen Abschnitt innerhalb des Drebrinmoleküls mit den SH3-Domänen der genannten Proteine zustande.

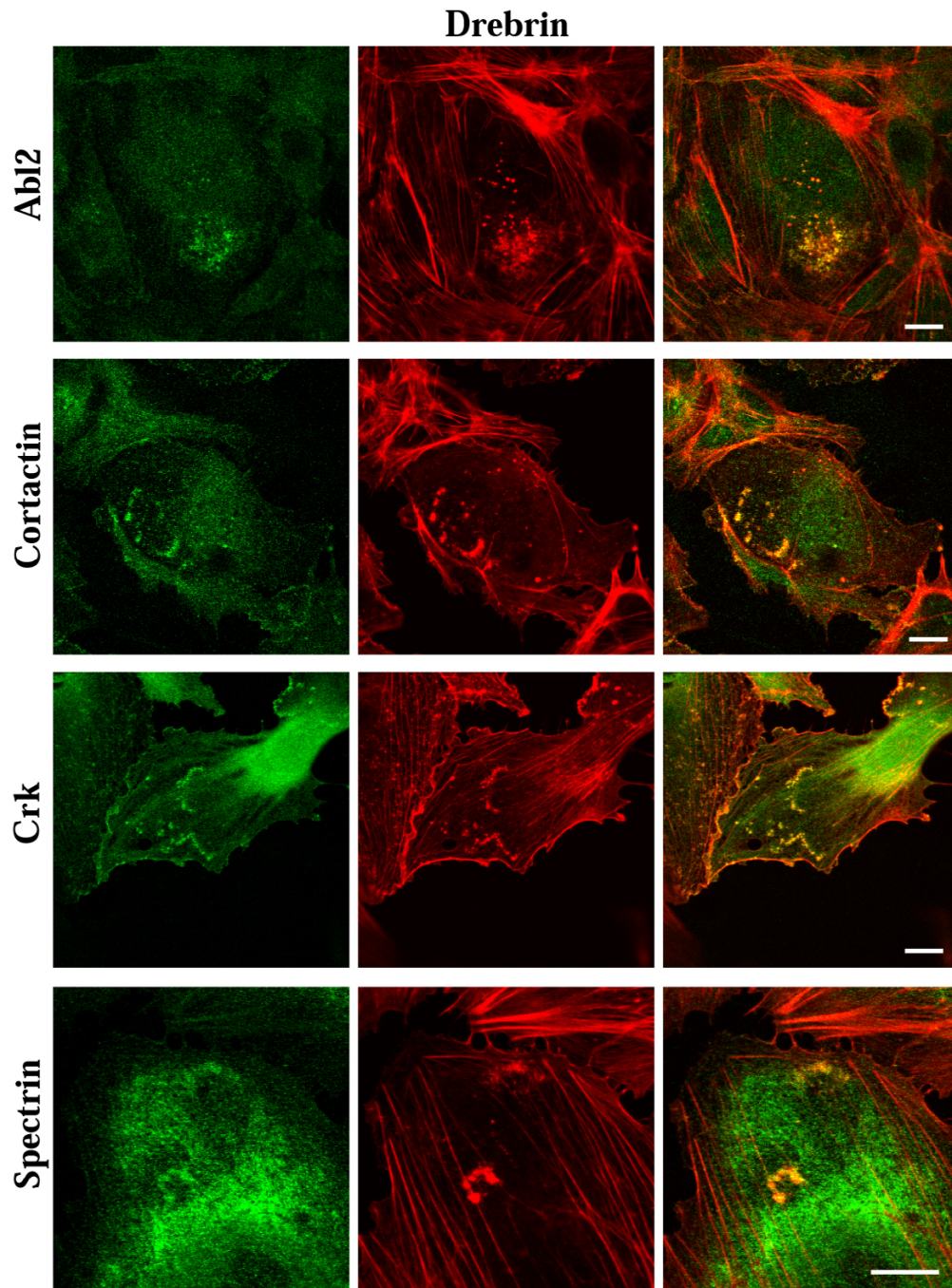


Abb. 3.19. Lokalisierung der Interaktionspartner von Drebrin in Rosetten und Aktin waves in HUVEC

Auf Kollagen kultivierte HUVEC wurden fixiert und zellinternes Abl2, Cortactin, Crk und Spectrin mittels Immunfluoreszenzfärbung auf ihre Lokalisation in Rosetten und Aktin waves hin untersucht (grün); Aktin wurde mit rot fluoreszierendem Phalloidin markiert. Alle untersuchten Proteine liegen angereichert in Aktin waves vor (Überlagerung mit Aktinsignal in gelb); weiße Balken: 10 μ m

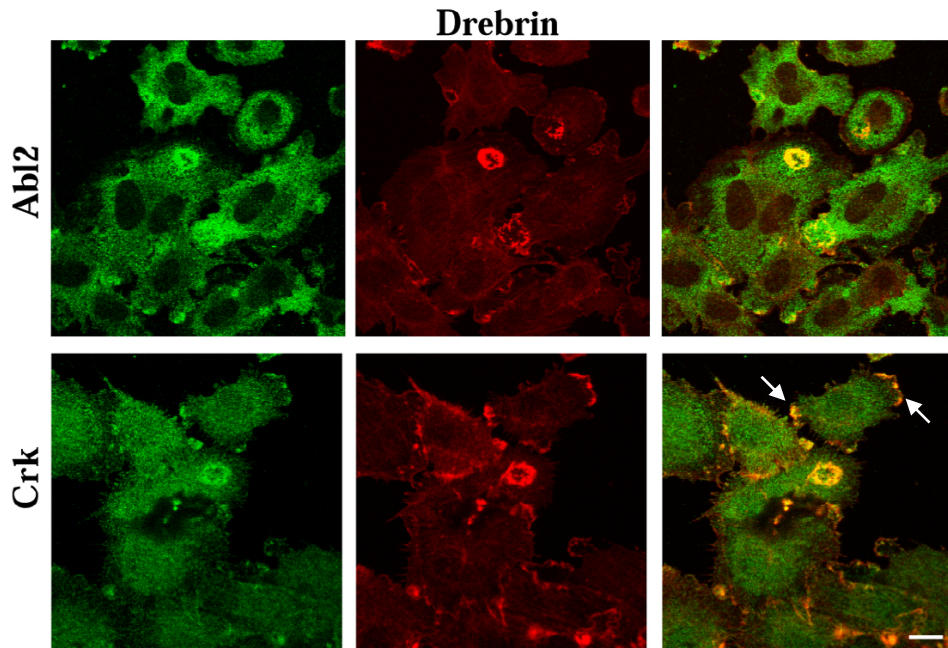


Abb. 3.20. Crk und Abl2 liegen zusammen mit Drebrin angereichert in Aktin waves in HUVEC vor

Auf Kollagen kultivierte HUVEC wurden fixiert, zellinternes Abl2 und Crk mittels Immunfluoreszenzfärbung visualisiert (grün) und die so markierten Proteine auf ihre Lokalisation mit zelleigenem Drebrin (rot) hin untersucht. Sowohl Abl2 als auch Crk liegen stark angereichert mit Drebrin in Aktin waves vor (Überlagerung in gelb); Crk kommt im Gegensatz zu Abl2 auch gemeinsam mit Drebrin in der Zellperipherie vor; weiße Balken: 10 μ m

3.5.4. Die Transfektion C-terminaler Drebrin-Konstrukte inhibiert die Ausbildung von Aktin waves in HUVEC

Wie im vorangegangenen Punkt (3.5.4.) gezeigt werden konnte, kolokalisieren die SH3-Proteine Abl2 und Crk mit Drebrin in Aktin waves (s. Abb. 3.20.). Dies beruht vermutlich auf der Interaktion mit der C-terminalen poly-Prolinregion innerhalb des Drebrinmoleküls. Dadurch würde dem C-terminalen Abschnitt von Drebrin, bzw. der poly-Prolinregion innerhalb dieser Region eventuell eine wichtige Rolle bei der Bindung zwischen Drebrin und seinen Interaktionspartnern zukommen.

Um die Rolle dieser molekularen Abschnitte im Hinblick auf die Bildung von Aktin waves zu untersuchen wurden HUVEC mit den GFP-Fusionsproteinen zur poly-Prolinregion (Aminosäure 348-428), bzw. zum C-Terminus (Aminosäure 348-633) (s. Abb. 3.21. A) transfiziert und nach einer Expressionsdauer von 16 h fixiert. Zellinternes F-Aktin wurde mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin visualisiert. Mit Hilfe der Konfokalmikroskopie wurden die Zellen auf ihre

3. Ergebnisse

Fähigkeit Aktin *waves* auszubilden untersucht. Wie aus Abb. 3.21. B hervorgeht, ist die Aktin *waves* Bildungsrate durch die Transfektionen mit den C-terminalen Teilkonstrukten signifikant ($6,6 \pm 1,1$ %) beeinträchtigt. Die Transfektion mit dem GFP- Vollängen-Konstrukt von Drebrin hat dagegen mit einer Aktin *wave* Bildungsrate von $113,3 \pm 2,5$ % im Vergleich zur Kontrolle keinen Effekt dieser Art zur Folge.

Über die Transfektion von HUVEC mit GFP-Konstrukten der poly-Prolinregion, bzw. des gesamten C-terminalen Abschnitts, konnte somit festgestellt werden, dass diese molekularen Abschnitte für die Bildung von Aktin *waves* im Allgemeinen eine wichtige Rolle spielen, da die Bildungsrate von Aktin *waves* nach der Transfektion signifikant beeinträchtigt wurde.

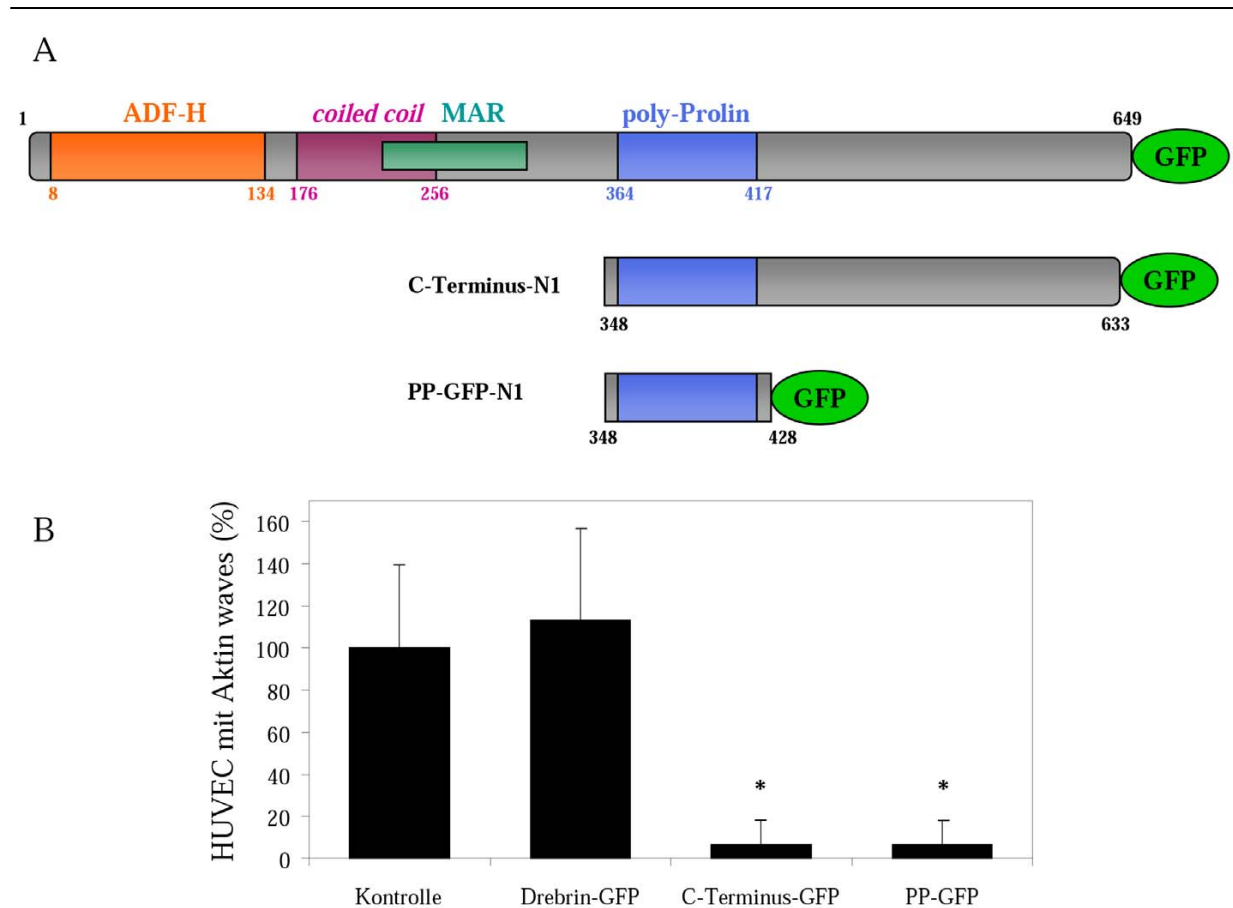


Abb. 3.21. Die Transfektion verschiedener Drebrinkonstrukte führt zur Reduktion der Aktin *waves* in HUVEC

(A) Schematische Darstellung der zur Transfektion verwendeten Konstrukte: Drebrin-GFP-N1; C-Terminus-GFP-N1, PP (poly-Prolinregion)-GFP-N1; (B) Statistische Auswertung der Transfektion von HUVEC mit den in (A) aufgeführten GFP-Teilkonstrukten von Drebrin. Die Transfektion der poly-Prolinregion, bzw. des C-terminalen Abschnitts von Drebrin bewirkt eine signifikante Verminderung der Ausbildung von Aktin *waves*; * $p \leq 0,05$

3.6. Drebrin interagiert mit α -Actinin und Myosin IIa

Um weitere mögliche Interaktionspartner von Drebrin zu identifizieren wurden Immunfluoreszenz-Färbungen verschiedener Proteine in HUVEC durchgeführt und auf ihre Kolokalisierung mit Drebrin hin untersucht. Hinweise zu den in Frage kommenden Proteinen stammten teilweise aus in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Immunpräzipitations-Versuchen mit Drebrin-GFP. Es bestand die Vermutung, dass Drebrin in HUVEC mit α -Actinin, Vimentin, sowie den Myosinen 1c, IIa und V interagieren könnte. Zusätzlich wurde bereits durch Hayashi *et al.* (1996) gezeigt, dass Drebrin mit Myosinen und α -Actinin gemeinsam im Zytoskelett embryonaler Rattenneuriten interagiert. Es sollte im somit festgestellt werden, ob Drebrin mit den oben genannten Proteinen in podosomalen Strukturen in HUVEC interagiert. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob sich eventuell festgestellte Interaktionen mit Drebrin auch auf Aktin *waves* beziehen.

Durch die Immunpräzipitation von zellinternem Myosin IIa mit einem spezifischen Antikörper konnte eine Interaktion mit Drebrin auf biochemischer Ebene nachgewiesen werden (s. Abb. 3.22. A). In HUVEC überexprimiertes und präzipitiertes α -Actinin-GFP interagiert ebenfalls mit Drebrin (s. Abb. 3.22. B). Zellinternes Drebrin kopräzipitiert sowohl mit α -Actinin als auch mit Myosin IIa (s. Abb. 3.22. A).

Die somit festgestellten Bindungen sind allerdings nur auf die verwendeten Lysate bezogen, sie sagen nichts über die tatsächliche intrazelluläre Interaktion aus. Aus diesem Grund wurden Immunfluoreszenz-Untersuchungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden HUVEC auf Kollagen ausgesät, fixiert und die Proteine von Interesse mittels spezifischer Immunfluoreszenzfärbung markiert, um ihre subzelluläre Lokalisierung darzustellen. Während die Auswertungen dieser Untersuchung für Myosin IIa zu keinem eindeutigen Resultat führten, zeigten die Immunfluoreszenz-Aufnahmen im Fall von α -Actinin eine deutliche Interaktion mit Drebrin in podosomalen Überstrukturen und Aktin *waves* (s. Abb. 3.22.). Die Kombination dieser Ergebnisse lässt eine Interaktion zwischen α -Actinin und Drebrin in Aktin *waves* als sehr wahrscheinlich gelten.

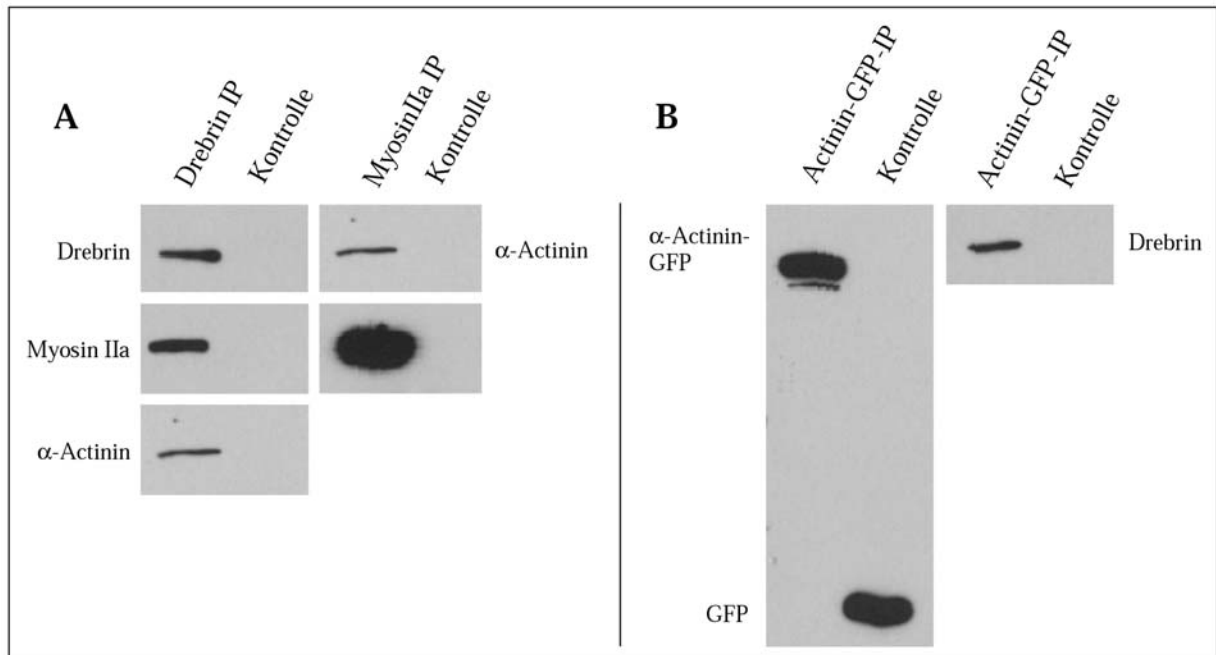


Abb. 3.22. Drebrin interagiert in HUVEC mit α -Actinin

(A) Immunologischer Nachweis von Drebrin und α -Actinin nach der Immunpräzipitation von Drebrin aus HUVEC-Lysat. Es wurde ein Drebrin-spezifischer Antikörper verwendet. Zur Kontrolle wurde Meerschwein-IgG eingesetzt. Unter den mit Drebrin kopräzipitierten Proteinen wurde α -Actinin identifiziert; (B) Die Überexpression und anschließende Präzipitation von α -Actinin-GFP lässt Rückschlüsse auf eine Interaktion mit zellinternem Drebrin zu. Zur Kontrolle wurden HUVEC mit dem GFP-Leervektor transfiziert.

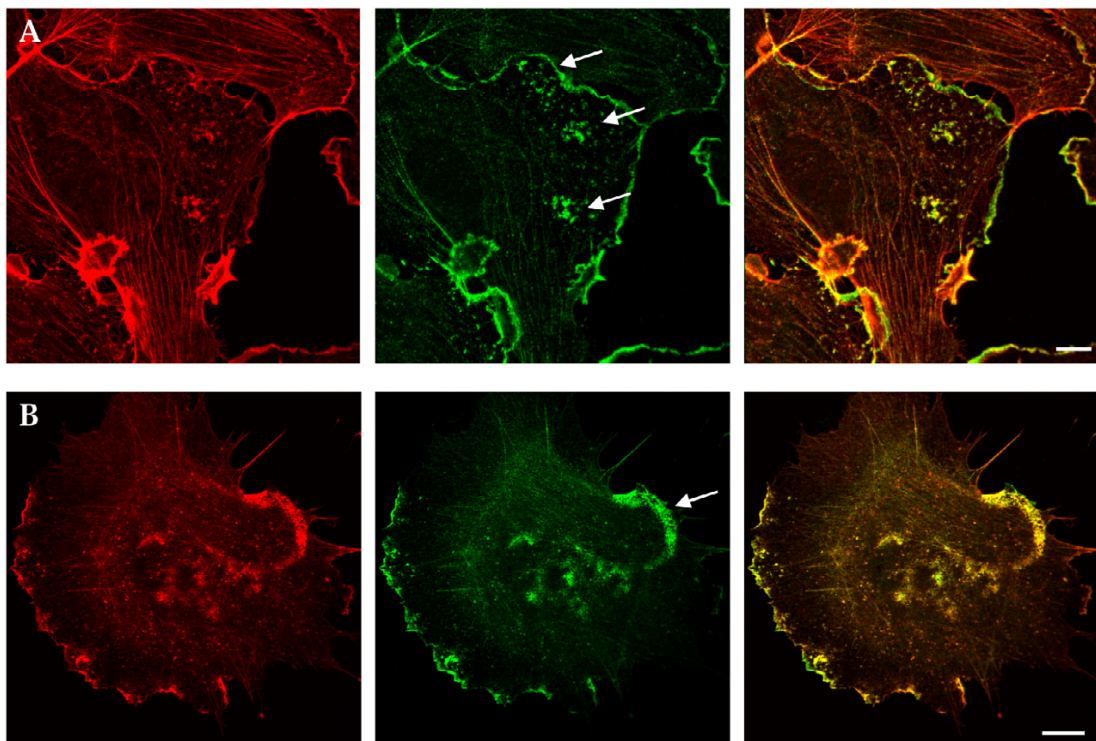


Abb 3.23. Drebrin kolokalisiert mit α -Actinin in Podosomen und Aktin waves

HUVEC wurden mit Hilfe von α -Actinin- und Drebrin-spezifischen Antikörpern fluoreszenzmarkiert. Sowohl in Podosomen (A, Pfeile) als auch in Aktin waves (B, Pfeil) konnte eine Überlagerung (gelb) der Fluoreszenzsignale von Drebrin (rot) und α -Actinin (grün) festgestellt werden; weißer Balken: 10 μ m

3.7. Drebrin ist beteiligt an der Ausbildung von Zell-Zellkontakten

3.7.1. Aktin waves in HUVEC führen zur Anreicherung von Drebrin an Zellkontaktstellen

Die Beobachtung, dass während der Adhäsion von HUVEC ein massiv erhöhtes Auftreten von Drebrin-reichen Strukturen in der Zellperipherie auftritt, verleitet zu der Annahme, dass Drebrin in adhäsive, migratorische oder zellkontaktbildende Vorgänge involviert ist. Wie bereits in Punkt 3.3. gezeigt werden konnte, spielt Drebrin offenbar keine entscheidende Rolle bei der Ausbreitungsfähigkeit von HUVEC. Somit sollte im Folgenden seine mögliche Funktion in Migration und Zellkontaktausbildung untersucht werden.

Bei den während der frühen Adhäsion gebildeten Drebrin-Strukturen handelt es sich hauptsächlich um Aktin waves. Diese Strukturen (s. Schema in Abb. 3.2. und Abb. 1.7) bewegen sich mit einer hohen Dynamik auf die Zellperipherie zu, wo im Anschluss an eine Anreicherung des Drebrin-Signals eine Art „Verschmelzungsvorgang“ mit der Zellperipherie erfolgt. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde eine genauere Untersuchung von Zell-Zellkontakten in HUVEC durch *live cell* mikroskopische Aufnahmen durchgeführt.

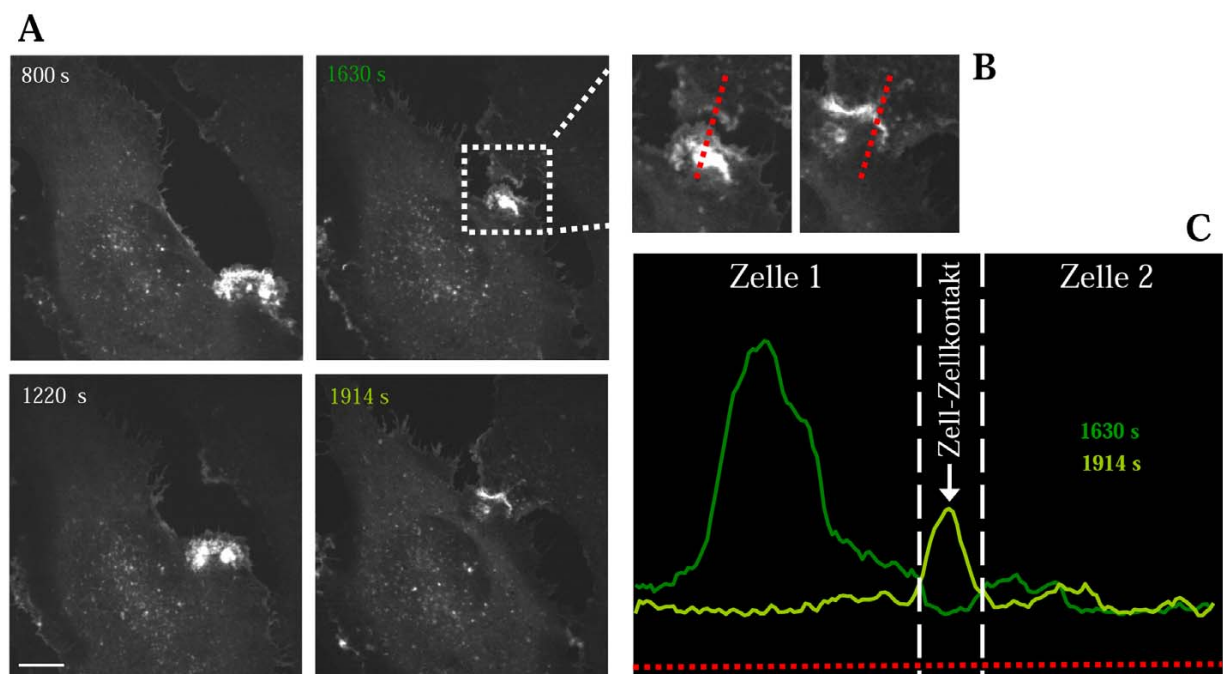


Abb. 3.24. Sukzessive Bildung von Drebrin-reichen Aktin waves und Zellprotrusionen in HUVEC

(A) 1-4: *live cell* Mikroskopie von HUVEC, 17 h nach Transfektion mit Drebrin-GFP; die Zellen wurden nach 16h erneut auf Kollagen ausgesät; Bildausschnitt (weiß gestrichelte Linie); (B): Bildausschnitt von A: Messung der Fluoreszenzintensität (rot gestrichelte Linie); (C) graphische Analyse der Fluoreszenzintensität von Zeitpunkt 3 (dunkelgrüne Linie; entspricht 13,8 min nach Versuchsstart) und Zeitpunkt 4 (hellgrüne Linie; 18,3 min); weißer Balken: 10 μ m

HUVEC wurden zu diesem Zweck mit Drebrin-GFP transfiziert, nach 16h Expressionsdauer abgelöst und erneut auf Kollagen ausgesät. Nach einer Stunde Adhäsionszeit wurden die Aufnahmen gestartet. Es zeigte sich, dass mit Drebrin-GFP beladene Aktin *waves* durch die ihnen eigene Dynamik eine Anreicherung von Drebrin in neu ausgebildeten Zellkontaktstellen bewirken (s. Abb. 3.24. bzw. Anhang: Film 5). Die Translokation der offenbar mit Drebrin-GFP „beladenen“ Aktinwelle in Richtung der Zellperipherie findet innerhalb weniger Minuten statt. Gleichzeitig erfolgt dort die Ausbildung protrusiver Strukturen (s. Abb. 3.24. B,C).

3.7.2. VE-Cadherin kolokalisiert zeitweise mit Drebrin an Zellkontaktstellen, aber nicht an Podosomen oder Aktin *waves*

Aufgrund der in Punkt 3.7.1. beschriebenen Beobachtungen, dass via Aktin *waves* eine Anreicherung von Drebrin in neu ausgebildeten Zellkontaktstellen erfolgt, liegt es nahe, eine Funktion Drebrins in der Neuausbildung von Zellkontakten anzunehmen. Zur Bestätigung dieser Vermutung wurde die subzelluläre Interaktion von Drebrin mit VE-Cadherin untersucht. Bei VE-Cadherin handelt es sich um einen klassischen Vertreter von Zellkontaktproteinen. Es ist, wie eingangs unter Punkt 1.2.1. beschrieben, ein Transmembranprotein, welches einen grundlegenden Bestandteil von *adherens junctions* bildet.

Zur genaueren Untersuchung einer eventuellen Interaktion zwischen Drebrin und VE-Cadherin wurden HUVEC mit einer Dichte von 60.000 Zellen/cm² auf Kollagen ausgesät und kultiviert. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten (1-24 h) und die Immunfluoreszenzmarkierung von Drebrin und VE-Cadherin mit Hilfe spezifischer Antikörper. Zellinternes F-Aktin wurde mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin visualisiert.

Es wurde festgestellt, dass Drebrin vor allem in neu ausgebildeten Zellkontakten, die nach einer Adhäsionszeit von einer Stunde ermöglicht werden, angereichert ist und mit VE-Cadherin kolokalisiert (s. Abb. 3.25 A). Allerdings konnte ebenfalls beobachtet werden, dass HUVEC, die länger als zwei Stunden Gelegenheit zur Kontaktausbildung untereinander hatten, eine deutlich geringere Drebrinkonzentration in den Kontaktstellen aufweisen und damit auch nur eine geringfügige Interaktion zwischen Drebrin und VE-Cadherin stattfindet (s. Abb. 3.25. B und Abb. 3.26, gelber Pfeil). Generell wurde festgestellt, dass VE-Cadherin nicht an Aktin *waves* lokalisiert (s. Abb. 3.26., weißer Pfeil).

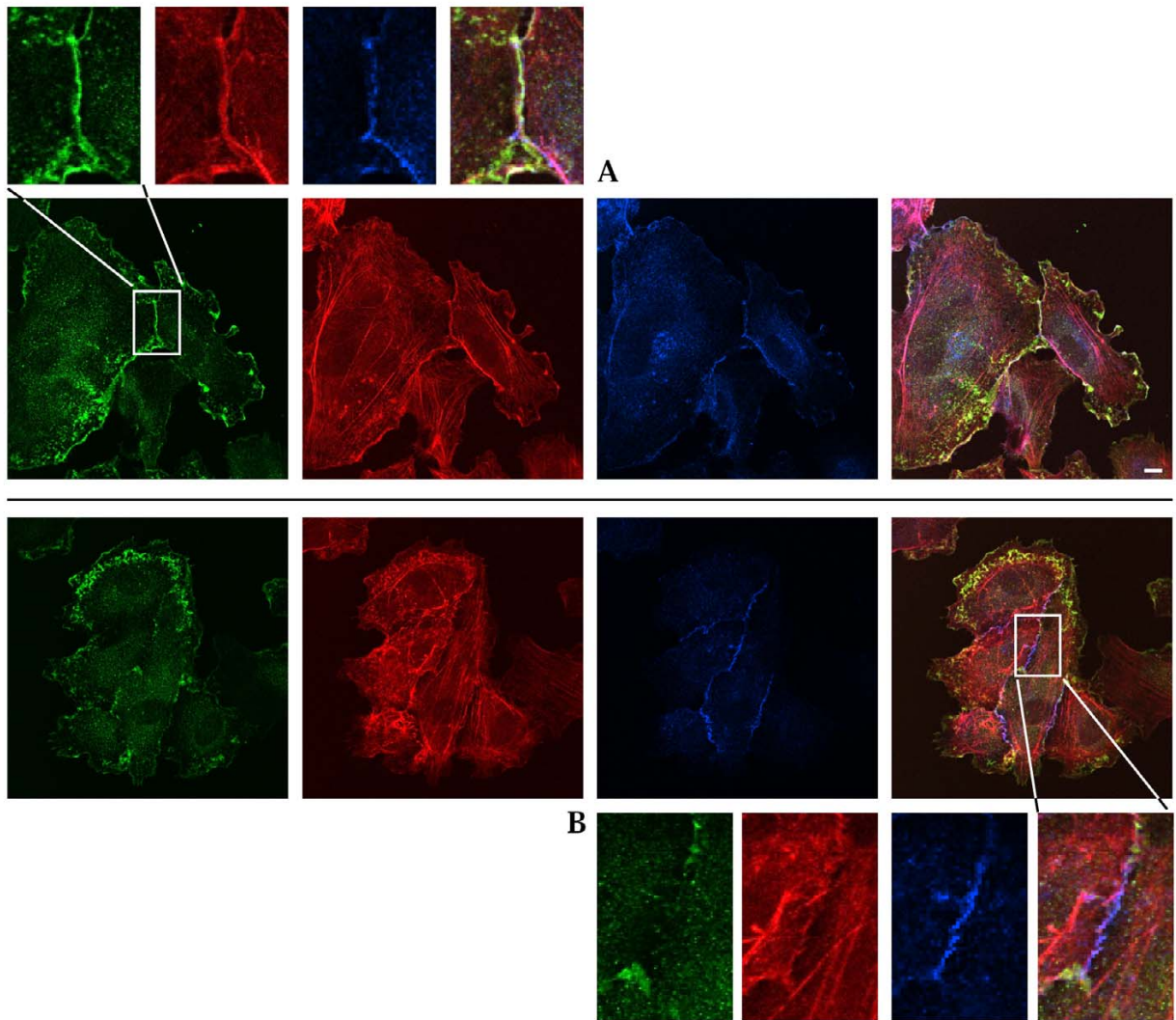


Abb. 3.25. Drebrin ist kurzfristig in neu ausgebildeten Zellkontakten angereichert

HUVEC wurden für 1h (A) bzw. 2h (B) auf Kollagen kultiviert und anschließend fixiert. Durch Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischen Antikörpern wurden zelleigenes Drebrin (grün) und VE-Cadherin (blau) markiert; Aktin wurde durch TRITC-markiertes Phalloidin visualisiert (rot) (Überlagerung aller Komponenten in weiß); Drebrin kolokalisiert mit VE-Cadherin an neu ausgebildeten Zellkontakten (A, Ausschnitt); während vollständig ausgeprägte Zellkontakte kein Drebrin enthalten (B, Ausschnitt); weißer Balken: 10 µm

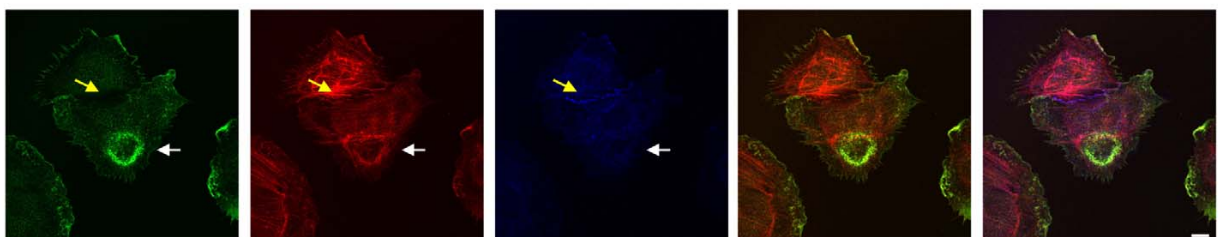


Abb. 3.26. Immunfluoreszenzfärbung von Drebrin und VE-Cadherin in HUVEC

HUVEC wurden für die Dauer von 2h auf Kollagen kultiviert und anschließend fixiert; Mittels Immunfluoreszenzfärbung wurden Drebrin (grün), Aktin (rot) und VE-Cadherin (blau) markiert. Nach dieser Kultivierungsdauer ist weder eine Kolokalisierung von Drebrin und VE-Cadherin in Aktin waves (weißer Pfeil), noch in Zell-Zellkontakten zu erkennen (gelber Pfeil); weißer Balken: 10 µm

Die räumlich und zeitlich eingeschränkte Kolo-kalisation von Drebrin und VE-Cadherin an Zellkontaktstellen bestärkte den Verdacht, dass Drebrin an Prozessen der Zellkontakt-Bildung, bzw. -Regulation beteiligt sein könnte. Durch die weitere Untersuchung der Interaktion zwischen Drebrin und Zellkontaktproteinen sollte die Funktion Drebrins in diesen Prozessen weiter aufgeklärt werden.

3.7.3. Drebrin *knockdown* bewirkt eine Verminderung des VE-Cadherin-Levels an Zell-Zellkontakten

Anhand eines Drebrin *knockdowns* in HUVEC sollte untersucht werden, inwieweit Drebrin an der Ausbildung von Zellkontakten zwischen benachbarten Endothelzellen beteiligt ist. Zu diesem Zweck wurde vektorkodierte, für Drebrin spezifische shRNA eingesetzt. Der zum verwendeten "psiSRIKE™ U6 hairpin Cloning System-hMGFP" gehörende Vektor kodiert zusätzlich für GFP, wodurch die Identifizierung transfizierter Zellen gewährleistet und ein direkter Vergleich von transfizierten und nicht-transfizierten Zellen in bildgebenden Analyseverfahren ermöglicht wird.

HUVEC wurden mit Drebrin-spezifischer vektorkodierter shRNA transfiziert. Als Kontrolle wurde eine unspezifische Zielsequenz mit einer randomisierten Basenabfolge („*scrambled*“) Sequenz verwendet. Nach 4 Tagen wurden die Zellen erneut auf Kollagen ausgesät und nach der Fixierung für die Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt und mittels spezifischer Antikörper gegen Drebrin und VE-Cadherin diese Proteine sichtbar gemacht.

Konfokalmikroskopische Aufnahmen (Abb. 3.27.) zeigen, dass in shRNA-exprimierenden Zellen die Drebrinfärbung nach der Drebrin-shRNA-Transfektion deutlich schwächer ausfällt als in ihren nicht-transfizierten Nachbarzellen, bzw. den mit der Kontroll-shRNA transfizierten HUVEC.

Die Untersuchung der Kontroll-shRNA-transfizierten HUVEC zeigt ebenfalls, dass nach der im Versuch eingesetzten Adhäsionsdauer von 24 h VE-Cadherin in den Zell-Zellkontakten deutlich angereichert ist. Auch in den Kontaktstellen zwischen transfizierten und nicht-transfizierten Zellen ist VE-Cadherin detektierbar. Es fällt allerdings auf, dass VE-Cadherin in den Zell-Zell-Kontaktstellen zwischen benachbarten Drebrin *knockdown* Zellen nicht mehr nachweisbar ist. Der Verlust von VE-Cadherin in den betroffenen Kontaktstellen wurde in ca. 50% der erfassten Bildausschnitte beobachtet.

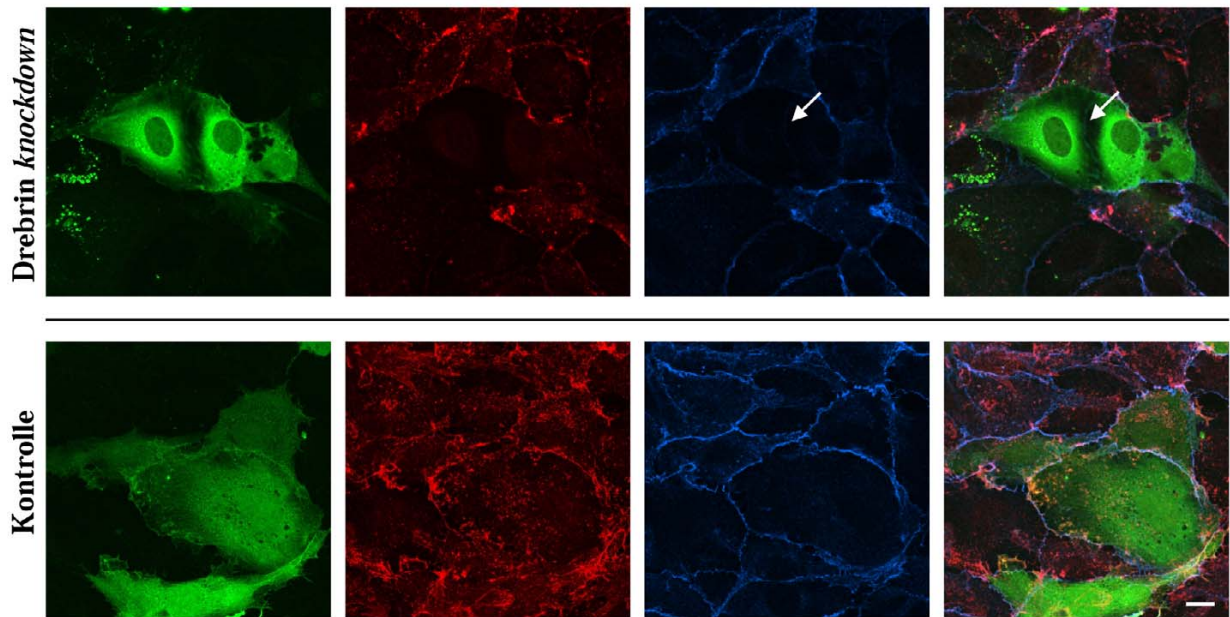


Abb. 3.27. Drebrin *knockdown* führt zu einer verminderten Lokalisierung von VE-Cadherin an Zellkontaktstellen

HUVEC wurden 4 Tage vor dem Versuch mit Drebrin-spezifischer vektorkodierter shRNA, bzw. einer Kontroll-shRNA, transfiziert. Anschließend wurden die Zellen auf Kollagen ausgesät und nach 24 h fixiert, um die Ausbildung eines Monolayers zu ermöglichen. Anschließend erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung von Drebrin (rot), um die Effizienz des Drebrin *knockdown* nachzuweisen, sowie von VE-Cadherin (blau). shRNA-transfizierte Zellen exprimieren zusätzlich GFP und erscheinen daher grün. Besondere Aufmerksamkeit galt der Kontaktstelle zwischen zwei Drebrin-defizienten Zellen, da VE-Cadherin dort nicht nachweisbar ist (Pfeil); weißer Balken: 10 μm

Um zu untersuchen, ob die Abnahme des VE-Cadherin-Signals in den Zellkontakten nach der shRNA-Behandlung auf eine verminderte Rekrutierung an die Zell-Zellkontakte oder auf eine Veränderung des Expressionslevels von VE-Cadherin zurückzuführen ist, wurden mit shRNA behandelte Zellen nach 1-4 Tagen lysiert und vergleichbare Proteinmengen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion von VE-Cadherin und Drebrin zur Kontrolle erfolgte mit spezifischen Antikörpern im Western Blot Verfahren.

Es wurde festgestellt, dass nach dem Drebrin *knockdown* nicht nur die intrazelluläre Konzentration von Drebrin vermindert wird. Auch die VE-Cadherin-Konzentration nimmt im Vergleich zur Transfektion mit Kontroll-shRNA deutlich ab. Dieser Effekt tritt bereits nach einem Tag ein. (Abb. 3.28.). Offensichtlich handelt es sich bei der Verminderung der VE-Cadherin-Konzentration an den Zellkontakten zwischen Drebrin *knockdown* Zellen nicht auf einen Effekt, der auf eine gestörte Rekrutierung des Proteins beruht. Vielmehr liegt die Ursache in einer generellen Abnahme der intrazellulären VE-Cadherin-Konzentration.

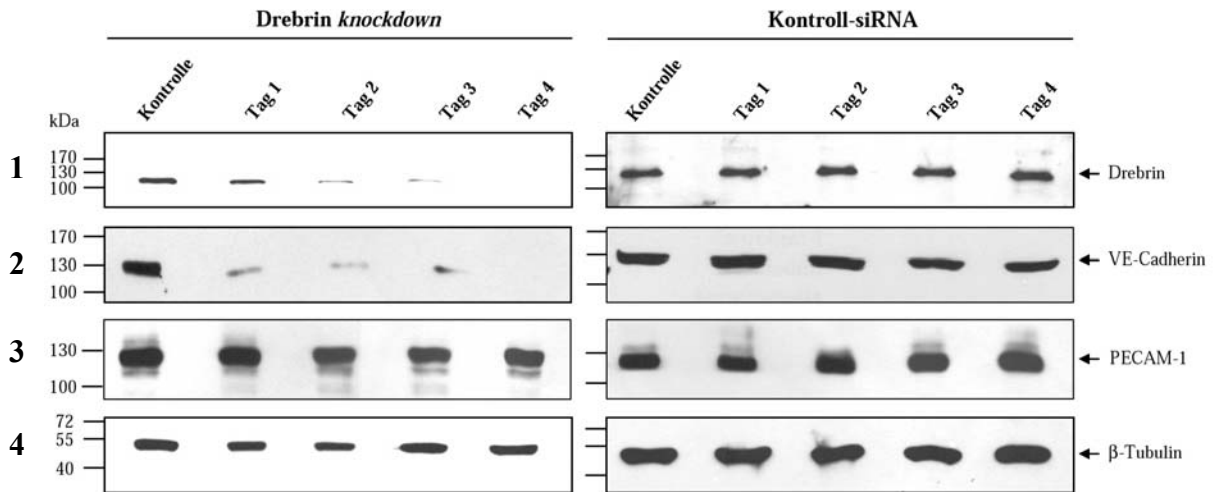


Abb. 3.28. Der *knockdown* von Drebrin in HUVEC mit spezifischer siRNA hat eine Abnahme des intrazellulären VE-Cadherin-Levels zur Folge.

HUVEC wurden mit Drebrin-spezifischer siRNA transfiziert und nach 1-4 Tagen lysiert. Es wurden vergleichbare Proteinmengen auf SDS-Gele aufgetragen und mittels Western Blot Analyse auf ihren Drebrin-, Tubulin-, bzw. VE-Cadherin-Gehalt hin untersucht; (1) Die Drebrinkonzentration nimmt nach der Transfektion stetig, bis unter die Nachweisgrenze an Tag 4, ab, während die β -Tubulinkonzentration (4) sowie der Gehalt an PECAM-1 (3) konstant bleibt; (2) Der *knockdown* von Drebrin hat eine rasche Abnahme der VE-Cadherin-Konzentration zur Folge, was sich bereits einen Tag nach der Transfektion bemerkbar macht.

Trotz dieses Nebeneffektes des Drebrin *knockdowns* wurde keine Beeinträchtigung in der Ausbildung von konfluenten HUVEC *monolayer* beobachtet. Offensichtlich ist es den Zellen dennoch möglich, Zellkontakte auszubilden. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob weitere Zellkontaktproteine von diesem Phänomen betroffen sind, und welche trotz des verminderten VE-Cadherin Levels in der Lage sind, weiter für die Verbindung benachbarter Endothelzellen zu sorgen.

3.7.4. Drebrin *knockdown* beeinträchtigt weder die Lokalisierung von β -Catenin noch von PECAM-1 an Zell-Zellkontakten

Um genauer die Beeinträchtigung des Aufbaus und der Funktion von *adherens junctions* durch Drebrin zu untersuchen, wurde das in Punkt 3.7.3. beschriebene *knockdown*-Experiment mit den Proteinen β -Catenin und PECAM-1 wiederholt. Beide Proteine sind an der Ausbildung von *adherens junctions* beteiligt. β -Catenin ist, wie bereits in Punkt 1.2.1. erwähnt, in der Lage, an der Zellmembran mit der zytoplasmatischen Domäne von VE-Cadherin zu interagieren. β -Catenin selbst ist kein Transmembranprotein. Zusammen mit α -Catenin dient es als Verbindung zwischen VE-Cadherin und dem Aktinzytoskelett. Es stellte sich die Frage, ob die Lokalisation von β -Catenin auch nach dem *knockdown* von Drebrin und der damit verbundenen

deutlichen Reduktion von VE-Cadherin aus der Zellkontakfläche möglich ist. PECAM-1 ist ein Transmembranprotein, welches in der konfluenten Endothelschicht vor allem in den Zellkontakten vorkommt und über homo- und heterophile Bindungen als Adhäsionsmolekül fungiert.

Die Immunfluoreszenzanalyse zeigte, dass der *knockdown* von Drebrin weder zu einer Veränderung der β -Catenin-Konzentration an Zellkontakten führte (Abb. 3.29.), noch die interzellulären Lokalisation von PECAM-1 modulierte (s. Abb. 3.30.). Die *Western Blot* Analyse zeigte, dass die intrazelluläre Konzentration des Transmembranmoleküls PECAM-1 durch den Drebrin *knockdown* nicht beeinträchtigt wird (s. Abb. 3.28-3.). Auch die intrazelluläre β -Catenin-Konzentration wurde durch den Drebrin *knockdown* nicht verändert (Daten nicht gezeigt). Dennoch stellte sich die Frage, ob neben *adherens junctions* andere Zellverbindungen von den Auswirkungen des Drebrin *knockdown* ebenfalls betroffen sein könnten.

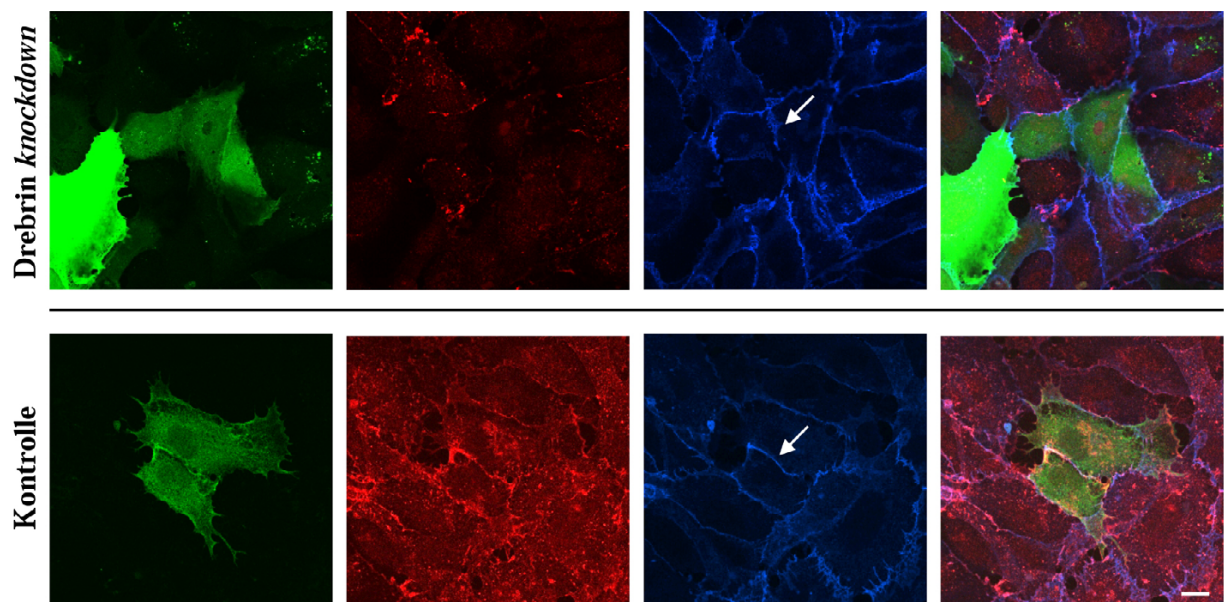


Abb. 3.29. Drebrin *knockdown* hat keinen Einfluss auf die Lokalisierung von β -Catenin in HUVEC

HUVEC wurden 4 Tage vor dem Versuch mit Drebrin-spezifischer vektorkodierter shRNA, bzw. einer KontrollshRNA, transfiziert. Anschließend wurden die Zellen auf Kollagen ausgesät und nach 24 h fixiert, um die Ausbildung eines *monolayers* zu ermöglichen. Anschließend erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung von Drebrin (rot), um die Effizienz des *knockdown* nachzuweisen, sowie von β -Catenin (blau). siRNA-transfizierte Zellen exprimieren zusätzlich GFP und erscheinen daher grün. Sowohl nach der Kontroll-shRNA-Behandlung als auch zwischen Drebrin *knockdown* Zellen lokalisiert Connexin43 in den Kontaktflächen zwischen benachbarten HUVEC; weißer Balken: 10 μ m

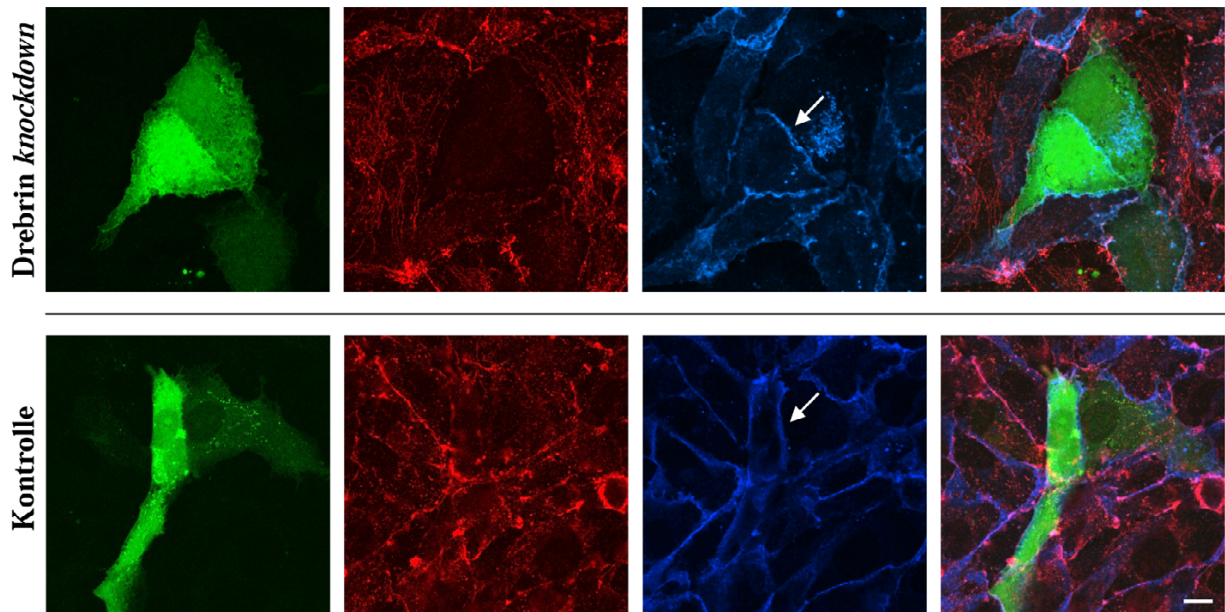


Abb. 3.30. Drebrin *knockdown* hat keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisierung von PECAM-1 in HUVEC

HUVEC wurden 4 Tage vor dem Versuch mit Drebrin-spezifischer vektorkodierter shRNA, bzw. einer KontrollshRNA, transfiziert. Anschließend wurden die Zellen auf Kollagen ausgesät und nach 24 h fixiert, um die Ausbildung eines Monolayers zu ermöglichen. Anschließend erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung von Drebrin (rot), um die Effizienz des *knockdown* nachzuweisen, sowie von PECAM-1 (blau). shRNA-transfizierte Zellen exprimieren zusätzlich GFP und erscheinen daher grün. Der Drebrin *knockdown* hat keine Beeinträchtigung der PECAM-1-Lokalisation zur Folge; weißer Balken: 10 μ m

3.7.5. Drebrin und Connexin43 lokalisieren gemeinsam an Zell-Zellkontakstellen, ohne sich zu überlagern

Mit der Untersuchung der Auswirkungen des Drebrin *knockdowns* auf *gap junctions* wurde eine andere Form des Zellkontaktes in diese Studie aufgenommen. Wie bereits unter Punkt 1.2.3. erläutert wurde, sind *gap junctions* aus Connexinen aufgebaute Kanäle, die den interzellulären Transport von kleinen Molekülen bis zu einer Größe von 1 kDa ermöglichen. Somit kann z. B. durch den Austausch von *second messenger*-Molekülen wie IP₃ und Kalzium-Ionen die interzelluläre Kommunikation gewährleistet werden. Im Endothel existieren drei Typen von Connexinen: Connexin 37, 40 und 43. Da Connexin43 den am besten untersuchten Vertreter dieser Gruppe darstellt, wurde es für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

Zu Beginn sollte festgestellt werden, ob die subzelluläre Lokalisation von Drebrin und Connexin43 auf eine Interaktion der beiden Proteine hinweist. Durch die Arbeit von Butkevich *et al.* (2004) konnte bereits gezeigt werden, dass eine Interaktion zwischen Drebrin und Connexin43 in Astrozyten und Vero-Zellen möglich ist.

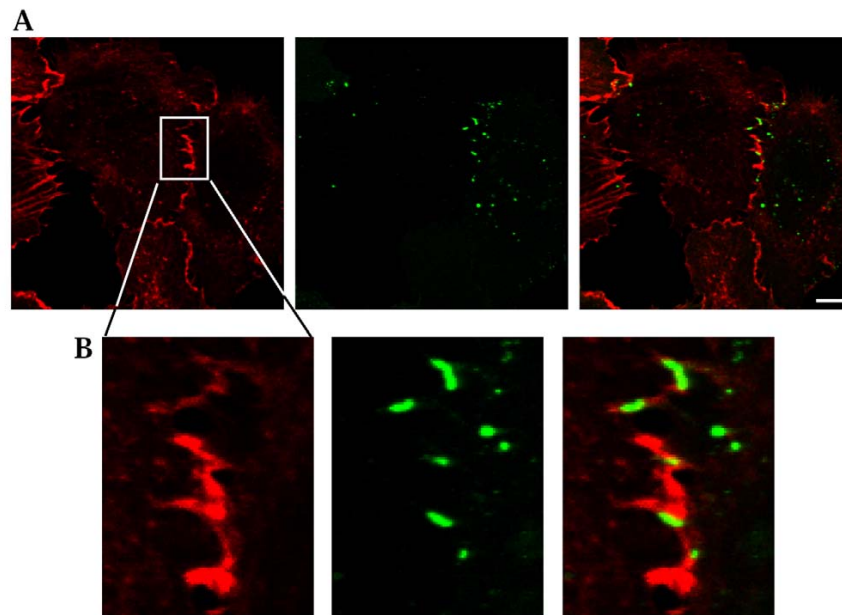


Abb. 3.31. Drebrin-RFP und Connexin43-GFP lokalisieren nebeneinander in Zell-Kontaktstellen

HUVEC wurden mit Drebrin-RFP (rot) und Connexin43-GFP (grün) transfiziert und für 1h auf mit Kollagen beschichteten *coverslips* kultiviert; die gesamte Expressionsdauer betrug 17h. Die Immunfluoreszenzaufnahme zeigt eine Zusammenlagerung der markierten Proteine in Zellkontaktstellen (A). Der Bildausschnitt (B) zeigt, dass keine vollständige Überlagerung stattfindet; weißer Balken: 10 µm

Für die Untersuchung einer möglichen Interaktion in HUVEC wurden die Zellen mit Connexin43-GFP und Drebrin-RFP kotransfiziert und für eine Stunde erneut auf Kollagen ausgesät und kultiviert. Wie bereits in Punkt 3.7.2. erläutert wurde, ist die Lokalisation von Drebrin an Zellkontaktstellen vor allem ein Ereignis der frühen Adhäsion. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Immunfluoreszenzsignale mit Hilfe des Konfokalmikroskops ausgewertet. Obwohl eine deutliche Anreicherung beider Proteine in neu ausgebildeten Zell-Kontaktstellen erkennbar ist (s. Abb. 3.31. A), findet keine direkte Überlagerung statt (s. vergrößerten Bildausschnitt (B) in Abb. 3.31.).

Um festzustellen, ob eine Verminderung der intrazellulären Drebrinkonzentration auch einen Einfluss auf die Lokalisierung von Connexin43 zur Folge hat, wurden HUVEC wie bereits unter Punkt 3.7.3. beschrieben mit Drebrin-spezifischer, vektorkodierter shRNA transfiziert und nach 4 Tagen erneut bis zur Ausbildung vollständiger Zellkontakte (ca. 24 h) kultiviert. Anschließend erfolgte die Analyse der subzellulären Distribution von Drebrin und Connexin43 mittels Immunfluoreszenzfärbung.

Abb. 3.32. zeigt, dass der Drebrin *knockdown* keinen Einfluss auf die Anwesenheit von Connexin43 in der Zellkontaktfläche, und damit vermutlich auch nicht auf die Ausbildung von *gap junctions* ausübt. Sowohl Drebrin-defiziente Zellen, als auch HUVEC, die mit der Kontroll-shRNA transfiziert worden waren, weisen eine Anreicherung von Connexin43-Aggregaten in den Zellkontaktebenen auf, was vor allem in den vergrößerten Bildausschnitten in Abb. 3.32. zu erkennen ist. Somit ist Drebrin vermutlich nicht am Aufbau oder der Aufrechterhaltung von *gap junctions* beteiligt. Über die Funktionalität der nach dem Drebrin *knockdown* gebildeten Kanäle kann auf diesem Wege allerdings keine Aussage getroffen werden.

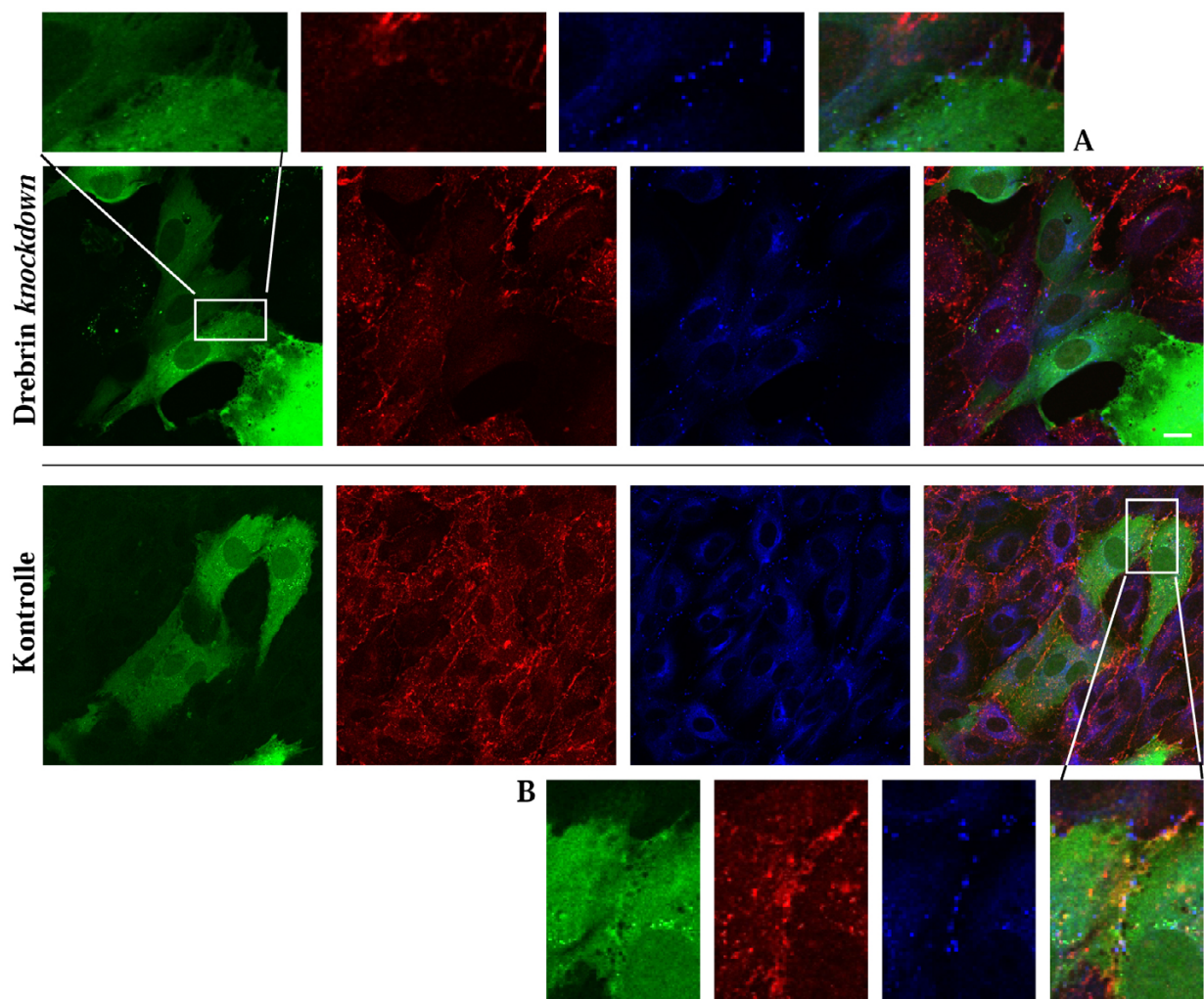


Abb.3.32. Drebrin *knockdown* hat keinen Einfluss auf Lokalisierung von Connexin43 in HUVEC

HUVEC wurden 4 Tage vor dem Versuch mit Drebrin-spezifischer vektorkodierter shRNA (A), bzw. einer Kontroll-shRNA (B), transfiziert. Anschließend wurden die Zellen auf Kollagen ausgesät und nach 24 h fixiert, um die Ausbildung eines Monolayers zu ermöglichen. Anschließend erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung von Drebrin (rot), um die Effizienz des *knockdown* nachzuweisen, sowie von Connexin43 (blau). shRNA-transfizierte Zellen exprimieren zusätzlich GFP und erscheinen daher grün. Sowohl nach der Kontroll-shRNA-Behandlung (B) als auch zwischen Drebrin *knockdown* Zellen (A) lokalisiert Connexin43 in den Kontaktflächen zwischen benachbarten HUVEC; weißer Balken: 10 µm

3.8. Die Rolle von Drebrin in der Angiogenese

Die Angiogenese beschreibt das Wachstum neuer Blutgefäße aus dem bereits bestehenden Gefäßsystem und wird sowohl mit physiologischen Prozessen wie der Wundheilung, dem endometrialen Zyklus und der Embryonalentwicklung, als auch mit pathologischen Prozessen (z. B. Tumorwachstum, diabetischer Retinopathie, rheumatoider Arthritis) in Verbindung gebracht (Folkman, 2007; Hillen und Griffioen, 2007) (s. Punkt 1.1.2.).

Da Drebrin offensichtlich einen Einfluss auf die vollständige Ausbildung von *adherens junctions* ausübt (s. Punkt 3.7.3.), sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden, ob sich diese Eigenschaft Drebrins auch in angiogenetischen Prozessen, z. B. der Wundheilung, bemerkbar macht.

3.8.1. Drebrin wird nach Verletzung des Endothels an die Zellperipherie rekrutiert

Wie bereits in der vorangegangenen Arbeit (A. E. Osiak) gezeigt werden konnte, erfolgt die Bildung Drebrin-reicher Strukturen in HUVEC vor allem auf ein Verwundungsereignis der Endothelschicht hin. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen Strukturen hauptsächlich um Aktin *waves* handelt (s. Abb. 3.33.). HUVEC wurden zu diesem Zweck im sogenannten *scratch wound assay* bis zum Eintreten der Konfluenz auf Kollagen kultiviert und anschließend verletzt (s. Punkt 2.3.7.). Nach ca. 40 min setzt vor allem in Endothelzellen, die sich in direkter Nachbarschaft mit der Wundstelle befinden, die Bildung von

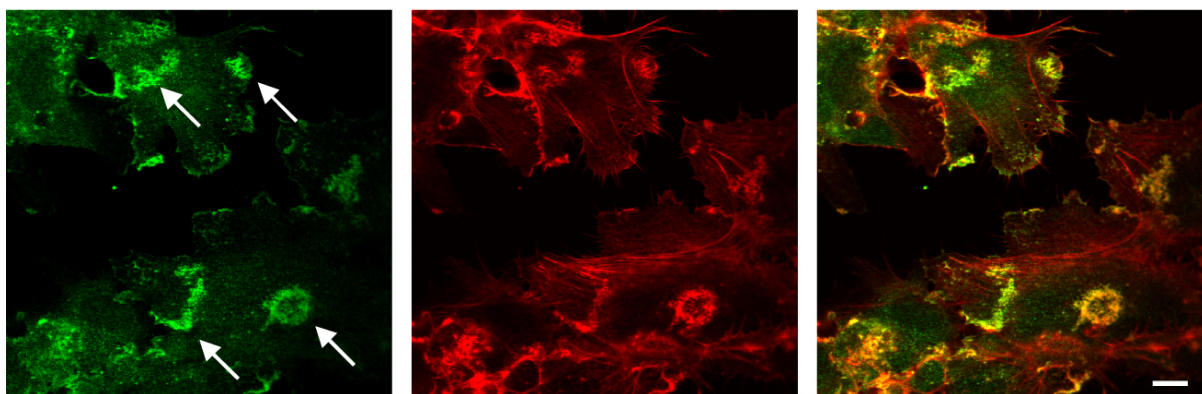


Abb. 3.33. Die Verletzung des HUVEC *monolayers* fördert die Bildung von Aktin *waves*

Immunfluoreszenzaufnahme von Aktin (rot) und Drebrin (grün) in HUVEC 40 min nach Verletzung des *monolayer* (Überlagerung gelb). Es findet eine erhöhte Bildung von Aktin *waves* statt, welche mit Drebrin angereichert sind (Pfeile); weißer Balken: 10 μ m

Aktin *waves* ein. Wie aus Punkt 3.7.1. bereits hervorgeht, sind Aktin *waves* in HUVEC in der Lage, einen “Drebrin-*shift*“ in neu gebildete Zellkontakte zu bewirken. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass Drebrin bei der Lokalisierung von VE-Cadherin an die Zellkontaktebene eine Rolle spielt (s. Punkt 3.7.3.). Basierend auf diesen Beobachtungen sollte im Folgenden festgestellt werden, ob Drebrin an Wundheilungs- und angiogenetischen Prozessen beteiligt ist.

3.8.2. Ein zu hoher intrazelluläre Drebringehtalt beeinträchtigt die Wundheilung

Die Rolle Drebrins in der Wundheilung sollte durch sogenannte *scratch wound assays*, also Wundheilungs-Ansätze, untersucht werden. HUVEC wurden zu diesem Zweck auf mit Kollagen beschichtete *coverslips* ausgesät, bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend mit einer Pipettenspitze (s. Punkt 2.3.7.) verletzt. Die Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung der Zellen erfolgte nach festgelegten Zeitpunkten (0, 150 und 255 min). Mit Hilfe des Konfokalmikroskops (63x Objektiv) wurden Aufnahmen der Wundstellen über den gesamten Zeitraum gemacht. Gleich große Ausschnitte aus den erhaltenen Bildern wurden mit dem Programm *imageJ* in das 8-bit Format adjustiert und invertiert (s. Abb. 3.34.), damit die verbleibende Verwundungsstelle analysiert werden konnte. Die erhaltenen Werte beziehen sich auf den Zeitpunkt 0 (entspricht 100% der offenen Fläche).

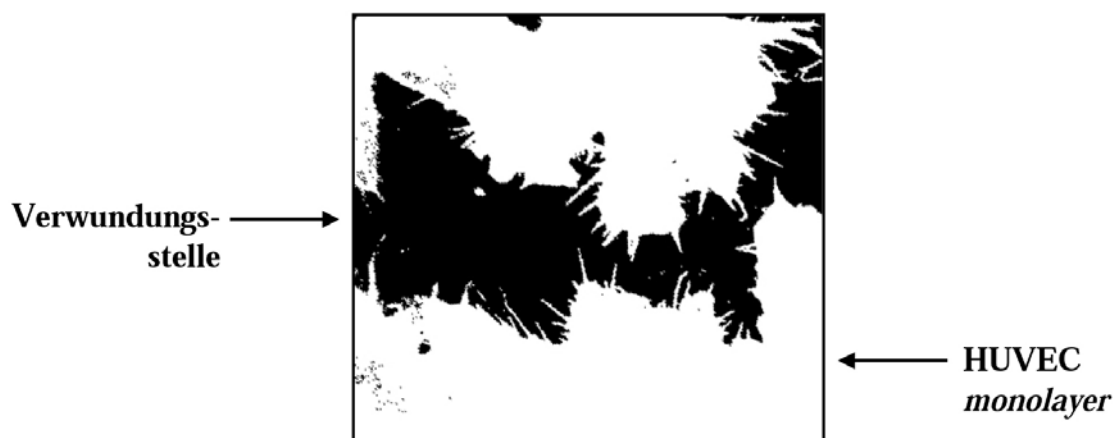


Abb. 3.34. Schema zur Auswertung des *scratch wound assay*

Beispiel zur Auswertung des durch die Verletzung des Endothels entstandenen Areal; die invertierte Verletzungsfläche wurde durch das Programm *imageJ* erfasst und die erhaltenen Werte anschließend graphisch umgesetzt.

Die transfizierten Zellen wurden erneut anhand ihrer Fluoreszenz-Intensität in zwei Subpopulationen unterteilt. Wie bereits in Punkt 3.4.1. beschrieben, wurden sie nach einer Expressionsdauer von 16 h mit Hilfe der FACS-Analyse sortiert, so dass moderat Drebrin exprimierende Zellen mit stark Drebrin exprimierenden Zellen verglichen werden konnten. Zellen beider Gruppen wurden auf mit Kollagen beschichteten *coverslips* bis zum Eintreten der Konfluenz kultiviert. Anschließend erfolgte die Verwundung der entstandenen *monolayer* (s. Punkt 2.3.7.). Als Kontrolle dienten HUVEC, die mit dem GFP-Leervektor transfiziert und zum Zweck der optimierten Vergleichbarkeit ebenfalls in zwei Subpopulationen mit unterschiedlicher Fluoreszenz-Intensität unterteilt wurden.

In allen Fällen kam es zum Wundschluss, allerdings mit verschiedenen Geschwindigkeiten. Da die Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen nach 255 min am größten waren, wurden die Zellen zu diesem Zeitpunkt fixiert und der Fortschritt der Wundheilung nach der oben genannten Vorgehensweise ausgewertet (s. Abb. 3.35.). Mit einer verbleibenden offenen Fläche von $13,0 \% \pm 13,1 \%$ unterscheiden sich moderat Drebrin exprimierende HUVEC nur geringfügig von dem entsprechenden Kontrollansatz ($19,7 \% \pm 11,1 \%$). Stark Drebrin überexprimierende Zellen weisen dagegen eine signifikante Verzögerung ihrer Wundschlussfähigkeit auf ($36,9 \% \pm 7,4 \%$), im Vergleich zu der ihnen entsprechenden Kontrolle ($10,3 \% \pm 10,9 \%$).

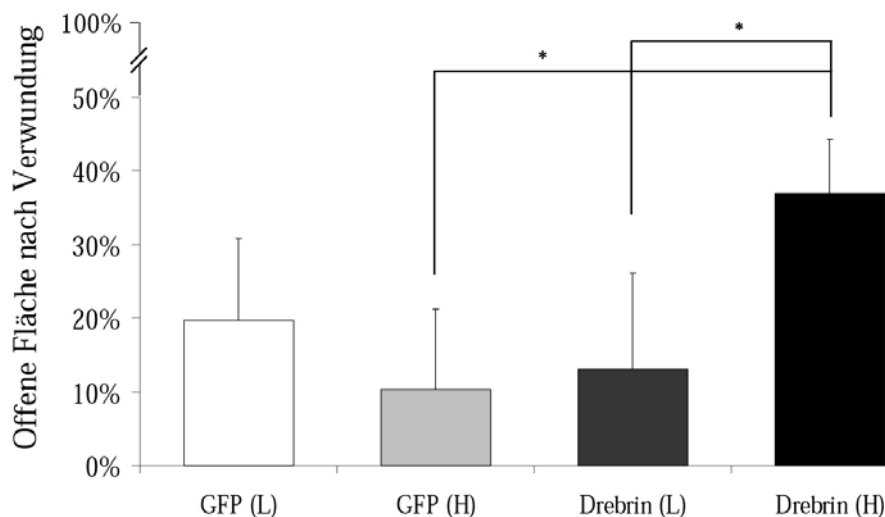


Abb. 3.35. Scratch wound assay nach Überexpression von Drebrin-GFP, bzw. dem GFP-Leervektor

16 Stunden nach der Transfektion von HUVEC mit Drebrin-GFP-N1 erfolgte die Sortierung der Zellen via FACS-Analyse. Die Zellen wurden anschließend auf Kollagen ausgesät und nach Ausbildung eines vollständigen *monolayers* verletzt. 255 Minuten nach der Verletzung erfolgte die Fixierung und Auswertung der Präparate (Details s. Text). * $p \leq 0,05$

Der direkte Vergleich zwischen den beiden Subpopulationen Drebrin überexprimierender Zellen zeigt einen signifikanten Unterschied in ihrer Wundschlussfähigkeit. Vermutlich wird die beobachtete Verzögerung somit durch die zu hohe Drebrin-Konzentration innerhalb der Zelle verursacht. Dieses Ergebnis könnte in direkter Korrelation mit der festgestellten Modifizierung der peripheren Zellmorphologie durch ein stark erhöhtes Drebrinlevel in HUVEC (s. Punkt 3.4.) stehen.

3.8.3. Die Wundheilung durch Endothelzellen ist auch trotz Drebrin *knockdown* möglich

Für die Untersuchung des Einflusses von Drebrin auf die Wundschlussfähigkeit von HUVEC sollte neben dem Effekt der erhöhten intrazellulären Konzentration (s. Punkt 3.8.2.) auch die Auswirkung des *knockdown* von Drebrin überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden HUVEC mit Drebrin-spezifischer siRNA, bzw. einer unspezifischen Kontroll-siRNA, transfiziert und nach vier Tagen erneut bis zur vollständigen Konfluenz auf mit Kollagen beschichteten *coverslips* kultiviert. Der *scratch wound assay* wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (s. Punkt 2.3.7.). Abb. 3.36. zeigt die Evaluierung des Experiments. Die verbleibende offene Verwundungsfläche zwischen den siRNA-behandelten Zellen weicht weder nach 150 min ($35,1 \% \pm 16,2 \%$) noch nach 255 min ($20,9 \% \pm 18,8 \%$) signifikant von der verbleibenden Fläche zwischen Kontroll-siRNA behandelten Zellen ab ($45,8 \% \pm 24,0 \%$ nach 150 min; bzw. $19,7 \% \pm 11,1 \%$ nach 255 min).

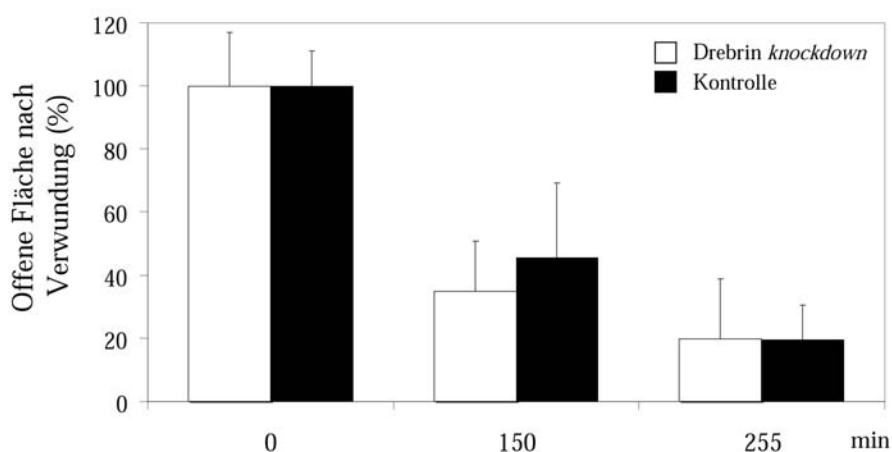


Abb. 3.36. *Scratch wound assay* nach Drebrin *knockdown*

Der *knockdown* von Drebrin in HUVEC erfolgte 4 Tage vor Versuchsbeginn mit Drebrin-spezifischer siRNA. Als Kontrolle wurde nicht-spezifische siRNA eingesetzt. Die Zellen wurden anschließend neu auf Kollagen ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Weder 150 min noch 255 min nach Verletzung des Endothels konnte eine signifikante Beeinträchtigung der Wundheilung beobachtet werden.

Durch die Untersuchungen zur Wundschlussfähigkeit von HUVEC nach Überexpression, bzw. dem *knockdown* von Drebrin konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Drebrin in HUVEC nicht unbedingt nötig ist, um einen funktionellen Wundschluss zu gewährleisten. Eine unphysiologisch hohe intrazelluläre Konzentration von Drebrin dagegen stört diese Fähigkeit der Endothelzellen, was vermutlich auf eine Störung der Retraktionsfähigkeit (s. Punkt 3.4.3.), bedingt durch ein Übermaß an intrazellulärem Drebrin, bedingt wird.

3.8.4. Tube formation auf Matrigel bei Drebrin knockdown

Die Angiogenese bezieht sich nicht nur auf Wundschlussprozesse, sondern vor allem auf die Ausbildung neuer Blutgefäße. Ein verbreitetes System für die Untersuchung dieser Funktion von Endothelzellen ist die Kultivierung der Zellen auf Matrigel. Matrigel ist eine gelatinöse Proteinmischung, die von murinen Tumorzellen sekretiert wird. Da dieses Material der extrazellulären Matrix vieler Gewebetypen in Säugetieren ähnelt, kann es als Substrat für zellbiologische Untersuchungen eingesetzt werden. Endothelzellen, die auf Matrigel ausgesät werden, bilden eine netzwerkartige Struktur aus, die stark an das mikrovaskuläre Kapillarsystem erinnert. Die Verwendung von Matrigel als Substrat für Endothelzellen erlaubt damit die Beobachtung der Prozesse, die an der Ausbildung dieser Strukturen beteiligt sind.

Um festzustellen, ob Drebrin eine Rolle bei der Ausbildung mikrovaskulärer Strukturen spielt, wurden HUVEC mit Drebrin-spezifischer (bzw. Kontroll-) siRNA behandelt und auf Matrigel ausgesät. Der zeitliche Verlauf der Entwicklung der Vernetzungsstrukturen (*tubes*) wurde stündlich mit Hilfe des Mikroskops dokumentiert und ist in Abb. 3.37. für die Dauer von 2-6 h exemplarisch gezeigt. Die so gewonnenen Aufnahmen wurden mit Hilfe der Software „*Angiogenesis Assay Evaluation: tube Formation, native*“ der Firma S.Co life sciences ausgewertet (s. Abb. 3.38.). Die Klassifizierung der aufgenommenen Strukturen anhand dieses Programms beruht auf einer kontextbasierter Signalauswertung. Entsprechend der in diesem Versuch benutzten Einstellungen (Vergrößerung, Auflösungsvermögen der Kamera) wurden Verbindungen bis zu einer maximalen Breite von 60 Pixel als *tubes* (Abb. 3.38., rot) eingeordnet (Abb. 3.38. gelb). Die somit ermittelten Netzwerkstrukturen wurden mit Hilfe eines mathematischen Algorithmus erfasst und interpretiert.

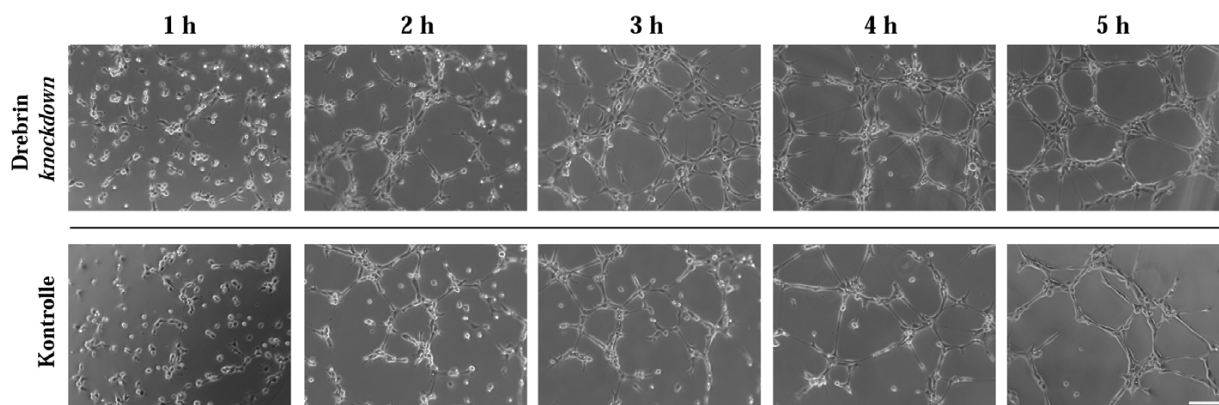


Abb. 3.37. Zeitlicher Verlauf der *tube formation* durch HUVEC nach Drebrin *knockdown*

HUVEC wurden 4 Tage nach dem Drebrin-*knockdown* auf Matrigel ausgesät und der Verlauf der *tube formation* nach 2-6 h mikroskopisch dokumentiert. Oben: Transfektion mit Drebrin siRNA; Unten: Transfektion mit unspezifischer Kontroll-siRNA; weißer Balken: 50 μm

Die Knotenpunkte zwischen den gebildeten *tube* Strukturen sind als dünne blaue Linien in Abb. 3.38. dargestellt. Die Quantifizierung der gebildeten Strukturen (s. Abb. 3.40.) ergab, dass über einen Zeitraum von 2 bis 5 Stunden die Anzahl der Verbindungen pro Knotenpunkt in beiden Ansätzen konstant bei durchschnittlich 3 liegt. Das heißt die jeweiligen Netzstrukturen liegen schon nach relativ kurzer Zeit in ihrer finalen Grundstruktur vor (Abb. 3.39. C). Variationen zeigten sich bzgl. der Anzahl der Knotenpunkte. Diese nimmt in beiden Fällen im angegebenen Zeitraum konstant ab, d. h. es erfolgt eine Verdichtung bereits gebildeter Netzstrukturen. Allerdings weisen Drebrin *knockdown* Zellen und die Kontrollzellen untereinander Abweichungen auf. So liegt die Anzahl der Knotenpunkte nach 5 Stunden im *knockdown* Ansatz mit $25,3 \pm 4,1$ gegenüber $16,5 \pm 3,1$ um ca. 35,2 % höher als im Kontrollansatz (Abb. 3.39. A). Auch die Länge der gebildeten *tubes* wird durch den Drebrin *knockdown* modifiziert. Die *tubes* sind mit $10491,8 \pm 1022,4$ Pixeln nach 5 Stunden im Durchschnitt ca. 28,4 % länger als die mit der Kontroll-siRNA transfizierten Zellen mit $7505,6 \pm 1252,2$ (Abb. 3.39. B).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Drebrin *knockdown* im Vergleich zum Kontrollansatz zu einer größeren Komplexität der gebildeten HUVEC-Netzwerkstrukturen führt. Dieser Effekt könnte eventuell auf den Einfluss Drebrins auf die Ausbildung intakter *adherens junctions* zurückzuführen sein. Welcher Art diese Funktion genau ist, gilt es in zukünftigen Arbeiten festzustellen.

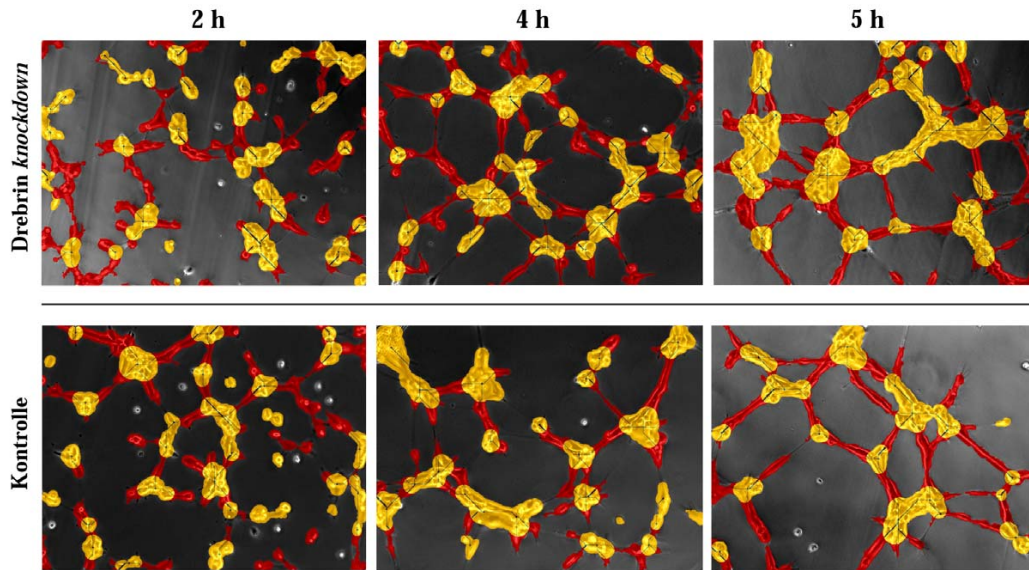


Abb. 3.38. Visualisierung des S.Co Auswertungsverfahrens: HUVEC auf Matrigel nach 2, 4 und 5 Stunden. Die Klassifizierung der gebildeten Strukturen erfolgte entsprechend des benutzten Objektivs und des Auflösungsvermögens der Kamera in *tubes* (rot) und nicht voll ausgebildete *tube*-Strukturen (gelb). Durch einen mathematischen Algorithmus wurden die die Verläufe der Zellkomplexe interpretiert und dabei z. B. die Knotenpunkte der entstandenen Netzwerke erfasst (blaue Linien).

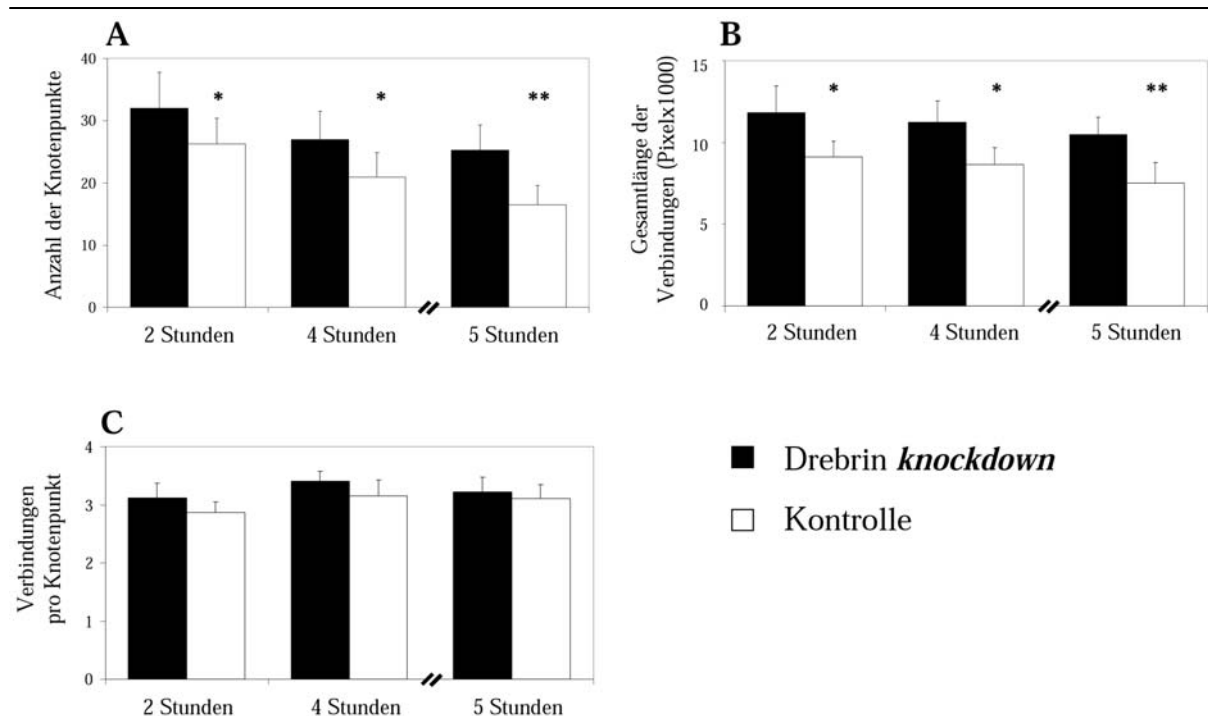


Abb. 3.39. Evaluierung des Matrigel Angiogenese assays

HUVEC wurden mit Drebrin-spezifischer, bzw. Kontroll-siRNA, behandelt und anschließend auf Matrigel ausgesät. Die Quantifizierung der gebildeten Vernetzungsstrukturen (*tubes*) über einen Zeitraum von 2-5 h erfolgte mit Hilfe der „*tube formation*“ Software der Firma S.Co LifeSciences; (A) Die Anzahl der Knotenpunkte nimmt in beiden Ansätzen konstant ab, Drebrin-defiziente Zellen weisen über den gesamten Zeitverlauf allerdings signifikant mehr Knotenpunkte auf; (B) Die durchschnittliche Gesamtlänge der *tubes* (in Pixeln) bleibt pro Ansatz konstant, fällt aber im Kontrollansatz zu allen Zeitpunkten geringer aus; (C) Die Anzahl der Verbindungen pro Knotenpunkt wird durch den Drebrin *knockdown* nicht signifikant beeinflusst; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

4. DISKUSSION

4.1. Drebrin und Aktin *waves* beeinflussen die Zellphysiologie

Das Aktin-Bindeprotein Drebrin tritt in humanen Endothelzellen sowohl in Podosomen als auch in Aktin *waves* in Erscheinung. Sowohl Podosomen als auch Aktin *waves* sind Aktinreiche Strukturen, die sich an der ventralen Seite der Zelle befinden. Zu Beginn dieser Arbeit waren die Unterschiede aufgrund der ähnlichen Zusammensetzung und teilweise gemeinsamen Lokalisation in der Zellperipherie noch nicht vollständig geklärt. Podosomen sind punktförmige Strukturen, die sich zu rosettenförmigen Überstrukturen zusammenlagern können. Auch Aktin *waves* setzen sich aus punktförmigen Untereinheiten zusammen und bilden Ringstrukturen, die allerdings in ihrem Umfang den der Podosomen-Rosetten um das 5- bis 8-fache übersteigen. Die Anwesenheit von Drebrin ist sowohl im Fall der Podosomen als auch der Aktin *waves* essentiell für deren Aufbau bzw. ihre Aufrechterhaltung (s. Punkt 3.2., bzw. Dissertation Osiak). Während bereits festgestellt wurde, dass Podosomen in die Matrix-Adhäsion bzw. die Matrix-Degradation involviert sind (Osiak *et al.* 2005), stellte sich die Frage, welche Funktion Aktin *waves* übernehmen. Da sie, im Gegensatz zu Podosomen, auch im zentralen Bereich der Zelle vorkommen, wo sie sich wellenförmig in Richtung der Zellperipherie bewegen, besitzen sie eine weitaus größere räumliche Verteilung und Dynamik innerhalb der Zelle (s. Punkte 1.6. und 3.1.). Zeitgleich mit der Lokalisation an die Zellperipherie kommt es häufig zu der Ausbildung von Protrusionen an den entsprechenden Membranbereichen (s. Abb. 3.24. A) (für die Diskussion weiterer Unterschieden zwischen Podosomen und Aktin *waves* siehe Punkt 4.2.).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Drebrin und Aktin *waves* auf die Morphologie, Migration, Adhäsion und Zellkontakt-Ausbildung von humanen Endothelzellen untersucht (Übersicht in Abb. 4.1.). Es konnte festgestellt werden, dass die Protrusions-fördernde Wirkung von Aktin *waves* keinen Einfluss auf die Netto-Ausbreitung der Zelle ausübt (s. Punkt 3.3.), sondern sich vor allem die Ausbildung von Zell-Zellkontakten bezieht (s. Punkt 3.7.), was sich auch auf angiogenetische Prozesse auswirkt (s. Punkt 3.8. und 4.8.).

Die Bildung spezialisierter Protrusionen ist an die Umverteilung bzw. Rekrutierung von Drebrin in diese neuen Kontaktstellen geknüpft. Die Funktion, die Drebrin an dieser Stelle übernimmt, konnte mit einem stabilisierenden Effekt in Bezug auf die Lokalisation von VE-Cadherin determiniert werden (s. Punkt 3.7.3., 4.3.).

Aktin *waves* übernehmen damit im Vergleich mit Podosomen einen gänzlich verschiedenen Funktionsbereich in Endothelzellen. Da Drebrin (zusammen mit andere Komponenten) in diesem Zelltyp aber in beiden Strukturen vorkommt, ist anzunehmen, dass hier eine Verbindung verschiedener zellphysiologischer Funktionen ermöglicht wird.

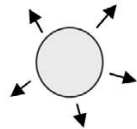
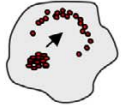


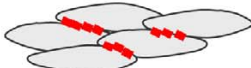
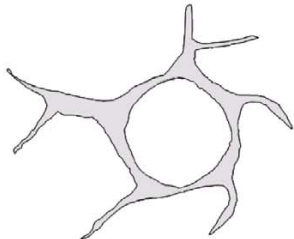
	<u>Zellphysiologischer Prozess</u>	<u>Beteiligung von Drebrin</u>
	Zellausbreitung (<i>spreading</i>)	—
	Bildung von Aktin <i>waves</i>	+
	Zellmorphologie	+
	Migration	(+)
	Bildung von Zellkontakten	+
	Bildung von Netzwerkstrukturen auf Matrigel™	+

Abb. 4.1. Übersicht zu den zellphysiologischen Vorgängen in HUVEC, an denen Drebrin beteiligt ist
 Drebrin ist notwendig für die Ausbildung von Aktin *waves* und übt einen starken Einfluss auf die Ausprägung der Morphologie aus, was sich auf die Migrations-Fähigkeit der Zellen überträgt. Es trägt vermutlich zur vollständigen Ausbildung von *adherens junctions* bei und fördert so die kontrollierte Ausbildung von Netzwerkstrukturen auf Matrigel™. Die Fähigkeit von HUVEC zur Ausbreitung wird durch Drebrin nicht beeinflusst.

4.2. Podosomen und Aktin waves in humanen Endothelzellen

Aufgrund diverser Übereinstimmungen zwischen Aktin waves und Podosomen stellt sich die Frage, ob es einen physiologischen Zusammenhang zwischen diesen beiden Strukturen gibt. So könnten Aktin waves theoretisch betrachtet dynamische Vorläufer-Strukturen für Podosomen darstellen. Gemeinsamkeiten in Aufbau und Struktur sprechen für eine gemeinsame zellphysiologische Grundlage. Betreffend ihrer Zusammensetzung konnten nicht nur Aktin und Drebrin, sondern zum Beispiel auch α -Actinin (s. Punkt 3.6) und Vinkulin (teilweise in dieser Arbeit) als gemeinsame Komponenten nachgewiesen werden. Zudem sind beide Strukturen hochdynamisch, wobei sich die Dynamik im Fall der Podosomen nicht auf die räumliche Verteilung bezieht, wie dies bei Aktin waves der Fall ist (s. Punkt 3.1.), sondern vor allem für Entstehungs-, Spaltungs- und Verschmelzungs-Vorgänge beschrieben ist (Evans *et al.*, 2003; Kopp *et al.*, 2006). Podosomen sind in HUVEC vornehmlich in der Zellperipherie angesiedelt. Trotz der unterschiedlichen räumlichen Lokalisation gibt es auch bezüglich ihrer subzellulären Verteilung Übereinstimmungen: sowohl Podosomen als auch Aktin waves befinden sich auf der ventralen Zellseite. Podosomen können dadurch die ihnen nachgewiesene Funktion des Matrix-Abbaus erfüllen. Ob Aktin waves trotz ihrer hohen räumlichen Dynamik ebenfalls in der Lage sind, das Substrat zu degradieren, gilt es noch zu klären.

Die Struktur von Podosomen und Aktin waves ist mit ihrer zeitweise ringförmigen Anordnung ebenfalls vergleichbar. Wie bereits unter Punkt 3.1. beschrieben gibt es allerdings Unterschiede bezüglich ihrer Größe und Anordnung. Während Aktin waves im Rahmen ihrer Entstehung immer ein ringförmiges Stadium durchlaufen, ist die Bildung von Überstrukturen aus einzelnen Podosomen ein Effekt, der sich – mit Ausnahmen (Badowski *et al.*, 2008) – erst nach ihrer Entstehung einstellt. Auch wird dies nicht in allen Podosomen-bildenden Zelltypen beobachtet. Die Zusammenlagerung größerer, ringförmiger Überstrukturen aus einzelnen Podosomen bzw. Invadosomen wurde zum Beispiel für Osteoklasten (Destaing *et al.*, 2003) und RSV (Rous Sarcoma Virus)-transfizierten BHK (*baby hamster kidney*)-Zellen gezeigt (Badowski *et al.*, 2008). In diesen Zellen sind Umfang und Dynamik der ringförmigen Überstrukturen mit den in HUVEC beobachteten Aktin waves vergleichbar. Im Fall der BHK Zellen konnte gezeigt werden, dass die Anordnung der Invadosomen (Erläuterung unter 1.3.3.) innerhalb ihrer Überstruktur über ihre Zusammensetzung und Stabilität bestimmt. Ebenfalls wurde gezeigt, dass die Ausweitung der Ringstruktur von der Phosphorylierung von Paxillin abhängig ist, da sie den Abbau der Invadosomen und damit die Dynamik der Überstruktur erst ermöglicht. Auch in primären bovinen arteriellen Endothelzellen kommen rosettenförmig zusammengelagerte Podosomen vor, die in ihrem Erscheinungsbild an Aktin waves erinnern.

Allerdings ist dafür die Stimulierung der Zellen mit TGF β (*transforming growth factor* β) nötig (Varon *et al.*, 2006). Zudem ist zu beachten, dass Podosomen nicht die charakteristische Dynamik besitzen, mit der sich die *waves* in HUVEC ausbreiten. Es wäre in den folgenden Arbeiten erstrebenswert, durch die Behandlung von HUVEC mit TGF β herauszufinden, ob die Dynamik der Aktin *waves* durch diesen Faktor beeinträchtigt werden kann, bzw. ob sich die Zusammenlagerung einzelner Podosomen zu Überstrukturen forcieren lässt.

Ein entscheidender Unterschied zu Aktin *waves* ist auch die Tatsache, dass Podosomen nicht mit der Zellperipherie verschmelzen, sondern stationär in der Zellperipherie vorliegen. Aktin *waves* dagegen verschmelzen mit der Zellperipherie, was zu einer lokalen Anreicherung von *wave* Komponenten führt, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Die hohe Aktin-Dynamik, die den Aktin *waves* in HUVEC zugrunde liegt, findet sich auch in einem anderen Modell-Organismus: in *Dictyostelium discoideum*, einem eukaryotischen, hoch motilen, einzelligem Organismus, kommen vergleichbare Strukturen vor, die in diesem Fall als *traveling waves* bezeichnet werden (Bretschneider *et al.*, 2004). Untersuchungen mittels TIRF (*total internal reflection fluorescence*) Mikroskopie zeigten, dass die Ausbildung dieser *waves* an die Rekrutierung des Arp2/3-Komplexes, und die damit verknüpfte kontinuierliche Initiation der Aktin-Polymerisierung gebunden ist. Es besteht die Annahme, dass diese dynamischen Komplexe den Ursprung für die Ausbildung spezialisierter Aktin-Strukturen wie Lamellipodien oder *phagocytotic cups* bilden. Es würde somit ein aktiviertes Aktin-System bestehen, welches der Zelle ermöglicht, schnell auf lokale Stimuli wie zum Beispiel chemotaktische Reize zu reagieren. Durch Gerisch *et al.*, konnte 2004 gezeigt werden, dass die Aktin-Dynamik in *Dictyostelium* von Membran-Protrusionen entkoppelt ist. Die Untersuchungen der *de novo* Generierung von Lamellipodien nach der Zerstörung des Aktin-Systems durch die Behandlung mit Latrunculin A zeigte unter anderem, dass sich die *traveling waves* auf der planaren ventralen Zellseite unabhängig von der an Membran-Protrusionen lokalisierten Aktinnukleations-Maschinerie ausbreiten. Trotzdem können die *waves* bei Kontakt mit der Zellgrenze die Bildung von Lamellipodien verursachen. Dieser Effekt der Protrusionsbildung nach Kontakt von Aktin *waves* mit der Zellmembran wurde in der vorliegenden Arbeit auch in humanen Endothelzellen beobachtet. Offensichtlich handelt es sich hier um ein Phänomen, das in verschiedenen Zelltypen (zum Beispiel auch in Fibroblasten, Neutrophilen und Melanom-Zellen) vorkommt (s. Vicker, 2002; Weiner, 2007) und der erhöhten Dynamik des Aktin-Netzwerks und seiner Funktionen dient. Diese Dynamik könnte für die Neuausbildung von

Zell-Zellkontakten über die Generierung von Protrusionsstrukturen in HUVEC genutzt werden.

4.3. Drebrin stabilisiert VE-Cadherin an Zell-Zellkontaktstellen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Drebrin in HUVEC vermutlich in die Ausbildung von Zellprotrusionen und Zell-Zellkontakten (*adherens junctions*) involviert ist. Die Dynamik der Aktin *waves* bewirkt eine Anreicherung von Drebrin in den Zellkontaktstellen (s. Punkt 3.7.1). Das Protein übt zudem einen stabilisierenden Einfluss auf die Lokalisierung von VE-Cadherin an Zell-Zellkontaktstellen aus, da der *knockdown* von Drebrin in HUVEC einen deutlichen Verlust von VE-Cadherin an Zell-Zellkontaktstellen zwischen den betroffenen Zellen zur Folge hatte. Dieser Verlust beruht auf einer Verminderung des intrazellulären VE-Cadherin-Levels, wie durch die Western Blot Analyse von Drebrin *knockdown* Zellslysaten gezeigt werden konnte (s. Punkt 3.7.3.). Dieser Effekt des Drebrin *knockdowns* trat bereits einen Tag nach der Transfektion der Zellen mit der Drebrin-spezifischen siRNA ein, an dem das Drebrin-Level noch ca. 50 % betrug. Dies spricht für eine hohe Dynamik und Sensitivität des VE-Cadherin-Levels im Bezug auf Drebrin.

Die Regulation des VE-Cadherin-Levels ist von entscheidender Bedeutung für die Funktion des Endothels. So steht der Verlust von VE-Cadherin im endothelialen *monolayer* im Zusammenhang mit ernsthaften pathophysiologischen Vorgängen wie Entzündungsreaktionen innerhalb der Intima (Bobryshev *et al.*, 1999). Die Mechanismen zur VE-Cadherin-Regulation und -Präsentation auf der Zelloberfläche sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wurde allerdings beobachtet, dass VE-Cadherin über endozytotische Prozesse von der Zellmembran entfernt und durch *recycling* wieder dorthin rekrutiert, oder alternativ abgebaut werden kann (Le *et al.*, 1999 und 2002, Xiao *et al.*, 2003).

In weiteren Arbeiten gilt es zu klären, worauf die durch den Drebrin *knockdown* induzierte Reduktion des VE-Cadherin-Levels beruht. Wie aus der Western Blot Analyse hervorgeht, wird der VE-Cadherin-Verlust in der Zellkontakt-Ebene durch einen generellen intrazellulären Mangel des Proteins hervorgerufen. Eine Blockierung des Proteins, bzw. ein Abfangen innerhalb des Zytoplasmas ist damit als primäre Ursache ausgeschlossen. Durch den Einsatz von spezifischen Inhibitoren soll in zukünftigen Arbeiten geklärt werden, ob VE-Cadherin nach dem Drebrin *knockdown* zum Beispiel über das Proteasom abgebaut wird. Drebrin würde dadurch nicht nur eine stabilisierende Rolle von VE-Cadherin an Zell-Zellkontakten zukommen, sondern eine allgemeine anti-degradative Wirkung auf das Protein in HUVEC.

Durch Xiao *et al.* konnte 2003 gezeigt werden, dass dem endozytotischen Abbau von VE-Cadherin eine Spaltungsreaktion zwischen der Juxtamembran-Domäne (JMD), die für die Bindung von p120 verantwortlich ist, und der Catenin Binde-Domäne (CBD) innerhalb der cytoplasmatischen Region des Proteins vorangeht. Es wäre möglich, dass die direkte oder indirekte Interaktion zwischen Drebrin und VE-Cadherin eine Blockierung dieser Spaltungsstelle bewirkt, und der Abbau dadurch reguliert wird. Des Weiteren sollten die mRNA-Level von VE-Cadherin vor und nach dem Drebrin *knockdown* untersucht werden, um festzustellen, ob das beobachtete Phänomen auf dem Abbau des Proteins, oder einem allgemeinen Rückgang der Expression beruht.

Durch Interaktionsstudien konnte in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, dass Drebrin und VE-Cadherin weder in der endogenen Form, noch als GFP-Fusionsproteine aus HUVEC-Lysaten kopräzipitiert werden können (Daten nicht gezeigt), was darauf hinweist, dass eine gemeinsame Interaktion höchstens indirekt erfolgt.

Drebrin wird hauptsächlich in frühen Zell-Zellkontakten gefunden, die sich innerhalb einer Stunde nach dem Aussäen der Zellen auf Kollagen ergeben. Trotzdem hat es einen Einfluss auf den Aufbau von VE-Cadherin-Kontakten, die sich erst nach ungefähr 24 h in HUVEC *monolayer* Strukturen vollständig ausbilden (s. Punkt 3.7.2.). Es besteht somit eine kurzzeitige Kolo-kalisation von Drebrin und VE-Cadherin an Zellkontaktstellen (s. Abb.3.25). Dennoch ist die Anwesenheit Drebrins essentiell notwendig für die korrekte Lokalisierung von VE-Cadherin über den Zeitraum der eigenen Lokalisierung an Zell-Zell-Kontaktstellen hinaus. Diese Beobachtung bestärkt die Annahme, dass Drebrin für die Initiierung von Zell-Zellkontakten nötig ist, bzw. wegbereitend am weiteren Aufbau und eventuell der Regulation derselben beteiligt sein könnte.

Trotz des Drebrin *knockdowns* und der damit einhergehenden Verminderung von VE-Cadherin in den Zell-Zellkontaktstellen war es HUVEC möglich, sich zu den für Endothelzellen charakteristischen *monolayer* Strukturen zusammenzulagern. Das Phänomen der endothelialen Integrität trotz unvollständiger *adherens junctions* wurde auch durch Crosby *et al.* (2005) untersucht. Dort konnte gezeigt werden dass in Abwesenheit von VE-Cadherin sogar die *de novo* Synthese von Blutgefäßen möglich ist. Es wäre denkbar, dass das in Endothelzellen ebenfalls exprimierte N (*neural*)-Cadherin die Rolle von VE-Cadherin nach dessen Verschwinden aus den Zell-Kontaktstellen übernimmt. Es ist bekannt, dass N-Cadherin normalerweise nicht an *adherens junctions* zwischen Endothelzellen lokalisiert, sondern diffus ver-

teilt an der Zytoplasmamembran vorkommt (Navarro *et al.*, 1998). Es wurde der Frage nachgegangen, ob durch die Rekrutierung von N-Cadherin den Verlust von VE-Cadherin ausgleichen kann. Immunfluoreszenz-Aufnahmen von HUVEC nach dem Drebrin *knockdown* zeigten allerdings keine Rekrutierung von N-Cadherin an Zell-Zellkontakte (Daten nicht gezeigt). Daher wird angenommen, dass – auch wenn die VE-Cadherin-Konzentration in Zellkontakten durch den Verlust von Drebrin in der Zelle vermindert wird – andere Komponenten die Funktion des Cadherins und damit den Zusammenhalt des HUVEC *monolayer* teilweise übernehmen können. In der vorliegenden Arbeit wurden daher auch andere Zell-Zell-Adhäsionsproteine in HUVEC untersucht. Es sollte gezeigt werden, ob andere Bestandteile von *adherens junctions* ebenfalls vom Effekt des Drebrin *knockdowns* betroffen sind. Auch die Ausbildung gänzlich anderer Zellkontaktarten sollte untersucht werden. Allerdings wurde weder im Fall der *adherens junction* Komponenten β -Catenin und PECAM-1 eine Beeinträchtigung bezüglich der zellulären Protein-Konzentration und -Lokalisation festgestellt (s. Punkt 3.7.3. und 3.7.4.), noch wurde eine Veränderung der Lokalisierung des *gap junction* Bestandteils Connexin43 beobachtet (s. Punkt 3.7.5.).

In der vorliegenden Arbeit wurde zwar generell eine gemeinsame Anlagerung zwischen Drebrin und Connexin43 in Zell-Zellkontakten beobachtet, es wurde allerdings keine vollständige Kolokalisation festgestellt. Dieses Ergebnis, sowie die Tatsache, dass der Drebrin *knockdown* keine Beeinträchtigung der Connexin43-Lokalisation in HUVEC zur Folge hatte, steht im Widerspruch mit den Veröffentlichungen von Butkevich *et al.* (2004) und Majoul *et al.* (2007). Dort wurde eine regulative Interaktion zwischen Drebrin und *gap junctions* in Vero Zellen und Astrozyten beschrieben. Offensichtlich scheint dieser Mechanismus nicht auf humane Endothelzellen übertragbar zu sein, da die regulativen Eigenschaften Drebrins auf Zell-Zellkontakte zwischen verschiedenen Zelltypen unterschiedlich ausfallen.

β -Catenin bindet, wie bereits erwähnt, die Catenin Binde-Domäne (CBD) des cytoplasmatischen Bereichs von VE-Cadherin. Da die Lokalisation und das Proteinlevel von β -Catenin in keinem Zusammenhang mit dem zellulären Gehalt an Drebrin zu stehen scheinen, stellt sich die Frage, wie diese Komponente in Abwesenheit von Drebrin an der Membran lokalisiert. Dass es seine Membran-assoziierte Lokalisation auch nach dem Drebrin *knockdown* aufrechterhalten kann, spricht für eine zusätzliche Interaktion mit anderen Transmembranproteinen. Es ist bekannt, dass PECAM-1 mit β -Catenin interagiert (Matsumura *et al.*, 1997) (s. Abb.

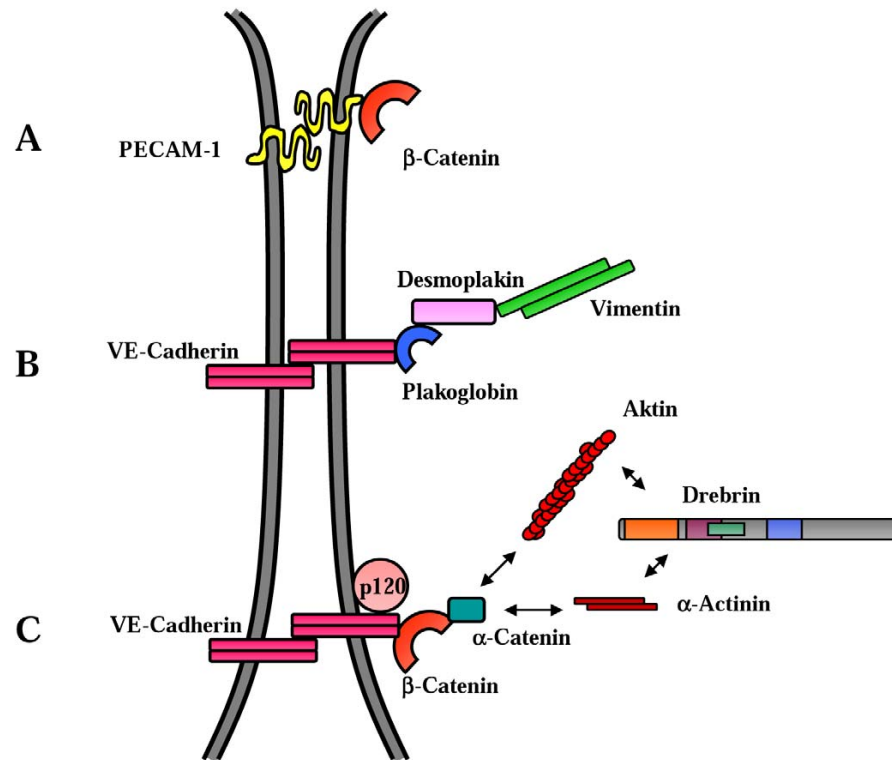


Abb. 4.2. Schematischer Übersicht über die mögliche Zusammensetzung von *adherens junctions*

(A) Auch in Abwesenheit von VE-Cadherin in der Zellmembran ist β -Catenin in der Lage, seine Membran-assoziierte Lokalisation aufrechtzuerhalten, dies erfolgt über die Bindung an PECAM-1; (B) Ausbildung von *complexus adhaerentes* über die Interaktion zwischen VE-Cadherin, Plakoglobin, Desmoplakin und Vimentin in Abwesenheit von β -Catenin; (C) über die Interaktion mit Aktin bzw. α -Actinin könnte Drebrin in der Lage sein, Einfluss auf die Stabilisierung von *adherens junctions* auszuüben.

4.2. A). Ilan *et al.* konnten 1999 darüber hinaus nachweisen, dass β -Catenin durch PECAM-1 an die Zellmembran rekrutiert und dort gebunden wird. Da die subzelluläre Verteilung von PECAM-1 durch den Drebrin *knockdown* nicht beeinträchtigt wurde, ist anzunehmen, dass β -Catenin auf diesem Wege an die Membran lokalisiert. Da β -Catenin auf diese Weise an den *adherens junctions* stabilisiert werden kann, ist es wahrscheinlich, dass auch die Verbindung dieser Strukturen an das Aktin-Zytoskelett gewährleistet wird. Unter Punkt 1.2.1. wurde bereits beschrieben, dass β -Catenin über die Bindung an α -Catenin eine Interaktion mit Aktin-Bindeproteinen und Aktin eingehen kann und damit die Verankerung der *adherens junctions* an das Aktin-Zytoskelett bewirkt. Dies trägt maßgeblich zur Aufrechterhaltung der Zellmorphologie bei und gewährleistet damit die Ausbildung einer geschlossenen Endothelschicht.

In Abwesenheit von β -Catenin an der Zellmembran würde auch α -Catenin nicht mehr dort lokalisieren. Es käme zur vermehrten Bindung zwischen Plakoglobin und VE-Cadherin. Plakoglobin ist in der Lage, mit Desmoplakin zu interagieren, was die Kopplung an Vimentin,

einem Intermediärfilament, und eine damit verbundenen Ausbildung von *complexus adherentes* statt *adherens junctions* bewirken würde (s. Abb. 4.2. B). Die Auswirkungen dieses Vorgangs auf die Zellmorphologie bewirken schwere Defekte in der Vaskulatur (Cattelino *et al.*, 2003).

Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass andere Bestandteile der Zellmembran nach dem Verlust von VE-Cadherin aus derselben die Integrität des *monolayers* aufrechterhalten. Weitere Untersuchungen sollten diesen Ansatz vor allem auf Komponenten der *tight junctions* in Endothelzellen ausweiten. Zudem sollte die funktionelle Integrität des Endothels überprüft werden, um festzustellen, ob die trotz Drebrin *knockdown* gebildete *monolayer* Struktur tatsächlich genauso stabil ist wie das unter physiologischen Drebrin-Konzentrationen gebildete Endothel.

Die Rolle von Drebrin in den verschiedenen Zellkontaktformen kann nicht eindeutig auf *adherens junctions* eingeschränkt werden, da auch die Ausbildung von *adherens* und *tight junctions* durch das Zusammenwirken der einzelnen Komponenten eng miteinander verknüpft ist. So ist das Zelladhäsionsmolekül Nectin ein weiterer Bestandteil von *adherens junctions* (s. Punkt 1.2.1.). Die Mitglieder der Nectin-Familie sind über das F-Aktin-Bindeprotein Afadin an das Aktinzytoskelett gekoppelt. Sie spielen eine bedeutende Rolle beim Aufbau von *adherens junctions* und bei Signaltransduktions-Prozessen, die das Aktinzytoskelett betreffen (Shimizu und Takai, 2003; Takai und Nakanishi, 2003; Fukuyama *et al.*, 2005; Kawakatsu *et al.*, 2005). Nectine bilden interzelluläre Adhäsionspunkte, die den Einbau von Cadherin in die Zellmembran erleichtern. Nectine rekrutieren in Zusammenwirken mit Cadherin während oder nach der Bildung der *adherens junctions* sukzessiv JAM, Claudin und Occludin an die apikale Seite der *adherens junctions*. Dadurch werden *tight junctions* gebildet (Takai und Nakanishi, 2003). JAM bindet einen Zellpolaritäts-Komplex, welcher aus Par-3, atypischer PKC (aPKC) und Par-6 besteht und rekrutiert ihn an die *tight junctions* (Takai und Nakanishi, 2003). Es ist anzunehmen, dass der Zusammenhalt des endothelialen *monolayer* vor allem durch ein dynamisches Gleichgewicht zwischen diesen Zell-Zellkontakt-Arten hergestellt wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte vor allem ein Einfluss Drebrins auf die Ausbildung von *adherens junctions* gezeigt werden. Allerdings wurde auch eine Interaktion zwischen Drebrin und PAR-6 in Epithelzellen nachgewiesen (Bazellieres *et al.*, 2006), was sich wiederum auf

die Ausbildung von *tight junctions* bezieht. Der Drebrin *knockdown* hatte in diesen Zellen unter anderem einen Defekt in der Ausbildung der Zellpolarität und damit der Zellmorphologie zur Folge, während die Ausbildung von *tight junctions* nicht beeinträchtigt wurde. Ein entscheidendes Resultat des *knockdowns* war allerdings die Desorganisation von E-Cadherin in der Zellmembran. Somit ist der im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesene stabilisierende Effekt von Drebrin auf die VE-Cadherin-Lokalisation in HUVEC vermutlich auch auf andere Zelltypen übertragbar.

4.4. Interaktionen von Drebrin in HUVEC

4.4.1. Drebrin interagiert mit α -Actinin in HUVEC

Wie bereits unter Punkt 4.3. erwähnt, bietet die Aufklärung der Interaktion zwischen Drebrin und VE-Cadherin einen Ansatz zur Aufklärung des beobachteten Stabilisations-Effekts. In der vorliegenden Arbeit konnte über Immunpräzipitations-Versuche zwar keine direkte Interaktion zwischen Drebrin und VE-Cadherin nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Interaktion zwischen Drebrin und α -Actinin konnte dagegen durch die Kopräzipitation beider Proteine in HUVEC-Lysaten nachgewiesen und auf subzellulärer Ebene mittels Immunfluoreszenz bestätigt werden (s. Punkt 3.6.). Die subzelluläre Interaktion bezog sich sowohl auf Podosomen als auch auf Aktin *waves* (s. Abb. 3.23.).

α -Actinin gehört zur Spectrin-Überfamilie der Aktin-quervernetzenden Proteine. Es handelt sich um ein antiparallel angeordnetes Homodimer mit einer molekularen Masse von ca. 100 kDa (Blanchard *et al.*, 1989) welches, wie unter Punkt 4.3. beschrieben, unter anderem der Verankerung von *adherens junctions* an das Aktin-Zytoskelett dient. Neuere Forschungsergebnisse weisen auf eine essentielle Rolle von Aktin-Bindeproteinen wie α -Actinin bei der Kopplung von VE-Cadherin-basierenden Zellkontakten mit dem Aktin-Zytoskelett hin: Yamada *et al.* haben 2005 die bisher beschriebene Bindungsvermittlung über α -Catenin in Frage gestellt, da gezeigt wurde, dass α -Catenin nicht gleichzeitig an den β -Catenin-VE-Cadherin-Komplex und Aktin binden kann. α -Actinin könnte somit die Interaktion zwischen α -Catenin und dem Aktin-Zytoskelett bewirken (s. Abb. 4.2. C).

Die Interaktion zwischen α -Actinin und Drebrin könnte ebenfalls eine indirekte Interaktion zwischen Drebrin und VE-Cadherin über α - und β -Catenin bewerkstelligen (s. Abb. 4.2. C). Die Entfernung von Drebrin aus diesem System durch den Drebrin *knockdown* könnte zu ei-

nem Ungleichgewicht führen, das ein verändertes Bindungsverhalten von α -Actinin zur Folge hätte. Es muss in zukünftigen Arbeiten geklärt werden, inwiefern die Interaktion von α -Actinin und Drebrin an dem Aufbau bzw. der Stabilität von VE-Cadherin beteiligt ist. In weiterführenden Versuchen innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte bereits festgestellt werden, dass der Drebrin *knockdown* keinen Einfluss auf das intrazelluläre α -Actinin-Level in HUVEC hat (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren gilt es mittels Immunfluoreszenzmikroskopie herauszufinden, ob die subzelluläre Lokalisation von α -Actinin durch den Drebrin *knockdown* beeinträchtigt wird. Falls es auch in diesem Fall zu einer Dislokation des Proteins von der Zellmembran kommt, ist es wahrscheinlich, dass Drebrin α -Actinin ebenfalls stabilisiert, bzw. im Zusammenwirken mit α -Actinin an der Stabilisierung von VE-Cadherin beteiligt ist. Zudem sollte festgestellt werden, wie sich der Bindungsvermittler α -Catenin nach dem Drebrin *knockdown* verhält. Es wurde bereits gezeigt, dass β -Catenin durch diesen Vorgang in seiner Lokalisation nicht gestört wird, da es vermutlich über PECAM-1 an der Zellmembran fixiert wird (s. Punkt 4.3.). Ob α -Catenin über diesen Komplex ebenfalls an der Membran lokalisiert werden kann, muss in HUVEC ebenfalls nachgewiesen werden.

Des Weiteren ist anzunehmen, dass Drebrin über seine Interaktion mit α -Actinin die Struktur des Aktin-Netzwerks beeinflusst. Es wurde bereits gezeigt, dass Drebrin die Aktin-Bindeaktivität und damit die Aktin-Quervernetzung durch α -Actinin inhibieren kann (Ishikawa *et al.*, 1994). α -Actinin ist zudem in der Lage, nicht nur Aktin, sondern mit Vinkulin, Talin und Integrinen podosomale Komponenten zu binden (McGregor *et al.*, 1994; Edlund *et al.*, 2001). Sowohl in Podosomen als auch in Aktin *waves* wurde in HUVEC eine eindeutige Kollokalisierung beider Proteine nachgewiesen (s. Abb. 3.23. B). Es ließ sich damit einerseits eine erneute Gemeinsamkeit zwischen Podosomen und Aktin *waves* feststellen. Andererseits könnte die identifizierte Interaktion vor allem bei der Ausbildung der Dynamik von Aktin *waves* eine bedeutende Rolle spielen.

Die Interaktion zwischen Drebrin und α -Actinin ist offensichtlich an der Ausbildung dynamischer, Aktin-basierter zellphysiologischer Prozessen beteiligt. In zukünftigen Arbeiten sollte vor allem durch einen α -Actinin *knockdown* in HUVEC gezeigt werden, ob es im Bezug auf die Podosomen- und Aktin *waves* Bildungsrate, sowie in der Zell-Zellkontakt-Ausbildung zu ähnlichen Effekten kommt wie in Drebrin-defizienten Zellen.

4.4.2. Drebrin interagiert mit Myosin IIa in HUVEC

In vorangegangenen Immunpräzipitations-Studien durch Hayashi *et al.* (1996) konnte bereits gezeigt werden, dass die Präzipitation von Drebrin im Komplex mit Myosin IIa und α -Actinin erfolgt. In der vorliegenden Arbeit konnten diese Daten sowohl bestätigt als auch weiter spezifiziert werden, indem gezeigt wurde, dass die Präzipitation von endogenem Myosin IIa auch die Kopräzipitation von Drebrin zur Folge hat (s. Punkt 3.6.: Abb. 3.22. A). Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnte auf subzellulärer Ebene zwar eine Lokalisation von Myosin IIa in Podosomen bzw. Aktin *waves* beobachtet werden; aufgrund der hohen intrazellulären Abundanz des Proteins konnte allerdings keine Anreicherung in diesen Strukturen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die putative Interaktion zwischen Drebrin und Myosin IIa ist somit im Zell-Lysat möglich, aber auf subzellulärer Ebene wahrscheinlich nicht für Aktin *waves* spezifisch. Sie könnte allerdings einen Erklärungsansatz für die durch die Drebrin-Überexpression in HUVEC beobachteten Veränderungen der Zellmorphologie liefern. Die Zellen weisen massive Defekte in der Retraktion auf (s. Punkt 3.4.3.), was sich auch negativ auf die Zellmigration auswirkt (s. Punkt 3.8.2.). Die kontrollierte Aktin-Myosin-Kontraktilität ist von großer Bedeutung für die korrekte Ausübung beider Prozesse (Raftopoulou und Hall, 2004). Drebrin ist nachweislich an der Umorganisation von Aktin beteiligt (Shirao *et al.*, 1994; Ishikawa *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, 1996). Durch eine zusätzliche Fähigkeit zur Interaktion mit Myosin könnte die Veränderung des Retraktions- und damit auch des Migrations-Verhaltens nach Drebrin-Überexpression die Folge einer Beeinträchtigung dieses Systems sein.

Zudem haben Untersuchungen an Epithelzellen ergeben, dass Myosin IIa in der Lage ist, an Zell-Zellkontakten zu akkumulieren, wo es die Lokalisation bzw. Anreicherung von E-Cadherin reguliert und damit die Integrität von *adherens junctions* bewirkt (Shewan *et al.*, 2005). Da die Interaktion zwischen Drebrin und Myosin IIa in Zell-Lysaten nachgewiesen werden konnte, wäre es möglich, dass Drebrin auf diesem Wege seinen stabilisierenden Effekt auf die Lokalisation von VE-Cadherin in Endothelzellen ausübt. Zukünftige Arbeiten sollen zeigen, inwiefern eine Kolo-kalisation von Drebrin und Myosin IIa in Zell-Zellkontakten auftritt und wie sich der Drebrin *knockdown* darauf auswirkt.

4.4.3. Bewirken Drebrin und Abl2 die Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts in Endothelzellen?

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Drebrin über seine C-terminale poly-Prolinregion vermutlich in der Lage ist, mit der Tyrosin-Kinase Abl2 zu interagieren (s. Punkt 3.5.4.). Mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnte eine gemeinsame subzelluläre Lokalisation von Drebrin und Abl2 in Aktin *waves* gezeigt werden (s. Abb. 3.20.). Es wurde ebenfalls beobachtet, dass Aktin *waves* eine Umverteilung von Drebrin an Zellprotrusionen und neu ausgebildete Zellkontakte bewirken können (s. Punkt 3.7.1.). Da Drebrin offensichtlich an der Ausbildung von Zellprotrusionen beteiligt ist, könnte die Interaktion zwischen Drebrin und Abl2 die Grundlage für diesen Prozess darstellen. Die Mitglieder der Abl-Tyrosin-Kinasen-Familie sind ebenfalls essentielle Regulatoren der Zellmigration und -morphogenese (Koleske *et al.*, 1998; Grevingoed *et al.*, 2001; Kain und Klemke, 2001; Plattner *et al.*, 2003; Frasca *et al.*, 2001). Sie übertragen Signale von Adhäsions- und Wachstumsfaktor-Rezeptoren auf das Zytoskelett (Jin und Wang, 2007). Abl und Abl2 (Arg) bewirken die Bildung von Aktin-basierten Protrusionen während der Integrin-vermittelten zellulären Adhäsion und Ausbreitung (Woodring *et al.*, 2002, 2004; Miller *et al.*, 2004; Moresco *et al.*, 2005).

Ein Effektor von Abl2 ist das RhoGTPase-aktivierende Protein p190RhoGAP (Hernandez *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die Kinase in Fibroblasten über p190RhoGAP einen inhibitorischen Effekt auf Rho ausübt (Hernandez *et al.*, 2004; Bradley *et al.*, 2006; Peacock *et al.*, 2007). Sowohl Drebrin als auch Abl2 könnte demnach in Zusammenwirken mit der GTPase RhoA eine Modifizierung des Aktin-Netzwerkes in HUVEC bewirken. Dies lässt die Annahme zu, dass Drebrin durch seine Fähigkeit, Abl2 zu binden, eine erhöhte RhoA-Aktivität auslösen könnte. Abl2 wäre in diesem Fall durch die Interaktion mit Drebrin in seiner Fähigkeit, p190RhoGAP zu aktivieren, eingeschränkt. Die erhöhte RhoA-Aktivität hätte zum Beispiel eine modifizierte Rho-Kinase-Aktivität zur Folge, was ebenfalls die Retraktionsfähigkeit der Zelle verändern könnte.

Peacock *et al.* konnten 2007 zeigen, dass Abl2 die Integrin-vermittelte Zellmigration durch die Abschwächung der zellulären Kontraktilität und der Regulation fokaler Adhäsionen inhibiert. Es wurde ebenfalls festgestellt, dass die Überexpression von Abl2 eine Inhibierung der Zellmigration im Rahmen der Wundheilung zur Folge hat. Die verstärkte Interaktion zwischen Drebrin und Abl2 in stark Drebrin-überexprimierenden Zellen könnte somit auch eine Modifizierung fokaler Adhäsionsstrukturen auslösen, was eine Erklärung für die gestörte

Retraktion sein könnte. Da in der vorliegenden Arbeit ebenfalls gezeigt werden, dass durch die Drebrin-Überexpression nicht nur das Aktin-Netzwerk, sondern auch die subzelluläre Verteilung von Vinkulin stark moduliert wird (s. Punkt 3.4.2.) ist es wahrscheinlich dass eine unverhältnismäßig starke Adhäsion Drebrin-überexprimierender Zellen, bzw. eine Störung der Ablösung dieser Adhäsionen für die Ausbildung von Retraktionsartefakten verantwortlich ist.

Die Feststellung, dass Drebrin in HUVEC sowohl in der Ausbildung von Zell-Zellkontakten und der Modulation des Aktin-Zytoskeletts, sowie in der Beeinflussung der Morphologie von HUVEC eine Rolle spielt, lässt die Vermutung zu, dass dieses Protein theoretisch auch an den entsprechenden Vorgängen in *dendritic spines* beteiligt sein könnte (s. Punkt 4.12.). Es wurde bereits gezeigt, dass die Isoform A von Drebrin in die Ausbildung der Morphologie der *dendritic spines* involviert ist (Hayashi und Shirao, 1999). Die Anwesenheit des in dieser Arbeit identifizierten putativen Interaktionspartners Abl2 und seiner Effektoren in Neuronen spricht dafür, dass die morphologische Aktivität Drebrins in *dendritic spines* über diese Tyrosin-Kinase reguliert werden könnte. Ob sich diese Funktion nur auf die Beeinflussung der Morphologie oder beispielsweise auch auf die Ausbildung von synaptischen Zellkontakten bezieht, gilt es noch zu klären.

4.4.4. Crk als putativer Interaktionspartner von Drebrin

In der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Interaktion zwischen Crk und Drebrin über Drebrins C-terminale poly-Prolinregion festgestellt (s. Punkt 3.5.4.). Somit ergibt sich, neben der Interaktion mit Abl2, ein weiterer Ansatz zur Erklärung der Beeinflussung des Aktin-Netzwerks und damit der Zellmorphologie durch Drebrin in HUVEC. Die Überexpression von Drebrin in HUVEC könnte über die Bindung des Fusionsproteins an Crk eine Störung der Adhäsions-vermittelten Signal-Transduktion führen und damit die morphologischen Besonderheiten der transfizierten Zellen auslösen. Durch seine Adapterfunktion ist Crk sowohl an der Aktivierung von Rac als auch von Cdc42 beteiligt, was zur Bildung von Lamellipodien bzw. Filopodien führt.

Crk- und CRKL (*Crk like*)-Proteine besitzen SH2- und SH3-Domänen, welche spezifische Molekülabschnitte erkennen, und damit die selektive Ausbildung von Multiproteinkomplexen erlauben (Tanaka *et al.*, 1993). Ihre Funktion liegt damit in der zeitlich aufeinander abgestimmten Ausbildung von Signaltransduktions-Proteinkomplexen (Feller, 2001). Die SH2-

Domäne von Crk erkennt vor allem pY-x-x-P-Motive, während die SH3-Domäne hauptsächlich P-x-x-P-x-K-Abfolgen bindet (Feller, 2001). Crk bindet vor allem an stark phosphoryliertes p130Cas (Cary *et al.*, 1996 und 1998), welches durch die Adhäsions-vermittelte Autophosphorylierung von FAK an die Zellperipherie rekrutiert wird (Cobb *et al.*, 1994; Polte und Hanks, 1995). Über die Rekrutierung von DOCK180 (Klemke *et al.*, 1998; Cheresh *et al.*, 1999) kommt es zur Aktivierung von Rac1, und somit zur Bildung von Lamellipodien, Membran *ruffles* und zur allgemeinen Aktin-Reorganisation über WASP/WAVE und den Arp2/3-Komplex führt (Ridley *et al.*, 1992; Hall, 2005). Crk-Proteine spielen nicht nur bei der Aktivierung kleiner GTPasen (Rac, Rap1) eine Rolle, sondern auch bei der Relokalisierung und Aktivierung verschiedener anderer Effektorproteine wie dem Rap1-GEF C3G, aber auch Proteinkinasen der Abl- und GCK-Familie.

Immunfluoreszenz-Aufnahmen zeigten, dass die durch die Kollokalisierung implizierte Bindung zwischen Drebrin und Crk offensichtlich sowohl in Aktin *waves* als auch in der Zellperipherie stattfindet (Abb. 3.20.). Da eine Rekrutierung von Drebrin über die Dynamik der Aktin *waves* an die Zellmembran festgestellt wurde, müssten zukünftige Arbeiten zeigen, ob eine ähnliche Umverteilung von Crk ebenfalls stattfindet. Es ist vorstellbar, dass Crk über seine SH3-Domäne die Rekrutierung von Drebrin an peripher lokalisierte Signaltransduktions-Komplexe bewerkstelligt und damit die Modulation des Aktin-Zytoskeletts beispielsweise über Rac beeinflusst wird. Dieser Vorgang könnte eine Grundlage für die Entstehung filopodienartiger Strukturen bilden. Ob Drebrin in diese Prozesse tatsächlich involviert ist, müsste in folgenden Arbeiten beispielsweise über die Interaktion der beiden Proteine in HUVEC-Lysaten nachgewiesen werden.

4.5. Drebrin beeinflusst die RhoA-Aktivität in HUVEC

Die Regulation migratorischer Prozesse wird maßgeblich durch RhoGTPasen organisiert (Übersicht bei Raftopoulou und Hall, 2004). Sie fungieren als molekulare Schalter, die die Signaltransduktion kontrollieren, indem sie zwischen einer inaktiven, GDP-gebundenen und einer aktiven, GTP-gebundenen Konformation wechseln. In der aktiven Form ist es ihnen möglich, mit nachgeschalteten Effektor-Proteinen zu interagieren und damit intrazelluläre Reaktionen wie die Regulation der Aktin-Dynamik auszulösen. Dabei übernehmen die einzelnen Mitglieder der RhoGTPasen-Familie unterschiedliche Aufgaben. Während Rho den Aufbau der kontraktiven Aktin-Myosin-Filamente bewirkt, sorgen Rac und Cdc42 für die Polyme-

risation von Aktin und damit für die Ausbildung lamellipodiale, bzw. filopodiale Protrusionen.

Drebrin scheint einen Einfluss auf die koordinierte Expression und Funktion der GTPase RhoA auszuüben. Dies konnte durch die Überexpression von Drebrin in HUVEC und die anschließende Auswertung der RhoA-Aktivität der Zellen in dieser Arbeit gezeigt werden (s. Punkt 3.4.3.). Durch die Überexpression von Drebrin kommt es zu einem Anstieg der netto-Rho-Aktivität bis um den Faktor 1,5. Die Beobachtungen, dass Drebrin-überexprimierende Zellen nicht nur eine Vielzahl von protrusiven Strukturen, sondern auch verstärkt Retraktions-

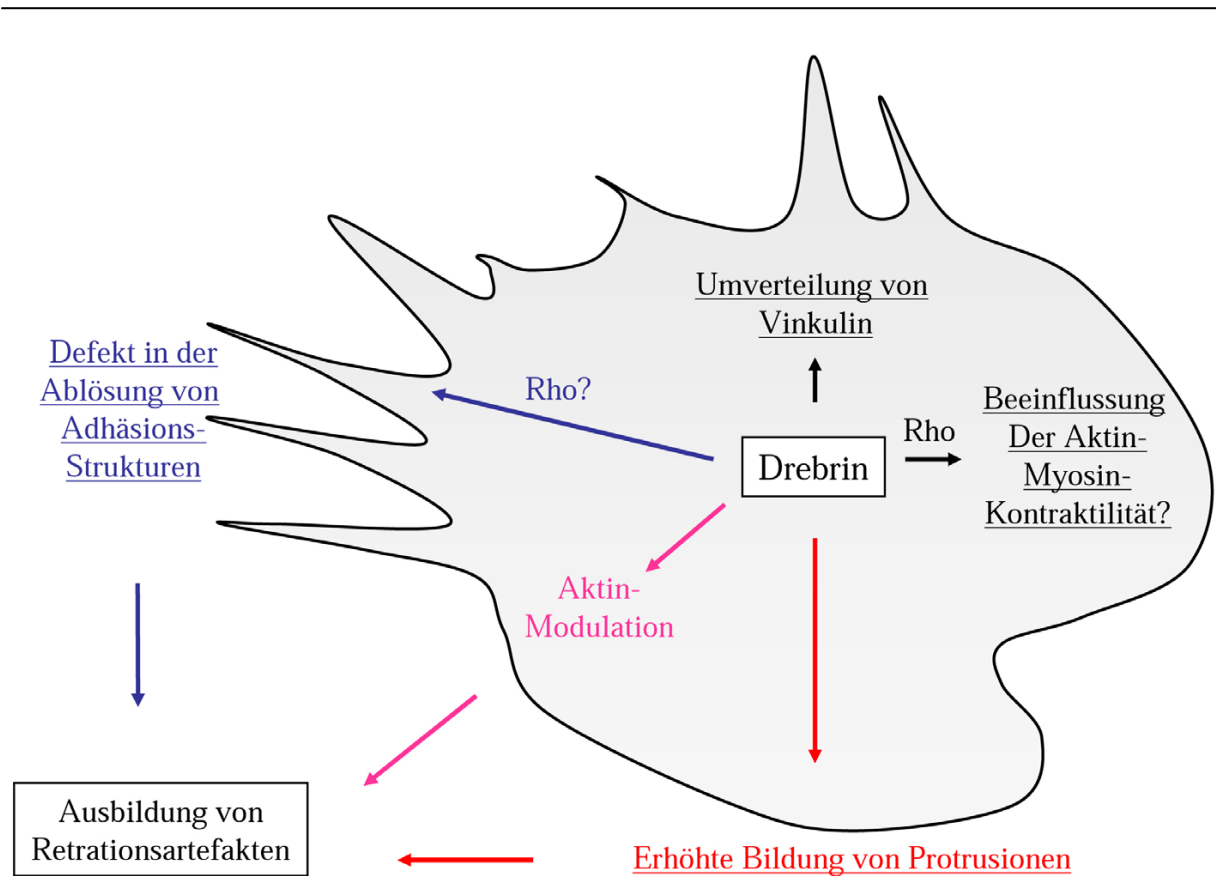


Abb. 4.3. Möglicher Mechanismus zur Entstehung des spezifischen Phänotyps nach Überexpression von Drebrin in HUVEC

Die Überexpression von Drebrin führt in HUVEC zur Ausbildung eines Dosis-abhängigen Phänotyps, der sich aus der Kombination folgender Effekte ergibt: der erhöhten Ausbildung von Protrusions-Strukturen, die vor allem auf der Fähigkeit Drebrins zur Aktin-Modulation beruht; der Umverteilung von Vinkulin; der veränderten Aktin-Myosin-Kontraktilität sowie der defekten Fähigkeit zur Ablösung adhäsiver Strukturen vom Substrat.

artefakt-Strukturen (s. Abb. 3.9. und 3.10., Pfeil) ausbilden, unterstützen die Annahme, dass die erhöhte Rho-Aktivität mit der Störung der Retraktion in Verbindung steht. Untersuchungen an Fibroblasten führten bereits zu der Feststellung, dass ein basales RhoA-Level für die Migration von Fibroblasten zwar unabdingbar ist, zu viel RhoA diesen Vorgang allerdings inhibiert (Takaishi *et al.*, 1994; Ridley, 1995). Die Notwendigkeit der RhoA-Aktivität für die Migration beruht vermutlich darauf, dass sowohl die RhoA-abhängige Aktin-Myosin-Kontraktion als auch die Integrin-Adhäsion die nötige Spannung zur Ablösung des *trailing edge* zur Folge haben. Es ist bekannt, dass RhoA über den Effektor p160ROCK, eine Rho-Kinase, die Retraktion in Monozyten und Krebszellen vermittelt (Somlyo *et al.*, 2000; Worthylake *et al.*, 2001). p160ROCK ist eine Serin/Threonin-Kinase, die einen kritischen Modulator der RhoA-vermittelten Aktin-Dynamik darstellt (Amano *et al.*, 2000). Inwieweit Drebrin Effektoren von RhoA tatsächlich beeinflusst, ist noch nicht bekannt und müsste in weiteren Studien untersucht werden.

4.6. Drebrin-vermittelte Aktin-Modulation und Zell-Morphologie

Die Modulation des Aktin-Zytoskeletts bildet die Grundlage für eine Reihe von zellphysiologischen Vorgängen. So ist beispielsweise für alle Schritte der Migration der Zelle (Extension protrusiver Strukturen und Ausbildung von Adhäsionsstrukturen am *leading edge* – Kontraktion des Zellkörpers – Ablösung von Adhäsionen am *trailing edge*) der Auf- und Abbau, sowie die Umorganisation des Aktinzytoskeletts nötig. Damit aus den genannten Schritten letztendlich eine Vorwärtsbewegung resultiert, müssen die Aktin-organisatorischen Prozesse räumlich und zeitlich gut aufeinander abgestimmt sein (Raftopoulou und Hall, 2004) (s. Punkt 1.3.3.).

Die Ausbildung von Protrusionen am *leading edge* der Zelle ist von essentieller Bedeutung für die Initiation der Migration (Mitchison und Cramer, 1996; Pollard und Borisy, 2003; Ponti *et al.*, 2004). Über die Aggregation von Integrin-Rezeptoren innerhalb dieser Protrusion wird die extrazelluläre Matrix gebunden (Jockusch *et al.*, 1995; Lauffenburger und Horwitz, 1996). Daraus resultiert eine Verankerung der Protrusionsstruktur und des Aktin-Zytoskeletts über Integrine an die Matrix. Somit kann aus der Myosin-basierten Kontraktion des Aktin-Netzwerkes Zugkraft auf den Zellkörper übertragen werden. Diese bewirkt sowohl die Bewegung der Zelle in Richtung des *leading edge* als auch die Ablösung vom Substrat am *trailing edge* (Jay *et al.*, 1995; Lauffenburger und Horwitz, 1996; Mitchison und Cramer, 1996; Ridley, 2006; Gupton und Waterman-Storer, 2006). Diese Art von Zell-Matrix-Kontakt wird als

„fokale Adhäsion“ bezeichnet. Charakteristisch für diese Struktur ist die Verbindung an Aktin-Stressfasern. Weitere Matrix-Kontaktstrukturen mit dem alleinigen Zweck der Adhäsion sind fokale Komplexe und fibrilläre Adhäsionen.

Mit Drebrin-GFP transfizierte HUVEC weisen einerseits eine erhöhte Bildung von Lamellipodien und Filopodien sowie eine starke *ruffling* Aktivität auf. Andererseits zeigen diese Zellen eine massive Beeinträchtigung in ihrem Retraktionsvermögen, was vermutlich auf der gestörten Fähigkeit zur Ablösung von Adhäsionen von Substrat zurückzuführen ist. Dies wirkt sich negativ auf die Migrationsfähigkeit der Zellen aus. Die Kombination beider Phänomene führt zu der Ausbildung von teilweise bäumchenartig verzweigten Zellextensionen (s. Abb. 3.9. und 3.10.). Auch in anderen Zelltypen wie Fibroblasten oder Neuronen konnte die Drebrin-abhängige Ausbildung modifizierter Aktin-Strukturen beobachtet werden (Shirao *et al.*, 1992; Hayashi *et al.*, 1996; Mizui *et al.*, 2005; Chew *et al.*, 2005; Peitsch *et al.*, 2001 und 2006).

Die Rolle Drebrins in der Zelle wird als Modulation des Aktin-Zytoskeletts beschrieben. Drebrin ist in der Lage, Aktin zu binden und umzuorganisieren (Shirao *et al.*, 1994; Hayashi und Shirao, 1999), indem es die Aktin-Bindeaktivität von Tropomyosin und α -Actinin (Ishikawa *et al.*, 1994) inhibiert. Es ist bekannt, dass α -Actinin und Tropomyosin Aktinfilamente stabilisieren, indem sie sie vor der Dissoziation durch Gelsolin (Ishikawa *et al.*, 1989a und b), bzw. ADF (*actin depolymerization factor*) (Bernstein und Bamburg, 1982) schützen. Damit bewirkt Drebrin, dass die Aktinfilamente kurz und ungebündelt vorliegen, was eine Voraussetzung für die erhöhte Dynamik des Aktin-Netzwerkes ist. Unter physiologischen Drebrin-Konzentrationen innerhalb der Zelle könnte Drebrin an der koordinierten Ausbildung protrusiver Strukturen durch die Erhöhung der Aktin-Dynamik beteiligt sein. Eine unphysiologisch hohe intrazelluläre Drebrin-Konzentration bewirkt offensichtlich eine Übersteuerung dieser Funktion: es kommt zur unkontrollierten Ausbildung von protrusiven Strukturen. Die in HUVEC beobachtete Beeinflussung der Zell-Morphologie durch die Drebrin-Überexpression entsteht vermutlich aus der Kombination einer erhöhten Protrusions-Bildung mit einer verminderten Retraktionsfähigkeit.

Zusätzlich zu seiner kompetitiven Rolle zwischen Drebrin und α -Actinin um die Aktin-Bindung ist Drebrin offensichtlich auch in der Lage, mit α -Actinin selbst zu interagieren, was in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte (s. Punkt 4.4.).

Die Bedeutung der Aktin-Modulation von Drebrin wurde bisher vor allem in Bezug auf Neuronen untersucht. Die Neuronen-spezifische Drebrin-Isoform A ist, lokalisiert wie bereits unter Punkt 1.5. erläutert, innerhalb der Dendriten vor allem an die Dornfortsätze (*dendritic spines*) (Shirao *et al.*, 1987; Hayashi *et al.*, 1996). Das Aktinzytoskelett spielt eine entscheidende Rolle in der Morphogenese dieser Protrusionen (Übersicht bei Sekino *et al.*, 2007). Hayashi und Shirao zeigten 1999, dass die Transfektion von GFP-Drebrin in Neuronen des Zerebralkortex der Ratte eine Anreicherung des Fusions-Proteins an *dendritic spines* und die Verlängerung derselben bewirkt, was als „Megapodien“ bezeichnet wird (Mizui *et al.*, 2005). Ein Deletionskonstrukt zu Drebrin, dem mit den Aminosäuren 233-300 die Aktinbinderegion fehlt, löste keine Anreicherung in *dendritic spines* aus. Die Aktinbindefähigkeit des Moleküls scheint somit für die Lokalisation von Drebrin in den Dornfortsätzen essentiell notwendig zu sein.

Abl und Abl2 spielen ebenfalls eine Rolle bei Veränderungen in der neuronalen Morphogenese (Moresco *et al.*, 2005) und der Stabilität der kortikalen Dendriten-verzweigungen (Moresco *et al.*, 2005). Sowohl Drebrins putativer Interaktionspartner Abl2 als auch p190RhoGAP und Rho sind in *dendritic spines* vorhanden (Lamprecht *et al.*, 2002; Moresco *et al.*, 2003; Santos Da Silva *et al.*, 2004). Sfakianos *et al.* konnten 2007 nachweisen, dass die Signaltransduktion über Abl2 und p190RhoGAP die Morphologie von *dendritic spines* reguliert und somit die Stabilität der Dendritenstruktur im Hippocampus fördert. In HUVEC wurde Drebrin in dieser Arbeit als maßgeblich beteiligt an morphologischen Prozessen befunden, was vermutlich auf seinem Einfluss auf die RhoA-Aktivität beruht. Zukünftige Forschungsarbeiten werden zeigen, inwiefern sich Zusammenhänge zwischen Endothelzellen und Neuronen bzgl. der RhoA-vermittelten Aktin-Modulation durch Drebrin, eventuell über Abl2, bestätigen lassen.

4.7. Eine kurze Untereinheit innerhalb der Aktinbinderegion vermittelt die Aktinmodulation durch Drebrin

Mit der Untersuchung der Molekularstruktur von Drebrin sollte anhand von Transfektions-Versuchen gezeigt werden, welche Abschnitte an der morphologischen Funktion beteiligt sind. Es wurde festgestellt, dass C-terminale Konstrukte in diesem Bezug keine Rolle spielen. Weder die Transfektion der poly-Prolinregion (AS 348-428) noch des gesamten C-Terminus (AS 348-633) bewirkten die für Drebrin typische Morphologie-Veränderung der Endothelzellen. Es kam dagegen sogar zu einer signifikanten Erniedrigung der Aktin *waves* Bildungsrate

(s. Punkt 3.5.5.). In dieser Arbeit vorangegangenen Mikroinjektions-Studien konnte zudem nachgewiesen werden, dass auch die Bildung von Podosomen-Rosetten durch diese Untereinheiten von Drebrin signifikant eingeschränkt wird (s. Dissertation Osiak, 2007).

Xu und Starnes haben 2006 gezeigt, dass eine Region innerhalb der *coiled coil*-Domäne (173-227) verantwortlich für die Fähigkeit Drebrins ist, an die Zelloberfläche zu assoziieren und die Filopodienbildung zu forcieren. Da dies die Modulierung von Aktin-Netzwerkstrukturen mit einschließt, wurde der *coiled coil* Domäne erhöhte Aufmerksamkeit gewidmet. Diese Domäne überschneidet sich mit der C-terminal benachbarten MAR (*minimal actin remodeling*)-Domäne (s. Abb. 4.4.). Durch die Transfektion der Konstrukte CC171-253-GFP und CC171-263-GFP konnte der beschriebene Effekt bestätigt werden: es fand eine Rekrutierung an die Zellperipherie und eine deutliche Modulierung des Aktin-Zytoskeletts statt (s. Abb. 3.12. und 3.13.), wobei letzteres Konstrukt einen stärker ausgeprägten Phänotyp in HUVEC auslöste, der stark an die Transfektion mit dem Volllängen-Konstrukt erinnert (s. Abb. 3.10.).

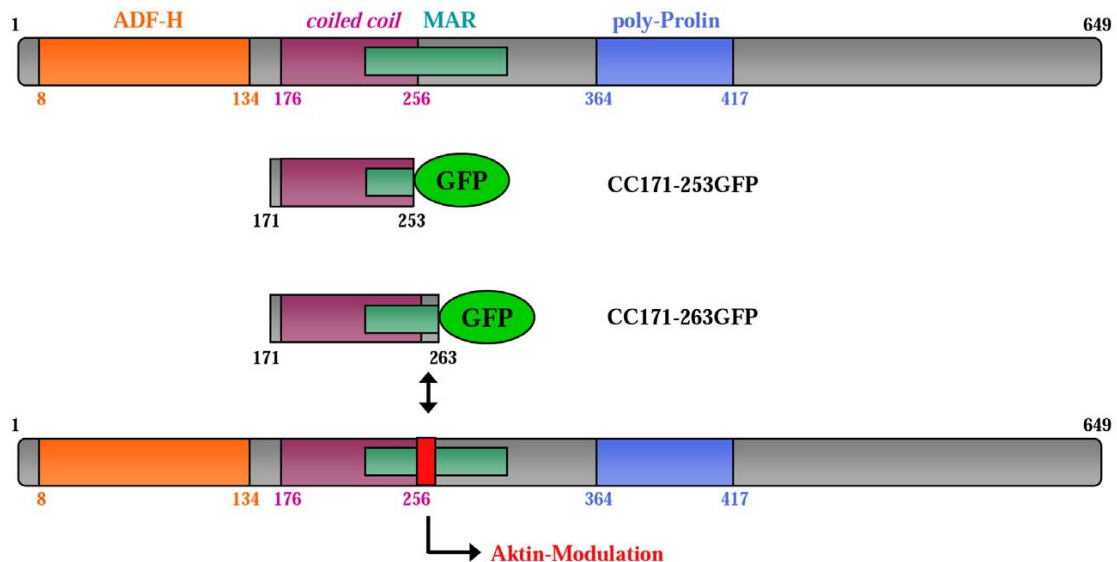


Abb. 4.4. Der Aminosäureabschnitt 254-263 vermittelt die Aktin-modulatorische Fähigkeiten von Drebrin
 Durch Klonierungsversuche konnte gezeigt werden, dass die Lokalisierung von Drebrin an die Zellperipherie in Endothelzellen durch die *coiled coil* Region bewerkstelligt wird. Unterschiede in der Ausprägung des Drebrin-spezifischen Phänotyps nach der Transfektion von HUVEC mit den Konstrukten CC171-253-GFP und CC171-263-GFP ließen den Schluss zu, dass die Modulation des Aktin-Zytoskeletts von einer 10 AS kurzen Untereinheit (254-263) innerhalb der Aktin-Binderegion (MAR, *minimal actin remodeling*) abhängt (roter Kasten).

Diese Ergebnisse zeigen erstens, dass die Lokalisierung von Drebrin an die Zellperipherie, wo es zur Aktin-Modulation kommt, tatsächlich über die *coiled coil* Domäne vermittelt wird. Zweitens konnte durch die Untersuchungen mit beiden Konstrukten festgestellt werden, dass der 10 AS lange Abschnitt 254-263, in dem sich beide Konstrukte unterscheiden, und der sich innerhalb der MAR-Domäne befindet, eine bedeutende Rolle in der Aktinmodulation innerhalb der Aktin-Binderegion von Drebrin spielt.

Durch die genauere Untersuchung des molekularen Aufbaus der sich überschneidenden *coiled coil* Domäne und Aktin-Binderegion Drebrins wurden die putativen Phosphorylierungsstellen S241 und T255 identifiziert. Es wurden Punktmutationen an diesen Aminosäure-Resten in die Sequenz der für die Aktinmodulation ausreichenden Konstrukte eingebaut. Dadurch sollte eine Phosphorylierung inhibiert bzw. simuliert werden. Nach der Transfektion mit den mutierten Konstrukten kam es in keinem Fall zu einer Beeinträchtigung des Drebrin-typischen Phänotyps in HUVEC. Daher haben die betroffenen putativ phosphorylierbaren Aminosäure-Reste vermutlich keinen regulativen Einfluss auf die Drebrin-vermittelte Aktin-Modulation.

4.8. Die Rolle von Drebrin und Aktin *waves* im humanen Endothel

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über das Aktin-Bindeprotein Drebrin und seine Rolle in humanen Endothelzellen beziehen sich auf eine Vielzahl von Funktionen. Von entscheidender Bedeutung scheinen vor allem sein Einfluss auf die Zellmorphologie und die Ausbildung von Zell-Zellkontakten zu sein. Letztere sind für den Aufbau und Erhalt der endothelialen Integrität essentiell. Drebrin wäre durch seine putative Funktion in Regulation, Aufbau bzw. Aufrechterhaltung von *adherens junctions* wäre Drebrin maßgeblich an der korrekten Ausbildung des Endothels beteiligt. Aktin *waves* dienen in diesem Modell der Rekrutierung von Drebrin an die Zellmembran sowie der Ausbildung von Protrusionen, die spezifisch für die Herstellung von Zell-Zellkontakten nötig sind. Diese Funktion spielt eine bedeutende Rolle bei der Ausübung angiogenetischer Prozesse. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Prozesse durch die Ausbildung von Netzwerkstrukturen durch HUVEC auf MatrigelTM *in vitro* simuliert (s. Punkt 3.8.4.). Die Untersuchungen zeigten, dass nach dem Drebrin *knock-down* weitaus komplexere Netzwerke gebildet werden, als unter Anwesenheit von Drebrin. Durch die beobachtete Einschränkung der Anzahl der Knotenpunkte sowie die Zügelung der Länge der gebildeten Vernetzungen durch Drebrin kann man auf eine koordinative Funktion des Proteins im Rahmen angiogenetischer Prozesse durch HUVEC schließen. Diese Funktion

könnte durch den putativ stabilisierenden Effekt von Drebrin auf die VE-Cadherin-Lokalisation vermittelt werden.

Der Einfluss Drebrins auf die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts ist bei angiogenetischen Vorgängen wahrscheinlich von großer Bedeutung, da auch die korrekte Ausbildung der Zellmorphologie über die Funktionalität des Endothels entscheidet. Diese wird maßgeblich durch das Aktin-Zytoskelett reguliert. Indem Drebrin Einfluss auf die Aktin-Dynamik ausübt, könnte es auch auf diesem Wege dafür sorgen, dass die endotheliale Integrität gewahrt wird.

4.9. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte die Funktion der Aktin *waves* auf die Ausbildung von Zell-Zellkontakten und die damit einhergehende Bildung von Zell-Protrusionen eingegrenzt werden. In zukünftigen Arbeiten sollte einerseits untersucht werden, inwieweit Aktin *waves* mit den in *Dictyostelium* dokumentierten *traveling waves* oder vergleichbaren Strukturen in Fibroblasten oder Melanom-Zellen vergleichbar sind. Zudem müssen die Unterschiede bzw. Zusammenhänge zwischen Aktin *waves* und Podosomen sowie die Rolle, die Drebrin in beiden Strukturen spielt, weiter analysiert werden. Zukünftige Arbeiten sollten sich in dieser Hinsicht vor allem auf die Untersuchung der Fähigkeit zur Matrix-Degradation durch Aktin *waves* fokussieren.

Durch die Untersuchung von Drebrin *knockdown* Zellen soll in zukünftigen Arbeiten vor allem der stabilisierende Effekt Drebrins auf die VE-Cadherin-Lokalisation in Zell-Zellkontakten humaner Endothelzellen untersucht werden. Es sollte festgestellt werden, wie die Abwesenheit von Drebrin in der Zelle zum verstärkten Abbau von VE-Cadherin bzw. zur verminderten Expression des Proteins führt.

In zukünftigen Arbeiten zur Entschlüsselung der Funktion Drebrins in HUVEC sollte vor allem die Ausbildung von *tight junctions* untersucht werden. Die *adherens junctions* Komponenten Nectin und Afadin bilden eine entscheidende Grundlage für die Ausbildung von *tight junctions* (Sato *et al.*, 2006). Daher könnte der Effekt durch den Drebrin *knockdown* auf *adherens junctions* auch die korrekte Ausbildung von *tight junctions* betreffen. Somit sollte die Lokalisation bzw. intrazelluläre Konzentration von Nectin und Afadin nach dem Drebrin *knockdown* ebenfalls untersucht werden.

Bezüglich der Ausbildung komplexerer Netzwerkstrukturen von HUVEC auf Matrigel™ nach Drebrin *knockdown* sollte untersucht werden, ob durch die Überexpression von Drebrin eine Umkehrung dieses Effekts festgestellt werden kann. Ebenso sollte der Drebrin *knockdown* Effekt auf die Ausbildung der Zell-Zellkontakte nach Kultivierung auf Matrigel™ mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht werden.

Anhand von Untersuchungen zur Funktionalität des Endothels sollte festgestellt werden, ob die trotz Drebrin *knockdown* gebildeten endothelialen *monolayer* möglicherweise funktionell eingeschränkt sind. Dies könnte zum Beispiel zu einer Beeinträchtigung der Permeabilität führen. In den bisherigen Studien wurde auf physiologische Komponenten wie zum Beispiel die Einwirkung hämodynamischer Kräfte durch den Blutstrom keine Rücksicht genommen. Dies sollte anhand der Kultivierung in speziellen Probenkammern erfolgen.

Die Interaktion zwischen Abl2 bzw. Crk und Drebrin wurde bisher als Kolo-kalisation anhand der Immunfluoreszenzmikroskopie und auf biochemischer Ebene zwischen den aufgereinigten molekularen Untereinheiten (im „TransSignal™ SH3 Domain Array I“) bestätigt. In zukünftigen Arbeiten sollte dies auf die vollständigen Moleküle übertragen und beispielsweise in *pull-down assays* und Immunpräzipitations-Versuchen untersucht werden.

Der Effekt der Drebrin-Überexpression auf den RhoA-Gehalt der Zelle sollte genauer untersucht werden. Es muss festgestellt werden, auf welche Art dies die Beeinträchtigung der Retraktion bewirkt und welche nachgeschalteten Effektoren von RhoA involviert sind. So sollte zum Beispiel die Inhibierung von p160ROCK anhand ihres spezifischen Inhibitors Y-27632 bewirkt und daraus resultierende Effekte auf die zelluläre Retraktion analysiert werden. Die Inhibition von RhoA soll mit Hilfe des spezifischen Inhibitors C3 analysiert werden. Um festzustellen, ob die Beeinträchtigung der Retraktion über die Modifizierung fokaler Adhäsionen unterstützt wird, sollten weitere Komponenten dieser Struktur neben Vinkulin (wie Talin und Paxillin) in die Untersuchungen stark Drebrin-überexprimierender Zellen mit einbezogen werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Sowohl Podosomen als auch Aktin *waves* sind Aktin-reiche Strukturen in HUVEC, die in engem Kontakt zum Substrat stehen. Das Aktin-Bindeprotein Drebrin kommt in beiden Strukturen vor. Während die Rolle von endothelialen Podosomen in Matrixabbau und Adhäsion bereits beschrieben wurde (Osiak *et al.*, 2005) stellte sich zu Beginn der vorliegenden Arbeit die Frage, welche Funktionen Aktin *waves* in HUVEC übernehmen, und welche Rolle Drebrin dabei spielt. Durch die Untersuchung verschiedener zellulärer Funktionen wurden folgende Erkenntnisse gewonnen:

- Drebrin ist ein essentieller Bestandteil von Aktin *waves*. Der Drebrin *knockdown* in HUVEC führte zu einer signifikant verminderten Bildung von Aktin *waves*. Ein vergleichbarer Effekt stellte sich nach der Transfektion von HUVEC mit C-terminalen Drebrin-Konstrukten ein. Dies beruht vermutlich auf einem „Abfangen“ von Bindungspartnern, die über diese Region mit Drebrin interagieren. Dies legt nahe, dass vor allem die C-terminal gelegene poly-Prolinregion und die durch sie hergestellten Protein-Bindungen essentiell für die Ausbildung von Aktin *waves* sind.
- Die Bildung von Drebrin-reichen Aktin *waves* ist vor allem ein Ereignis der frühen Adhäsion. Aktin *waves* bewirken durch die für sie charakteristische Dynamik sowohl eine Ausbildung Zellkontakt-spezifischer Protrusionen, als auch die Anreicherung von Drebrin in Zell-Zellkontakten, die durch diesen Prozess entstehen. Durch Drebrin/Aktin *waves* induzierte Protrusionen sind jedoch nicht essentiell für die Ausbreitung der Zellen im Rahmen der Matrix-Adhäsion oder des Wundschlusses. Die Funktion von Aktin *waves* liegt somit vermutlich in der Versorgung von Zell-Zellkontaktstellen mit Drebrin.
- Die Funktion von Drebrin in Zell-Zellkontakten liegt wahrscheinlich in der Stabilisierung von VE-Cadherin in *adherens junctions*. Der *knockdown* von Drebrin führte zu einer Reduktion des intrazellulären Proteingehalts von VE-Cadherin und damit zu einer schwächeren Lokalisation in Zell-Zellkontakten. Trotzdem sind Drebrin *knockdown* Zellen in der Lage, konfluente Endothelschichten aufzubauen, was vermutlich darauf beruht, dass andere *adherens junctions* Komponenten (PECAM, β -Catenin) nicht beeinflusst werden. Drebrin *knockdown* Zellen zeigten eine Ausbildung von komplexeren Netzwerken auf Matrigel, was darauf

hindeuten könnte, dass der Verlust von VE-Cadherin in den Kontaktstellen zu einer erleichterten Ausbildung von angiogenetisch relevanten Strukturen führt.

– Drebrin beeinflusst die Morphologie von HUVEC. Zellen, die Drebrin überexprimieren, weisen eine deutliche Modifizierung des Aktin-Zytoskeletts auf. Es kommt zur verstärkten Bildung von Filopodien, Lamellipodien sowie von sogenannten Retraktionsartefakten durch die Störung der lokalen De-Adhäsion. Letztere bewirken eine beeinträchtigte Migrationsfähigkeit der Zellen.

– Der Aminosäureabschnitt 254-263 innerhalb des Drebrinmoleküls spielt offensichtlich eine wichtige Rolle in der Drebrin-vermittelten Modulation des Aktin-Zytoskeletts. Die Anwesenheit des Abschnitts in Expressions-Konstrukten der *coiled coil* Domäne entscheidet über die Ausbildung des Drebrin-spezifischen Phänotyps nach der Transfektion in HUVEC.

– Drebrin interagiert über seine C-terminale poly-Proilinregion vermutlich mit der Tyrosinkinase Abl2 sowie mit dem Adapterprotein Crk. Die Interaktion zwischen Drebrin und Abl2 könnte zur regulierten Ausbildung von Rho-vermittelten Adhäsions- und Retraktionsstrukturen beitragen. Über Crk könnte Drebrin die Rac- und Cdc42-vermittelte Bildung von Filopodien und Lamellipodien beeinflussen.

– Phospho-*mimicking* bzw. phospho-inhibitorische Punktmutationen, die an den putativen Phosphorylierungsstellen S241 und T255 in die Sequenz eingebaut worden waren, führten zu keiner Beeinträchtigung des Drebrin-typischen Phänotyps in HUVEC. Diese Aminosäurereste spielen somit vermutlich keine regulative Rolle in der Drebrin vermittelten Aktin-Modulation.

6. LITERATUR

- Aird W.C.** (2005). Coagulation. *Crit Care Med.* 33 (12 Suppl):S485-S487.
- Aird W. C.** (2006). Mechanisms of endothelial cell heterogeneity in health and disease. *Circ.Res.* 98 (2):159-162.
- Aird W. C.** (2007b). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ.Res.* 100 (2):174-190.
- Aird W. C.** (2007a). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ.Res.* 100 (2):158-173.
- Akisaka T., Yoshida H., Inoue S., and Shimizu K.** (2001). Organization of cytoskeletal F-actin, G-actin, and gelsolin in the adhesion structures in cultured osteoclast. *J.Bone Miner.Res.* 16 (7):1248-1255.
- M. Amano, Y. Fukata, H. Shimokawa and K. Kaibuchi.** (2000). Purification and in vitro activity of Rho-associated kinase. *Methods Enzymol.* 325:149-155.
- Amaral D.G. and Dent J. A.** (1981.). Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J.Comp Neurol.* 195 (1):51-86.
- Andrianantoandro E. and Pollard T.D.** (2006). Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol.Cell* 24 (1):13-23.
- Angst B.D., Marcozzi C. and Magee A.I.** (2001). The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J.Cell Sci.* 114 (Pt 4):629-641.
- Aurrand-Lions M., Johnson-Leger C. and Imhof B.A.** (2002). The last molecular fortress in leukocyte trans-endothelial migration. *Nat.Immunol.* 3 (2):116-118.
- Badowski C., Pawlak G., Grichine A., Chabadel A., Oddou C., Jurdic P., Pfaff M., Albiges-Rizo C. and Block M. R.** (2008). Paxillin phosphorylation controls invadopodia/podosomes spatiotemporal organization. *Mol.Biol.Cell* 19 (2):633-645.
- Bazellieres E., Lane-Guermonprez L., Lebivic A.** (2006). Role of drebrin, a new partner of Par6, in epithelial cell polarity. Abstract. The American Society for Cell Biology. 46th Annual Meeting: Dec. 9-13, 2006.
- Bazzoni G.** (2003). The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr.Opin.Cell Biol.* 15 (5):525-530.
- Bazzoni G. and Dejana E.** (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev.* 84 (3):869-901.
- Ben Ze'ev A. and Geiger B.** (1998). Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer. *Curr.Opin.Cell Biol.* 10 (5):629-639.

Bernstein B.W. and Bamburg J.R. (1982). Tropomyosin binding to F-actin protects the F-actin from disassembly by brain actin-depolymerizing factor (ADF). *Cell Motil.* 2 (1):1-8.

Billottet C., Rottiers P., Tatin F., Varon C., Reuzeau E., Maitre J.L., Saltel F., Moreau V. and Genot E. (2008). Regulatory signals for endothelial podosome formation. *Eur.J.Cell Biol.* 87 (8-9):543-554.

Blanchard A., Ohanian V. and Critchley D. (1989). The structure and function of alpha-actinin. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 10 (4):280-289.

Blanchoin L., Pollard T.D and Mullins R.D. (2000). Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr.Biol.* 10 (20):1273-1282.

Blanchoin L. and Pollard T.D. (2002). Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry* 41 (2):597-602.

Bobryshev Y.V., Cherian S.M., Inder S.J., and Lord R.S. (1999). Neovascular expression of VE-cadherin in human atherosclerotic arteries and its relation to intimal inflammation. *Cardiovasc.Res.* 43 (4):1003-1017.

Bompard G. and Caron E. (2004). Regulation of WASP/WAVE proteins: making a long story short. *J.Cell Biol.* 166 (7):957-962.

Bradley W.D., E. Hernandez S., Settleman J., and Koleske A.J. (2006). Integrin signaling through Arg activates p190RhoGAP by promoting its binding to p120RasGAP and recruitment to the membrane. *Mol.Biol.Cell* 17 (11):4827-4836.

Bretschneider T., Diez S., Anderson K., Heuser J., Clarke M., Muller-Taubenberger A., Kohler J. and Gerisch G. (2004). Dynamic actin patterns and Arp2/3 assembly at the substrate-attached surface of motile cells. *Curr.Biol.* 14 (1):1-10.

Broze G.J. Jr. (1995). Tissue factor pathway inhibitor and the current concept of blood coagulation. *Blood Coagul.Fibrinolysis* 6 Suppl 1:S7-13.

Bruzzaniti A., Neff L., Sanjay A., Horne W. C., De Camilli P. and Baron R. (2005). Dynamin forms a Src kinase-sensitive complex with Cbl and regulates podosomes and osteoclast activity. *Mol.Biol.Cell* 16 (7):3301-3313.

Buccione R., Orth J.D. and McNiven M.A. (2004). Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 5 (8):647-657.

Burgstaller G. and Gimona M. Podosome-mediated matrix resorption and cell motility in vascular smooth muscle cells. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 288 (6):H3001-H3005, 2005.

Burns S., Thrasher A.J., Blundell M. P., Machesky L. and Jones G. E. (2001). Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood* 98 (4):1142-1149.

Butcher E.C. (1991). Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67 (6):1033-1036.

Butkevich E., Hulsmann S., Wenzel D., Shirao T., Duden R., and Majoul I. (2004). Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton. *Curr.Biol.* 14 (8):650-658.

Carlier M.F. and Pantaloni D. (1986). Direct evidence for ADP-Pi-F-actin as the major intermediate in ATP-actin polymerization. Rate of dissociation of Pi from actin filaments. *Biochemistry* 25 (24):7789-7792.

Carlier M.F., Pantaloni D. and Korn E.D. (1987). The mechanisms of ATP hydrolysis accompanying the polymerization of Mg-actin and Ca-actin. *J.Biol.Chem.* 262 (7):3052-3059.

Carlier M.F. and Pantaloni, D. (1997). Control of actin dynamics in cell motility. *J.Mol.Biol.* 269 (4):459-467.

Carman C.V., Sage P.T., Sciuto T.E., de la Fuente M.A., Geha R.S., Ochs H.D., Dvorak H.F., Dvorak A.M. and Springer T.A. (2007). Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity.* 26 (6):784-797.

Carmeliet. P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438 (7070):932-936.

Cary L.A., Chang J.F. and Guan J.L. (1996). Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *J.Cell Sci.* 109 (Pt 7):1787-1794.

Cary L.A., Han D.C., Polte T.R., Hanks S.K. and Guan J.L. (1998). Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J.Cell Biol.* 140 (1):211-221.

Cattelino A., Liebner S., Gallini R., Zanetti A., Balconi G., Corsi A., Bianco P., Wolburg H., Moore R., Oreda B., Kemler R. and Dejana E. (2003). The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. *J.Cell Biol.* 162 (6):1111-1122.

Caviston J.P. and Holzbaur E.L. (2006). Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport. *Trends Cell Biol.* 16 (10):530-537.

Chellaiah M.A. (2006). Regulation of podosomes by integrin alphavbeta3 and Rho GTPase-facilitated phosphoinositide signaling. *Eur.J.Cell Biol.* 85 (3-4):311-317.

Chen W.T. (1989). Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. *J.Exp.Zool.* 251 (2):167-185.

Cheresh D.A., Leng J. and Klemke R. L. (1999). Regulation of cell contraction and membrane ruffling by distinct signals in migratory cells. *J.Cell Biol.* 146 (5):1107-1116.

Chrzanowska-Wodnicka M. and Burridge K. (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J.Cell Biol.* 133 (6):1403-1415.

Cobb B.S., Schaller M.D., Leu T.H. and Parsons J.T. (1994). Stable association of pp60src and pp59fyn with the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase, pp125FAK. *Mol.Cell Biol.* 14 (1):147-155.

Corada M., Mariotti M., Thurston G., Smith K., Kunkel R., Brockhaus M., Lampugnani M.G., Martin-Padura I., Stoppacciaro A., Ruco L., McDonald D.M., Ward P.A. and Dejana E. (1999). Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (17):9815-9820.

Coultas L., Chawengsaksophak K. and Rossant J. (2005). Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* 438 (7070):937-945.

Critchley D.R. (2000). Focal adhesions - the cytoskeletal connection. *Curr.Opin.Cell Biol.* 12 (1):133-139.

Crosby C.V., Fleming P.A., Argraves W.S., Corada M., Zanetta L., Dejana E. and Drake C.J. (2005). VE-cadherin is not required for the formation of nascent blood vessels but acts to prevent their disassembly. *Blood* 105 (7):2771-2776.

Dai Z. and Pendergast. A.M. (1995). Abi-2, a novel SH3-containing protein interacts with the c-Abl tyrosine kinase and modulates c-Abl transforming activity. *Genes Dev.* 9 (21):2569-2582.

Dejana E., Corada M. and Lampugnani M.G. (1995). Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J.* 9 (10):910-918.

Dejana E. (2004). Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 5 (4):261-270.

Delaisse J. M., Engsig M.T., Everts V., del Carmen Ovejero M., Ferreras M., Lund L., Vu T.H., Werb Z., Winding B., Lochter A., Karsdal M.A., Troen T., Kirkegaard T., Lenhard T., Heegaard A.M., Neff L., Baron R. and Foged N.T. (2000). Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin.Chim.Acta* 291 (2):223-234.

Destaing O., Saltel F., Geminard J. C., Jurdic P. and Bard F. (2003). Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Mol.Biol.Cell* 14 (2):407-416.

Didry D., Carlier M.F. and Pantaloni D. (1998). Synergy between actin depolymerizing factor/cofilin and profilin in increasing actin filament turnover. *J.Biol.Chem.* 273 (40):25602-25611.

dos Remedios C.G., Chhabra D., Kekic M., Dedova I.V., Tsubakihara M., Berry D.A. and Nosworthy N.J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.* 83 (2):433-473.

Duffy H.S., Delmar M. and Spray D.C. (2002). Formation of the gap junction nexus: binding partners for connexins. *J.Physiol Paris* 96 (3-4):243-249.

Ebnet K., Aurrand-Lions M., Kuhn A., Kiefer F., Butz S., Zander K., Meyer zu Brickwedde M.K., Suzuki A., Imhof B.A., and Vestweber D. (2003) The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity

protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *J.Cell Sci.* 116 (Pt 19):3879-3891.

Edlund M., Lotano M.A. and Otey C.A. (2001). Dynamics of alpha-actinin in focal adhesions and stress fibers visualized with alpha-actinin-green fluorescent protein. *Cell Motil.Cytoskeleton* 48 (3):190-200.

Efimov A., Kharitonov A., Efimova N., Loncarek J., Miller P.M., Andreyeva N., Gleeson P., Galjart N., Maia A.R., McLeod I.X., Yates J.R., III, H. Maiato, A. Khodjakov, A. Akhmanova, and I. Kaverina. (2007). Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Dev.Cell* 12 (6):917-930.

Eghbali B., Kessler J.A., Reid L.M., Roy C. and Spray D.C. (1991). Involvement of gap junctions in tumorigenesis: transfection of tumor cells with connexin 32 cDNA retards growth in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88 (23):10701-10705.

El Husseini A.E., Schnell E., Chetkovich D.M., Nicoll R.A. and Brecht D.S. (2000). PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* 290 (5495):1364-1368.

Etienne-Manneville S. and Hall A. **Rho GTPases in cell biology.** (2002). *Nature* 420 (6916):629-635.

Evans J.G., Correia I., Krasavina O., Watson N. and Matsudaira P. (2003). Macrophage podosomes assemble at the leading lamella by growth and fragmentation. *J.Cell Biol.* 161 (4):697-705.

Evans J. G. and Matsudaira P. (2006). Structure and dynamics of macrophage podosomes (). *Eur.J.Cell Biol.* 85 (3-4):145-149.

Fanning A.S., Ma T.Y., and Anderson J.M. (2002). Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1. *FASEB J.* 16 (13):1835-1837.

Farndale R. W., Sixma J. J., Barnes M. J and de Groot P.G. (2004). The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *J.Thromb.Haemost.* 2 (4):561-573.

Feller S.M. (2001). Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles. *Oncogene* 20 (44):6348-6371.

Folkman J. (2006). Tumor suppression by p53 is mediated in part by the antiangiogenic activity of endostatin and tumstatin. *Sci.STKE.* 2006 (354):e35.

Frasca F., Vigneri P., Vella V., Vigneri R. and Wang J.Y. (2001). Tyrosine kinase inhibitor STI571 enhances thyroid cancer cell motile response to Hepatocyte Growth Factor. *Oncogene* 20 (29):3845-3856.

Fukuyama T., Ogita H., Kawakatsu T., Fukuhara T., Yamada T., Sato T., Shimizu K., Nakamura T., Matsuda M., and Takai Y. (2005). Involvement of the c-Src-Crk-C3G-Rap1 signaling in the nectin-induced activation of Cdc42 and formation of adherens junctions. *J.Biol.Chem.* 280 (1):815-825.

Furie B. and Furie B.C. (1988). The molecular basis of blood coagulation. *Cell* 53 (4):505-518.

Furuse M., Hirase T., Itoh M. Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S. and Tsukita S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J.Cell Biol.* 123 (6 Pt 2):1777-1788.

Gavazzi I., Nermut M. V. and Marchisio P. C. (1989). Ultrastructure and gold-immunolabelling of cell-substratum adhesions (podosomes) in RSV-transformed BHK cells. *J.Cell Sci.* 94 (Pt 1):85-99.

Geiger B., Bershadsky A., Pankov R. and Yamada K.M. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2 (11):793-805.

Geiger J., Nolte C., Butt E., Sage S.O. and Walter U. (1992). Role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in nitrovasodilator inhibition of agonist-evoked calcium elevation in human platelets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89 (3):1031-1035.

Gerisch G., Bretschneider T., Muller-Taubenberger A., Simmeth E., Ecke M., Diez S., and Anderson K. (2004). Mobile actin clusters and traveling waves in cells recovering from actin depolymerization. *Biophys.J.* 87 (5):3493-3503.

Gimbrone M.A. Jr., Nagel T. and Topper J.N. (1997). Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J.Clin.Invest* 99 (8):1809-1813.

Gimbrone M.A. Jr., Topper J.N., Nagel T., Anderson K.R. and Garcia-Cardena G. (2000). Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 902:230-239.

Gimona M., Kaverina I., Resch G. P., Vignat E. and Burgstaller G. (2003). Calponin repeats regulate actin filament stability and formation of podosomes in smooth muscle cells. *Mol.Biol.Cell* 14 (6):2482-2491.

Gimona M. and Buccione R. (2006). Adhesions that mediate invasion. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 38 (11):1875-1892.

Gimona M., Buccione R., Courtneidge S.A., and Linder S. (2008). Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Curr.Opin.Cell Biol.* 20 (2):235-241.

Goldschmidt-Clermont P.J., Machesky L.M., Baldassare J.J. and Pollard T.D. (1990). The actin-binding protein profilin binds to PIP2 and inhibits its hydrolysis by phospholipase C. *Science* 247 (4950):1575-1578.

Govek E.E., Newey S.E., Akerman C.J., Cross J.R., Van der Veken L. and Van Aelst L. (2004). The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat.Neurosci.* 7 (4):364-372.

Lampugnani M. Grazia, A. Zanetti, M. Corada, T. Takahashi, G. Balconi, F. Breviario, F. Orsenigo, A. Cattelino, R. Kemler, T. O. Daniel, and E. Dejana. (2003). Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J.Cell Biol.* 161 (4):793-804.

- Le T.L., Yap A.S. and Stow J.L.** (1999). Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *J.Cell Biol.* 146 (1):219-232.
- Grevingoed E.E., Loureiro J.J., Jesse T.L. and Peifer M.** (2001). Abelson kinase regulates epithelial morphogenesis in *Drosophila*. *J.Cell Biol.* 155 (7):1185-1198.
- Gros D.B. and Jongsma H.J.** (1996). Connexins in mammalian heart function. *Bioessays* 18 (9):719-730.
- Gross S.S. and Wolin M.S.** (1995). Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu.Rev.Physiol* 57:737-769.
- Gupton S.L. and Waterman-Storer C.M.** (2006). Spatiotemporal feedback between actomyosin and focal-adhesion systems optimizes rapid cell migration. *Cell* 125 (7):1361-1374.
- Hall A.** (2005). Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem.Soc.Trans.* 33 (Pt 5):891-895.
- Harigaya Y., Shoji M., Shirao T., and Hirai S.** (1996). Disappearance of actin-binding protein, drebrin, from hippocampal synapses in Alzheimer's disease. *J.Neurosci.Res.* 43 (1):87-92.
- Harris K.M. and Kater S.B.** (1994). Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu.Rev.Neurosci.* 17:341-371.
- Hatanpaa K., Isaacs K.R., Shirao T., Brady D.R., and Rapoport S.I.** (1999). Loss of proteins regulating synaptic plasticity in normal aging of the human brain and in Alzheimer disease. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 58 (6):637-643.
- Hayashi K., Ishikawa R., Ye L.H., He X.L., Takata K., Kohama K., and Shirao T.** (1996). Modulatory role of drebrin on the cytoskeleton within dendritic spines in the rat cerebral cortex. *J.Neurosci.* 16 (22):7161-7170.
- Hayashi K. and Shirao T.** (1999). Change in the shape of dendritic spines caused by over-expression of drebrin in cultured cortical neurons. *J.Neurosci.* 19 (10):3918-3925.
- Hernandez, S.E. Settleman J. and Koleske A.J.** (2004). Adhesion-dependent regulation of p190RhoGAP in the developing brain by the Abl-related gene tyrosine kinase. *Curr.Biol.* 14 (8):691-696.
- Hillen F. and Griffioen A.W.** (2007). Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* 26 (3-4):489-502.
- Hirose M., Ishizaki T., Watanabe N., Uehata M., Kranenburg O., Moolenaar W. H., Matsumura F., Maekawa M., Bito H. and Narumiya S.** (1998). Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells. *J.Cell Biol.* 141 (7):1625-1636.
- Hotz-Wagenblatt A. and Shalloway D.** (1993). Gap junctional communication and neoplastic transformation. *Crit Rev.Oncog.* 4 (5):541-558.

Huo Y. and Ley K.F. (2004). Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc.Med.* 14 (1):18-22.

Ilan N., Cheung L., Pinter E. and Madri J.A. (2000). 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.* 275 (28):21435-21443.

Ishikawa R., Yamashiro S. and Matsumura F. (1989b). Differential modulation of actin-severing activity of gelsolin by multiple isoforms of cultured rat cell tropomyosin. Potentiation of protective ability of tropomyosins by 83-kDa nonmuscle caldesmon. *J.Biol.Chem.* 264 (13):7490-7497.

Ishikawa R., Yamashiro S. and Matsumura F. (1989a). Annealing of gelsolin-severed actin fragments by tropomyosin in the presence of Ca²⁺. Potentiation of the annealing process by caldesmon. *J.Biol.Chem.* 264 (28):16764-16770.

Ishikawa R., Hayashi K., Shirao T., Xue Y., Takagi T., Sasaki Y. and Kohama K. (1994). Drebrin, a development-associated brain protein from rat embryo, causes the dissociation of tropomyosin from actin filaments. *J.Biol.Chem.* 269 (47):29928-29933.

Itoh M., Nagafuchi A., Moroi S. and Tsukita S. (1997). Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J.Cell Biol.* 138 (1):181-192.

Jackson D.E., Kupcho K.R. and Newman P.J. (1997). Characterization of phosphotyrosine binding motifs in the cytoplasmic domain of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) that are required for the cellular association and activation of the protein-tyrosine phosphatase, SHP-2. *J.Biol.Chem.* 272 (40):24868-24875.

Jaffe A.B. and Hall A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 21:247-269.

Jay P.Y., Pham P.A., Wong S. A. and Elson E. L. (1995). A mechanical function of myosin II in cell motility. *J.Cell Sci.* 108 (Pt 1):387-393.

Jin H. and Wang J.Y. (2007). Abl tyrosine kinase promotes dorsal ruffles but restrains lamellipodia extension during cell spreading on fibronectin. *Mol.Biol.Cell* 18 (10):4143-4154.

Jockusch B. M., Bubeck P., Giehl K., Kroemker M, Moschner J., Rothkegel M., Rüdiger M., Schluter K., Stanke G. and Winkler J. (1995). The molecular architecture of focal adhesions. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 11:379-416.

John S. and Schmieder R.E. (2003). Potential mechanisms of impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia. *Curr.Hypertens.Rep.* 5 (3):199-207.

Jurdic P., Saltel F., Chabadel A., and Destaing O. (2006). Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. *Eur.J.Cell Biol.* 85 (3-4):195-202.

Kabsch W. and Vandekerckhove J. (1992). Structure and function of actin. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 21:49-76.

Kain K.H. and Klemke R.L. (2001). Inhibition of cell migration by Abl family tyrosine kinases through uncoupling of Crk-CAS complexes. *J.Biol.Chem.* 276 (19):16185-16192.

Karamysheva A.F. (2008). Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc.)* 73 (7):751-762.

Kawakatsu T., Ogita H., Fukuhara T., Fukuyama T., Minami Y., Shimizu K., and Takai Y. (2005). Vav2 as a Rac-GDP/GTP exchange factor responsible for the nectin-induced, c-Src- and Cdc42-mediated activation of Rac. *J.Biol.Chem.* 280 (6):4940-4947.

Key N.S., Geng J.G. and Bach R.R. (2007). Tissue factor; from Morawitz to microparticles. *Trans.Am.Clin.Climatol.Assoc.* 118:165-173.

Kheir W.A., Gevrey J.C., Yamaguchi H., Isaac B. and Cox D. (2005). A WAVE2-Abi1 complex mediates CSF-1-induced F-actin-rich membrane protrusions and migration in macrophages. *J.Cell Sci.* 118 (Pt 22):5369-5379.

Kim S. and Coulombe P.A. (2007). Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev.* 21 (13):1581-1597.

Klemke R.L., Leng J., Molander R., Brooks P.C., Vuori K., and Cheresch. D.A. (1998) CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. *J.Cell Biol.* 140 (4):961-972.

Koesling D., Mullershausen F., Lange A., Friebe A., Mergia E., Wagner C. and Russwurm M. (2005). Negative feedback in NO/cGMP signalling. *Biochem.Soc.Trans.* 33 (Pt 5):1119-1122.

Kojima N., Shirao T. and Obata K. (1993). Molecular cloning of a developmentally regulated brain protein, chicken drebrin A and its expression by alternative splicing of the drebrin gene. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 19 (1-2):101-114.

Koleske A.J., Gifford A.M., Scott M. L., Nee M., Bronson R.T., Miczek K.A., and Baltimore D. (1998). Essential roles for the Abl and Arg tyrosine kinases in neurulation. *Neuron* 21 (6):1259-1272.

Kopp P., Lammers R., Aepfelbacher M., Woehlke G., Rudel T., Machuy N., Steffen W., and Linder S. (2006). The kinesin KIF1C and microtubule plus ends regulate podosome dynamics in macrophages. *Mol.Biol.Cell* 17 (6):2811-2823.

Korn E.D., Carlier M.F., and Pantaloni D. (1987). Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science* 238 (4827):638-644.

Kuhn J.R. and Pollard T.D. (2005). Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophys.J.* 88 (2):1387-1402,.

Lamprecht R., Farb C.R. and LeDoux J.E. (2002). Fear memory formation involves p190 RhoGAP and ROCK proteins through a GRB2-mediated complex. *Neuron* 36 (4):727-738.

Lampugnani M.G., Corada M., Caveda L., Breviario F., Ayalon O., Geiger B., and Dejana E. (1995). The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differen-

tial association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J.Cell Biol.* 129 (1):203-217.

Lampugnani M. G., Corada M., Andriopoulou P., Esser S., Risau W., and Dejana E. (1997). Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells. *J.Cell Sci.* 110 (Pt 17):2065-2077.

Lauffenburger D.A. and Horwitz A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84 (3):359-369,.

Le Clainche C. and Carlier M.F. (2008). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev.* 88 (2):489-513.

Lee T., Winter C., Marticke S.S., Lee A. and Luo L. (2000). Essential roles of Drosophila RhoA in the regulation of neuroblast proliferation and dendritic but not axonal morphogenesis. *Neuron* 25 (2):307-316.

Lefer A.M. and Lefer D.J. (1996). The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc.Res.* 32 (4):743-751.

Lehto V. P., Hovi T., Vartio T., Badley R. A., and Virtanen I. (1982). Reorganization of cytoskeletal and contractile elements during transition of human monocytes into adherent macrophages. *Lab Invest* 47 (4):391-399.

Leng Y., Zhang J., Badour K., Arpai E.a, Freeman S., Cheung P., Siu M. and Simionovitch K. (2005). Abelson-interactor-1 promotes WAVE2 membrane translocation and Abelson-mediated tyrosine phosphorylation required for WAVE2 activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102 (4):1098-1103.

Li Z., van Aelst L. and Cline H. T. (2000). Rho GTPases regulate distinct aspects of dendritic arbor growth in *Xenopus* central neurons in vivo. *Nat.Neurosci.* 3 (3):217-225.

Li Z., Aizenman C.D. and Cline H. T. (2002). Regulation of rho GTPases by crosstalk and neuronal activity in vivo. *Neuron* 33 (5):741-750.

Linder S., Nelson D., Weiss M. and Aepfelbacher M. (1999). Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (17):9648-9653.

Linder S., Hufner K., Wintergerst U. and Aepfelbacher M. (2000). Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *J.Cell Sci.* 113 Pt 23:4165-4176.

Linder S. and Aepfelbacher M. (2003.). Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol.* 13 (7):376-385.

Linder S. and Kopp P. (2005). Podosomes at a glance. *J.Cell Sci.* 118 (Pt 10):2079-2082.

Linder S. (2007). The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol.* 17 (3):107-117.

Majoul I., Shirao T., Sekino Y. and Duden R. (2007). Many faces of drebrin: from building dendritic spines and stabilizing gap junctions to shaping neurite-like cell processes. *Histochem.Cell Biol.* 127 (4):355-361.

Mammoto A., Sasaki, T., Asakura T., Hotta I., Imamura H., Takahashi K., Matsuura Y., T.Shirao and Takai Y. (1998). Interactions of drebrin and gephyrin with profilin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 243 (1):86-89.

Mandai K., Nakanishi H., Satoh A., Obaishi H., Wada M., Nishioka H., Itoh M., Mizoguchi A., Aoki T., Fujimoto T., Matsuda Y., Tsukita S. and Takai Y. (1997). Afadin: A novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adherens junction. *J.Cell Biol.* 139 (2):517-528.

Marchisio P.C., Cirillo D., Naldini L., Primavera M.V., Teti A. and Zambonin-Zallone A. (1984). Cell-substratum interaction of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures. *J.Cell Biol.* 99 (5):1696-1705.

Marchisio P.C., Cirillo D., Teti A., Zambonin-Zallone A., and Tarone G. (1987). Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts and cells of monocytic origin display a peculiar dot-like organization of cytoskeletal proteins involved in microfilament-membrane interactions. *Exp.Cell Res.* 169 (1):202-214.

Marjanovic J.A., Li Z., Stojanovic A. and Du X. (2005). Stimulatory roles of nitric-oxide synthase 3 and guanylyl cyclase in platelet activation. *J.Biol.Chem.* 280 (45):37430-37438.

Matsumura T., Wolff K. and Petzelbauer P. (1997). Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5 and CD31 interactions with filamentous actin. *J.Immunol.* 158 (7):3408-3416.

McGregor A., Blanchard A.D., Rowe A.J. and Critchley D.R. (1994). Identification of the vinculin-binding site in the cytoskeletal protein alpha-actinin. *Biochem.J.* 301 (Pt 1):225-233.

Melki R., Fievez S. and Carlier M.F. (1996). Continuous monitoring of Pi release following nucleotide hydrolysis in actin or tubulin assembly using 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine ribonucleoside and purine-nucleoside phosphorylase as an enzyme-linked assay. *Biochemistry* 35 (37):12038-12045.

Michel C.C. and Curry F.E. (1999). Microvascular permeability. *Physiol Rev.* 79 (3):703-761.

Michel J.B., Thauinat O., Houard X., Meilhac O., Caligiuri G., and Nicoletti A. (2007). Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 27 (6):1259-1268.

Miliot I.N., Bermudez-Fajardo A., Penichet M.L. and Oviedo-Orta E. (2008). Antigen-induced immunomodulation in the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin.Dev.Immunol.* 2008:723539.

Miller A.L., Wang Y., Mooseker M.S., and Koleske A.J. (2004). The Abl-related gene (Arg) requires its F-actin-microtubule cross-linking activity to regulate lamellipodial dynamics during fibroblast adhesion. *J.Cell Biol.* 165 (3):407-419.

Mitchison T.J. and Cramer L.P. (1996). Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84 (3):371-379.

Mizoguchi A., Nakanishi H., Kimura K., Matsubara K., Ozaki-Kuroda K., Katata T., Honda T., Kiyohara Y., Heo K., Higashi M., Tsutsumi T., Sonoda S., Ide C. and Takai Y. (2002). Nectin: an adhesion molecule involved in formation of synapses. *J. Cell Biol.* 156 (3):555-565.

Mizui T., Takahashi H., Sekino Y. and Shirao T. (2005). Overexpression of drebrin A in immature neurons induces the accumulation of F-actin and PSD-95 into dendritic filopodia, and the formation of large abnormal protrusions. *Mol. Cell Neurosci.* 30 (4):630-638.

Mizutani K., Miki H., He H., Maruta H. and Takenawa T. (2002). Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer Res.* 62 (3):669-674.

Moreau V., Tatin F., Varon C. and Genot E. (2003). Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol. Cell Biol.* 23 (19):6809-6822.

Moresco E.M. and Koleske A. J. (2003). Regulation of neuronal morphogenesis and synaptic function by Abl family kinases. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13 (5):535-544.

Moresco E.M., Donaldson S., Williamson A. and Koleske A.J. (2005). Integrin-mediated dendrite branch maintenance requires Abelson (Abl) family kinases. *J. Neurosci.* 25 (26):6105-6118.

Morita K., Furuse M., Fujimoto K. and Tsukita S. (1999). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96 (2):511-516.

Muro S., Koval M. and Muzykantov V. (2004). Endothelial endocytic pathways: gates for vascular drug delivery. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2 (3):281-299.

Navarro P., Ruco L. and Dejana E. (1998). Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization. *J. Cell Biol.* 140 (6):1475-1484.

Newman P.J. (1997). The biology of PECAM-1. *J. Clin. Invest* 99 (1):3-8.

Newman P.J. (1999). Switched at birth: a new family for PECAM-1. *J. Clin. Invest* 103 (1):5-9.

Niessen C.M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J. Invest Dermatol.* 127 (11):2525-2532.

Nishida E. (1985). Opposite effects of cofilin and profilin from porcine brain on rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry* 24 (5):1160-1164.

Nishioka H., Mizoguchi A., Nakanishi H., Mandai K., Takahashi K., Kimura K., Satoh-Moriya A. and Takai Y. (2000). Localization of I-afadin at puncta adhaerentia-like

junctions between the mossy fiber terminals and the dendritic trunks of pyramidal cells in the adult mouse hippocampus. *J.Comp Neurol.* 424 (2):297-306.

Nolen B.J. and Pollard T.D. (2008). Structure and biochemical properties of fission yeast Arp2/3 complex lacking the Arp2 subunit. *J.Biol.Chem.* 283 (39):26490-26498.

Ohm T. and Wegner A. (1994). Mechanism of ATP hydrolysis by polymeric actin. *Biochim.Biophys.Acta* 1208 (1):8-14.

Osiak A.E., Zenner G. and Linder S. (2005). Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Exp.Cell Res.* 307 (2):342-353.

Osiak A.E. (2007). Charakterisierung podosomaler Adhäsionsstrukturen in primären humanen Nabelschnurendothelzellen. Dissertation.

Pappin D.J., Hojrup P. and Bleasby A.J (1993). Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr.Biol.* 3 (6):327-332.

Pardridge W.M. (2005). Molecular biology of the blood-brain barrier. *Mol.Biotechnol.* 30 (1):57-70.

Pawson T. and Gish G.D. (1992). SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* 71 (3):359-362.

Peacock J.G., Miller A.L., Bradley W.D., Rodriguez O.C., Webb D.J. and Koleske A.J. (2007). The Abl-related gene tyrosine kinase acts through p190RhoGAP to inhibit actomyosin contractility and regulate focal adhesion dynamics upon adhesion to fibronectin. *Mol.Biol.Cell* 18 (10):3860-3872.

Peitsch W.K., Grund C., Kuhn C., Schnolzer M., Spring H., Schmelz M. and Franke W.W. (1999). Drebrin is a widespread actin-associating protein enriched at junctional plaques, defining a specific microfilament anchorage system in polar epithelial cells. *Eur.J.Cell Biol.* 78 (11):767-778.

Peitsch W.K., Hofmann I., Pratzel S., Grund C., Kuhn C., Moll I., Langbein L. and Franke W.W. (2001). Drebrin particles: components in the ensemble of proteins regulating actin dynamics of lamellipodia and filopodia. *Eur.J.Cell Biol.* 80 (9):567-579.

Peitsch W.K., Bulkescher J., Spring H., Hofmann I., Goerdts S. and Franke W.W. (2006). Dynamics of the actin-binding protein drebrin in motile cells and definition of a juxtannuclear drebrin-enriched zone. *Exp.Cell Res.* 312 (13):2605-2618.

Pieper U. and Wegner A. (1996). The end of a polymerizing actin filament contains numerous ATP-subunit segments that are disconnected by ADP-subunits resulting from ATP hydrolysis. *Biochemistry* 35 (14):4396-4402.

Plattner R., Irvin B.J., Guo S., Blackburn K., Kazlauskas A., Abraham R.T., York J.D., and Pendergast A.M. (2003). A new link between the c-Abl tyrosine kinase and phosphoinositide signalling through PLC-gamma1. *Nat.Cell Biol.* 5 (4):309-319.

Plattner R. and Pendergast. A.M. (2003). Activation and signaling of the Abl tyrosine kinase: bidirectional link with phosphoinositide signaling. *Cell Cycle* 2 (4):273-274.

Pollard T.D. (1986). Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J.Cell Biol.* 103 (6 Pt 2):2747-2754.

Pollard T.D., Blanchoin L., and Mullins R.D. (2001). Actin dynamics. *J.Cell Sci.* 114 (Pt 1):3-4.

Pollard T.D. and Borisy G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112 (4):453-465.

Pollard T.D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 36:451-477.

Polte T.R. and Hanks S.K. (1995). Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92 (23):10678-10682.

Ponti A., Machacek M., Gupton S.L., Waterman-Storer C.M., and Danuser G. (2004). Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science* 305 (5691):1782-1786.

Prochnow N. and Dermietzel R. (2008). Connexons and cell adhesion: a romantic phase. *Histochem.Cell Biol.* 130 (1):71-77.

Radomski M.W. and Moncada S. (1993). Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. *Thromb.Haemost.* 70 (1):36-41.

Raftopoulou M. and Hall A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev.Biol.* 265 (1):23-32.

Rees D.D., Palmer R.M., Schulz R., Hodson H. F. and Moncada S. (1990). Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br.J.Pharmacol.* 101 (3):746-752.

Ridley A. J. and Hall A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70 (3):389-399.

Ridley A.J. (1995). Microinjection of Rho and Rac into quiescent Swiss 3T3 cells. *Methods Enzymol.* 256:313-320.

Ridley A.J. (2001). Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* 11 (12):471-477.

Ridley A. J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol.* 16 (10):522-529.

Riento K. and Ridley A.J. (2003). Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 4 (6):446-456.

Ross J. Jr. (1999). Regional myocardial function and microvascular dysfunction. Does the alternate cascade represent ischemia? *Cardiologia* 44 (9):797-799.

Rostgaard J. and Qvortrup K. (1997). Electron microscopic demonstrations of filamentous molecular sieve plugs in capillary fenestrae. *Microvasc.Res.* 53 (1):1-13.

Rostgaard J. and Qvortrup K. (2002). Sieve plugs in fenestrae of glomerular capillaries--site of the filtration barrier? *Cells Tissues.Organs* 170 (2-3):132-138.

Rouiller I., Xu X.P., Amann K.J., Egile C., Nickell S., Nicastro D., Li R., Pollard T. D., Volkmann N., and Hanein D. (2008). The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J.Cell Biol.* 180 (5):887-895.

Rubin L.L. and J. Staddon M. (1999). The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu.Rev.Neurosci.* 22:11-28.

Ruchhoeft M.L., Ohnuma S., McNeill L., Holt C. E. and Harris W.A. (1999). The neuronal architecture of *Xenopus* retinal ganglion cells is sculpted by rho-family GTPases in vivo. *J.Neurosci.* 19 (19):8454-8463.

Russwurm M., Wittau N. and Koesling D. (2001). Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J.Biol.Chem.* 276 (48):44647-44652.

Saitou M., Fujimoto K., Doi Y., Itoh M., Fujimoto T., Furuse M., Takano H., Noda T., and Tsukita S. (1998). Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J.Cell Biol.* 141 (2):397-408.

Saltel F., Destaing O., Bard F., Eichert D. and Jurdic P. (2004). Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts. *Mol.Biol.Cell* 15 (12):5231-5241.

Sander E.E., ten Klooster J.P., van Delft S., van der Kammen R.A. and Collard J.G. (1999). Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J.Cell Biol.* 147 (5):1009-1022.

Da Silva Santos, Schubert V., and Dotti C.G. (2004). RhoA, Rac1, and cdc42 intracellular distribution shift during hippocampal neuron development. *Mol.Cell Neurosci.* 27 (1):1-7.

Sasaki Y., Hayashi K., Shirao T., Ishikawa R. and Kohama K. (1996). Inhibition by drebrin of the actin-bundling activity of brain fascin, a protein localized in filopodia of growth cones. *J.Neurochem.* 66 (3):980-988.

Sato T., del Carmen Ovejero M., Hou P., Heegaard A.M., Kumegawa M., Foged N.T., and Delaisse J.M. (1997). Identification of the membrane-type matrix metalloproteinase MT1-MMP in osteoclasts. *J.Cell Sci.* 110 (Pt 5):589-596.

Sato T., Fujita N., Yamada A., Ooshio T., Okamoto R., Irie K. and Takai Y. (2006). Regulation of the assembly and adhesion activity of E-cadherin by nectin and afadin for the formation of adherens junctions in Madin-Darby canine kidney cells. *J.Biol.Chem.* 281 (8):5288-5299.

Schneeberger E.E. and Lynch R.D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 286 (6):C1213-C1228.

Sekino Y., Kojima N. and Shirao T. (2007). Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochem.Int.* 51 (2-4):92-104.

Sfakianos M.K., Eisman A., Gourley S.L., Bradley W.D., Scheetz A.J., Settleman J., Taylor J.R., Greer C.A., Williamson A. and Koleske A.J. (2007). Inhibition of Rho via Arg and p190RhoGAP in the postnatal mouse hippocampus regulates dendritic spine maturation, synapse and dendrite stability, and behavior. *J.Neurosci.* 27 (41):10982-10992.

Shaw R.M. and Rudy Y. (1997). Ionic mechanisms of propagation in cardiac tissue. Roles of the sodium and L-type calcium currents during reduced excitability and decreased gap junction coupling. *Circ.Res.* 81 (5):727-741.

Shay-Salit A., Shushy M., Wolfovitz E., Yahav H., Breviario F., Dejana, E. and Resnick N. (2002). VEGF receptor 2 and the adherens junction as a mechanical transducer in vascular endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99 (14):9462-9467.

Shewan A.M., Maddugoda M., Kraemer A., Stehbens S.J., Verma S., Kovacs E.M. and Yap A.S. (2005). Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *Mol.Biol.Cell* 16 (10):4531-4542.

Shibuya M. (2008). Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB.Rep.* 41 (4):278-286.

Shim K.S. and Lubec G. (2002) Drebrin, a dendritic spine protein, is manifold decreased in brains of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neurosci.Lett.* 324 (3):209-212.

Shima D.T., Adamis A.P., Ferrara N., Yeo K.T., Yeo T.K., Allende R., Folkman J. and D'Amore P.A. (1995). Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen. *Mol.Med.* 1 (2):182-193.

Shimizu K. and Takai Y. (2003). Roles of the intercellular adhesion molecule nectin in intracellular signaling. *J.Biochem.* 134 (5):631-636.

Shirao T. and Obata K. (1985). Two acidic proteins associated with brain development in chick embryo. *J.Neurochem.* 44 (4):1210-1216.

Shirao T. and Obata K. (1986). Immunochemical homology of 3 developmentally regulated brain proteins and their developmental change in neuronal distribution. *Brain Res.* 394 (2):233-244.

Shirao T., Inoue H.K., Kano Y. and Obata K. (1987). Localization of a developmentally regulated neuron-specific protein S54 in dendrites as revealed by immunoelectron microscopy. *Brain Res.* 413 (2):374-378.

Shirao T., Kojima N., Terada S. and Obata K. (1990). Expression of three drebrin isoforms in the developing nervous system. *Neurosci.Res.Suppl* 13:S106-S111.

- Shirao T., Kojima N., and Obata K.** (1992). Cloning of drebrin A and induction of neurite-like processes in drebrin-transfected cells. *Neuroreport* 3 (1):109-112.
- Shirao T., Hayashi K., Ishikawa R., Isa K., Asada H., Ikeda K. and Uyemura K.** (1994). Formation of thick, curving bundles of actin by drebrin A expressed in fibroblasts. *Exp.Cell Res.* 215 (1):145-153.
- Sixma J.J., van Zanten G.H., Huizinga E.G., van der Plas R.M., Verkley M., Wu Y.P., Gros, P. and de Groot P.G.** (1997). Platelet adhesion to collagen: an update. *Thromb.Haemost.* 78 (1):434-438.
- Soderling S.H. and Scott J.D.** (2006). WAVE signalling: from biochemistry to biology. *Biochem.Soc.Trans.* 34 (Pt 1):73-76.
- Somlyo A.V., Bradshaw D., Ramos S., Murphy C., Myers C.E. and Somlyo A.P.** (2000). Rho-kinase inhibitor retards migration and in vivo dissemination of human prostate cancer cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 269 (3):652-659.
- Songyang Z., Fanning A.S., Fu C., Xu J., Marfatia S.M., Chishti A.H., Crompton A., Chan A.C., Anderson J.M. and Cantley L.C.** (1997). Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275 (5296):73-77.
- Soriano F.G., Pacher P., Mabley J., Liaudet L. and Szabo C.** (2001). Rapid reversal of the diabetic endothelial dysfunction by pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase. *Circ.Res.* 89 (8):684-691.
- Springer T.A.** (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76 (2):301-314.
- Stan R.V.** (2007). Endothelial stomatal and fenestral diaphragms in normal vessels and angiogenesis. *J.Cell Mol.Med.* 11 (4):621-643.
- Stradal T.E., Rottner K., Disanza A., Confalonieri S., Innocenti M. and Scita G.** (2004) Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol.* 14 (6):303-311.
- Stuart J.R., Gonzalez F.H., Kawai H. and Yuan Z.M.** (2006) c-Abl interacts with the WAVE2 signaling complex to induce membrane ruffling and cell spreading. *J.Biol.Chem.* 281 (42):31290-31297.
- Stuehr D.J. and Griffith O.W.** (1992) Mammalian nitric oxide synthases. *Adv.Enzymol.Relat Areas Mol.Biol.* 65:287-346.
- Stuehr D.J.** (1999). Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim.Biophys.Acta* 1411 (2-3):217-230.
- Sun C.X., Magalhaes M.A. and Glogauer M.** (2007). Rac1 and Rac2 differentially regulate actin free barbed end formation downstream of the fMLP receptor. *J.Cell Biol.* 179 (2):239-245.

Takahashi H., Sekino Y., Tanaka S., Mizui T., Kishi S., and Shirao T. (2003). Drebrin-dependent actin clustering in dendritic filopodia governs synaptic targeting of postsynaptic density-95 and dendritic spine morphogenesis. *J.Neurosci.* 23 (16):6586-6595.

Takahashi H., Mizui T. and Shirao T. (2006). Down-regulation of drebrin A expression suppresses synaptic targeting of NMDA receptors in developing hippocampal neurones. *J.Neurochem.* 97 Suppl 1:110-115.

Takai Y. and Nakanishi H. (2003). Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J.Cell Sci.* 116 (Pt 1):17-27.

Takaishi K., Sasaki T., Kato M., Yamochi W., Kuroda S., Nakamura T., Takeichi M., and Takai Y. (1994). Involvement of Rho p21 small GTP-binding protein and its regulator in the HGF-induced cell motility. *Oncogene* 9 (1):273-279.

Takenawa T. and Miki H. (2001). WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J.Cell Sci.* 114 (Pt 10):1801-1809.

Tanaka S., Hattori S., Kurata T., Nagashima K., Fukui Y., Nakamura S. and Matsuda M. (1993). Both the SH2 and SH3 domains of human CRK protein are required for neuronal differentiation of PC12 cells. *Mol.Cell Biol.* 13 (7):4409-4415.

Tarone G., Cirillo D., Giancotti F.G., Comoglio P.M. and Marchisio P.C. (1985). Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp.Cell Res.* 159 (1):141-157.

Tatin F., Varon C., Genot E., and Moreau V. (2006). A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol ester. *J.Cell Sci.* 119 (Pt 4):769-781.

Teti A., Colucci S., Grano M., Argentino L. and Zambonin Zallone A. (1992). Protein kinase C affects microfilaments, bone resorption, and $[Ca^{2+}]_o$ sensing in cultured osteoclasts. *Am.J.Physiol* 263 (1 Pt 1):C130-C139.

Thomas C.M. and Smart E.J. (2008). Caveolae structure and function. *J.Cell Mol.Med.* 12 (3):796-809.

Tirziu D. and Simons M. (2005). Angiogenesis in the human heart: gene and cell therapy. *Angiogenesis.* 8 (3):241-251.

Toda N. and Okamura T. (2003). The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels. *Pharmacol.Rev.* 55 (2):271-324.

Topper J.N. and Gimbrone M.A. Jr. (1999). Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Mol.Med.Today* 5 (1):40-46.

Trotter J.A. (1981). The organization of actin in spreading macrophages. The actin-cytoskeleton of peritoneal macrophages is linked to the substratum via transmembrane connections. *Exp.Cell Res.* 132 (2):235-248.

Ussar S., Wang H.V., Linder S., Fassler R. and Moser M. (2006). The Kindlins: subcellular localization and expression during murine development. *Exp.Cell Res.* 312 (16):3142-3151.

Van Troys M., Huyck L., Leyman S., Dhaese S., Vandekerckhove J. and Ampe C. (2008). Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur.J.Cell Biol.* 87 (8-9):649-667.

Varon C., Tatin F., Moreau V., Obberghen-Schilling E., Fernandez-Sauze S., Reuzeau E., Kramer I. and Genot E. (2006). Transforming growth factor beta induces rosettes of podosomes in primary aortic endothelial cells. *Mol.Cell Biol.* 26 (9):3582-3594.

Vicker M.G. (2002). Eukaryotic cell locomotion depends on the propagation of self-organized reaction-diffusion waves and oscillations of actin filament assembly. *Exp.Cell Res.* 275 (1):54-66.

Vincent P.A., Xiao K., Buckley K.M. and Kowalczyk A.P. (2004). VE-cadherin: adhesion at arm's length. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 286 (5):C987-C997.

Vlemminckx K. and Kemler R. (1999). Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling. *Bioessays* 21 (3):211-220.

Watabe-Uchida M., Uchida N., Imamura Y., Nagafuchi A., Fujimoto K., Uemura T., Vermeulen S., van Roy F., Adamson E.D. and Takeichi M. (1998). alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J.Cell Biol.* 142 (3):847-857.

Wear M.A. and Cooper J.A. (2004). Capping protein: new insights into mechanism and regulation. *Trends Biochem.Sci.* 29 (8):418-428.

Webb D.J., Donais K., Whitmore L.A., Thomas S.M., Turner C.E., Parsons J.T. and Horwitz A.F. (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat.Cell Biol.* 6 (2):154-161.

Wegner A. and Isenberg G. (1983). 12-fold difference between the critical monomer concentrations of the two ends of actin filaments in physiological salt conditions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 80 (16):4922-4925.

Weiner O.D., Marganski W.A., Wu L.F., Altschuler S.J. and Kirschner M.W. (2007). An actin-based wave generator organizes cell motility. *PLoS.Biol.* 5 (9):e221.

Weisel J.W. (2005). Fibrinogen and fibrin. *Adv.Protein Chem.* 70:247-299.

Welch M.D. and Mullins R.D. (2002). Cellular control of actin nucleation. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 18:247-288.

Wisse E. (1970). An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J.Ultrastruct.Res.* 31 (1):125-150.

Wohner N. (2008). Role of cellular elements in thrombus formation and dissolution. *Cardiovasc.Hematol.Agents Med.Chem.* 6 (3):224-228,

Wolberg A.S. and Campbell R.A. (2008). Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. *Transfus.Apher.Sci.* 38 (1):15-23.

H. Wolburg and A. Lippoldt. (2002). Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul.Pharmacol.* 38 (6):323-337.

Woodring P.J., Litwack E.D., O'Leary D.D., Lucero G.R., Wang J.Y. and Hunter T. (2002). Modulation of the F-actin cytoskeleton by c-Abl tyrosine kinase in cell spreading and neurite extension. *J.Cell Biol.* 156 (5):879-892.

Woodring P.J., Meisenhelder J., Johnson S.A., Zhou G.L., Field J., Shah K., Bladt F., Pawson T., Niki M., Pandolfi P.P., Wang J.Y. and Hunter T. (2004). c-Abl phosphorylates Dok1 to promote filopodia during cell spreading. *J.Cell Biol.* 165 (4):493-503.

Worthylake R.A., Lemoine S., Watson J.M. and Burridge K. (2001). RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J.Cell Biol.* 154 (1):147-160.

Xu W. and Stamnes M. (2006). The actin-depolymerizing factor homology and charged/helical domains of drebrin and mAbp1 direct membrane binding and localization via distinct interactions with actin. *J.Biol.Chem.* 281 (17):11826-11833.

Yamada S., Pokutta S., Drees F., Weis W.I. and Nelson W.J. (2005). Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* 123 (5):889-901.

Yamaguchi H., Pixley F. and Condeelis J. (2006). Invadopodia and podosomes in tumor invasion. *Eur.J.Cell Biol.* 85 (3-4):213-218.

Xiao K., Allison D.F., Kottke M.D., Summers S., Sorescu G.P., Faundez V. and A.P. Kowalczyk. (2003). Mechanisms of VE-cadherin processing and degradation in microvascular endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 278 (21):19199-19208.

Zabel U., Kleinschnitz C., Oh P, Nedvetsky P., Smolenski A., Muller H., Kronich P., Kugler P., Walter U., Schnitzer J.E. and Schmidt H.H. (2002). Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. *Nat.Cell Biol.* 4 (4):307-311.

Zambonin-Zallone A., Teti A., Grano M., Rubinacci A., Abbadini M, Gaboli M., and Marchisio P.C. (1989). Immunocytochemical distribution of extracellular matrix receptors in human osteoclasts: a beta 3 integrin is colocalized with vinculin and talin in the podosomes of osteoclastoma giant cells. *Exp.Cell Res.* 182 (2):645-652.

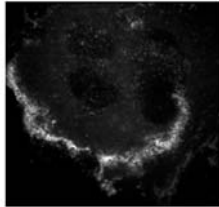
Ziegler W.H., Liddington R.C. and Critchley D.R. (2006). The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol.* 16 (9):453-460.

Zigmond, S.H. (1993). Recent quantitative studies of actin filament turnover during cell locomotion. *Cell Motil.Cytoskeleton* 25 (4):309-316.

7. ANHANG

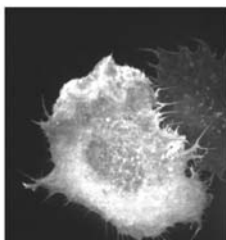
Inhalt der Video-CD:

(empfohlene Ansicht im Windows Media Player)



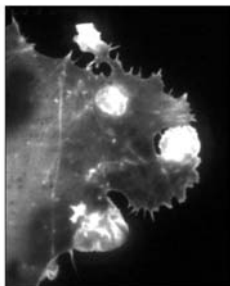
Film 1 (11,5 min): Dynamik von Aktin waves in HUVEC zu Abb. 1.7., Seite 21
mit freundlicher Genehmigung von Dr. S. Linder

Live cell konfokalmikroskopische Aufnahmesequenz primärer humaner Endothelzellen, 16 h nach Transfektion mit Drebrin-GFP.



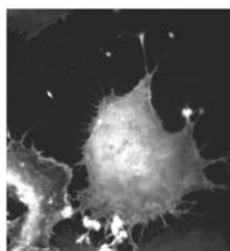
Film 2 (43,1 min): Humane Endothelzelle nach Transfektion mit Drebrin-GFP
zu Abb. 3.10., Seite 56

Live cell konfokalmikroskopische Aufnahmesequenz primärer humaner Endothelzellen, 16 h nach Transfektion mit Drebrin-GFP.



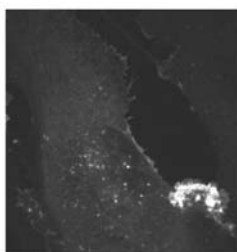
Film 3 (33,8 min): Subzelluläre Lokalisation von CC171-253-GFP in HUVEC
zu Abb. 3.12., Seite 60

Live cell konfokalmikroskopische Aufnahmesequenz primärer humaner Endothelzellen, 16 h nach Transfektion mit Drebrin-CC-171-253-GFP-N1.



Film 4 (21,9 min): Subzelluläre Lokalisation von CC171-263-GFP in HUVEC
zu Abb. 3.13., Seite 61

Live cell konfokalmikroskopische Aufnahmesequenz primärer humaner Endothelzellen, 16 h nach Transfektion mit Drebrin-CC-171-263-GFP-N1



Film 5 (31,9 min): Sukzessive Bildung von Drebrin-reichen Aktin waves und Zellprotrusionen in HUVEC zu Abb. 3.24., Seite 75

Live cell konfokalmikroskopische Aufnahmesequenz von HUVEC, 17 h nach Transfektion mit Drebrin-GFP

8. DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. P.C. Weber für die freundliche Aufnahme in sein Institut und das fortwährende Interesse an meiner Arbeit.

Für die freundliche Bereitschaft, meine Arbeit vor der biologischen Fakultät zu vertreten und das stete Interesse an meiner Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. George Boyan.

Ganz besonders danke ich Herrn PD Dr. Stefan Linder für die Vergabe dieses interessanten Themas und die hervorragende Betreuung, die von großem Verständnis und unendlicher Geduld seinerseits geprägt war.

Ich danke allen Mitgliedern des Instituts für Epidemiologie und Prophylaxe der Kreislaufkrankheiten sowie des Max von Pettenkofer Instituts für die gute Zusammenarbeit.

Mein herzlicher Dank gilt Barbara, für ihren unermüdlichen und ausgezeichneten Einsatz im Labor sowie ihre einzigartige Sicht der Dinge, die mir immer wieder vor Augen geführt hat, worauf es wirklich ankommt. Ohne ihre Fürsorglichkeit wären die Enkeltiere und ich (danke für die Power-Riegel) gewiss verhungert.

Ich danke allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe. Ohne die fortwährende Unterstützung in wissenschaftlicher und freundschaftlicher Hinsicht durch Petra, Susa, Nadja und Chrisy (sowie den konstanten Austausch von Rezepten) wäre meine Arbeit sicher um einiges trostloser verlaufen. Mein besonderer Dank für die kritische und anregende Betrachtung dieser Arbeit sowie das freundschaftliche Verhältnis gilt Petra. Ich bedanke mich auch bei Antje für die Unterstützung und ihre unerschütterliche positive Einstellung und Christian für die endlose Geduld bei allen administrativen und kulinarischen Fragen.

Bei Nada bedanke ich mich herzlich für das großzügige Übersehen meiner Tendenz zur Unordnung sowie der gelegentlichen Streifenbildung durch meine Schuhe.

Ich bedanke mich bei allen, die mir bei der technischen Durchführung meiner Arbeit geholfen haben: Dr. M. Sixt für die professionelle und vor allem zeitlich flexible Durchführung der FACS-Analysen und Dr. Pascal Weinmeister für die fachmännische und höchst unterhaltsame Anleitung beim G-LISA *assay*. Prof. Dr. Michael Schleicher danke ich besonders für die freundliche Zusammenarbeit und die anregenden Gespräche.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen beiden Familien für die emotionale und moralische Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Die Durchführung dieser Arbeit wäre niemals möglich gewesen ohne den liebevollen Rückhalt und das unerschöpfliche Verständnis von Paul, der mir zu jeder Zeit aufopferungsvoll und geduldig zur Seite stand.

9. LEBENSLAUF

Name: Vanessa Margot Johanna van Vliet

Geburtsdatum: 24.11.1979

Geburtsort: Düsseldorf

Schulbildung: 1986-1990 Grundschule
 1990-1999 Staffelsee-Gymnasium Murnau
 1999 Allgemeine Hochschulreife

Studium: Okt. 1999-März 2005 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
 Hauptfach Mikrobiologie; Nebenfächer: Biochemie, Botanik (phys.), Zoologie
 Abschluss: Diplom-Biologin
 Note: 1,2

Sep. 2003-Aug 2004 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Volker Müller am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
 Thema: „Zelluläre Lokalisation von Methyltransferasen und Corrinoidproteinen in *Acetobacterium woodii*“

Promotion: April 2005-Dez. 2008 Doktorarbeit am Institut für Epidemiologie und Prophylaxe der Kreislaufkrankheiten unter Leitung von PD Dr. Stefan Linder und Betreuung durch Prof. Dr. George Boyan
 Thema: „Drebrin, ein Aktin-Bindeprotein, und seine Rolle in der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion in humanen Endothelzellen“

April 2005-Dez. 2006 Mitglied im Graduiertenprogramm 438: „Vaskuläre Biologie in der Medizin“