

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. E. Weihe
Betreuer: Prof. Dr. G. Aumüller

und

Institut für Anatomie und Zellbiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Lehrstuhl II, Vorstand: Prof. Dr. D. Drenckhahn
Betreuer: Prof. Dr. D. Drenckhahn

Untersuchungen zu Wechselwirkungen von VE-Cadherin-Molekülen untereinander und mit TRPC4

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
Judith Katharina Gutberlet
geborene Eifler
aus Frankfurt

Marburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am: 28.11.2006
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch
Referent: Prof. Dr. G. Aumüller
Korreferent: Prof. Dr. D. Drenckhahn

Für meine Familie
meine Eltern Ursula und Hubert Eifler
und meinen Mann Thomas

Nichts schmerzt so sehr wie fehlgeschlagene Erwartungen,
aber gewiss wird auch durch nichts ein zum Nachdenken fähiger Geist
so lebhaft wie durch sie erweckt.

Benjamin Franklin

1	Einleitung	4
1.1	Zellen bilden Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte aus	4
1.2	Es gibt verschiedene Zelladhäsionsmoleküle	5
1.3	Cadherine und ihre Funktion	6
1.3.1	Cadherine bilden eine große Proteinfamilie	6
1.3.1.1	VE-Cadherin ist ein essentieller Bestandteil endothelialer Junctionen	7
1.3.1.2	Cadherine erfüllen bei der Morphogenese und Homöostase von Geweben wichtige Aufgaben	10
1.4	Der Aufbau der klassischen Cadherine ist hoch konserviert	12
1.5	Cadherine bilden Ca^{2+} -abhängig bevorzugt homophile Bindungen aus	14
1.6	Eine supramolekulare Organisation ist anscheinend für eine starke Zell-Zell-Adhäsion essentiell	18
1.7	Das FKBP/FK506-Dimerisierungssystem	22
1.7.1	FK506 ist ein wirksames Immunsuppressivum, das über die Bindung an FKBP12 wirkt	22
1.7.2	Ein FKBP-Analogon kann künstlich dimerisiert werden	24
1.8	TRPC4 und seine mögliche Rolle bei der Regulation der VE-Cadherin-Adhäsion	25
1.8.1	Ca^{2+} -Signale spielen bei der Regulation der Endothelpermeabilität eine große Rolle	25
1.8.2	In Säugetierzellen agieren TRPCs als SOCs	26
1.8.3	TRPC4 ist in Endothelzellen verantwortlich für den speicherregulierten Ca^{2+} -Einstrom	27
1.8.4	Die TRPC4-Domänenstruktur lässt Rückschlüsse auf seine Interaktionspartner zu	28
1.9	Zielsetzung der Arbeit	30
2	Material und Methoden	32
2.1	Material	32
2.1.1	Reagenzien und Versuchsmaterialien	32
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	33
2.1.3	Geräte	35
2.1.4	Kulturzellen, Bakterienstämme	37
2.1.5	Vektoren	37
2.1.6	Datenbanken und Analyseprogramme im Internet	38
2.1.7	Statistische Analyse	38
2.2	Methoden	38
2.2.1	Molekularbiologie	38
2.2.1.1	Bakterienkulturen	38
2.2.1.1.1	Anzucht von Bakterien auf Agarplatten	38
2.2.1.1.2	Anzucht von Bakterien in Flüssigkulturen	39
2.2.1.1.3	Glyzerinkulturen	39
2.2.1.2	Arbeiten mit DNA	39
2.2.1.2.1	DNA-Gelelektrophorese	39
2.2.1.2.2	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	41
2.2.1.2.3	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen oder von Reaktionsbestandteilen	41
2.2.1.2.4	Oligonukleotide	42
2.2.1.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	42
2.2.1.2.6	Isolierung doppelsträngiger Plasmid-DNA	44
2.2.1.2.7	Annealing zweier Oligonukleotide	44
2.2.1.2.8	Restriktion von DNA	45
2.2.1.2.9	Ligation	46
2.2.1.2.10	Transformation von Bakterien mit Plasmiden	46
2.2.1.2.11	Analyse positiver Plasmide durch Sequenzierung	47
2.2.2	Zellkultur	47
2.2.2.1	Routinekulturen	47
2.2.2.1.1	CHO-Routinekultur	48
2.2.2.1.2	MyEnd-Routinekultur	48
2.2.2.1.3	T4-60-Routinekultur	49
2.2.2.2	Vorbehandeln von Kulturschalen und Deckgläschen	49
2.2.2.2.1	Gelatiniere von Kulturschalen	49
2.2.2.2.2	Quervernetzen der Gelatineschicht auf Deckgläschen	49

2.2.2.2.3	Beschichtung von Deckgläschen mit Poly-L-Lysin	50
2.2.2.3	Kryokonservierung von Zellen (Einfrieren, Auftauen)	50
2.2.2.3.1	Einfrieren von Zellen	50
2.2.2.3.2	Auftauen von Zellen	50
2.2.2.4	Transfektion	51
2.2.2.5	Generierung stabiler Zellklone	52
2.2.2.6	Herstellen von Zelllysaten	53
2.2.2.6.1	Herstellung von trypsinisierten Zelllysaten	53
2.2.2.6.2	Herstellung von Zelllysaten durch Ablösen mit einem Zellschaber	53
2.2.3	Biochemie	53
2.2.3.1	Proteinbestimmung	53
2.2.3.1.1	Proteinbestimmung nach Bradford	53
2.2.3.1.2	Proteinbestimmung mit Amidoschwarz-Färbelösung	54
2.2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	54
2.2.3.3	Färben eines Polyacrylamid-Gels mit Coomassie-Brilliant-Blau	56
2.2.3.4	Westernblot	56
2.2.3.4.1	Westernblot-Analyse	57
2.2.3.5	Gelfiltration (Superdex 200)	59
2.2.3.6	Proteinreinigung	59
2.2.3.6.1	Ni-NTA-Säule	60
2.2.3.6.2	Protein A-Säule	61
2.2.3.7	Dialyse	62
2.2.4	Mikroskopie	62
2.2.4.1	Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie	62
2.2.4.1.1	Beschichtung von Latexperlen	63
2.2.4.2	Laserpinzette	63
2.2.4.2.1	Beschichtung von Protein A-Mikroperlen	65
2.2.4.2.2	Messungen mit der Laser-Pinzette	65
2.2.4.3	Einzelmolekülfluoreszenz-Technik	66
3	Ergebnisse	68
3.1	Einfluss von Dimerisierung und Oligomerisierung auf die Adhäsion von VE-Cadherin	68
3.1.1	Herstellung von Vektoren zur Expression künstlich dimerisierbarer bzw. oligomerisierbarer VE-Cadherin-Membranproteine	70
3.1.1.1	Klonierung der VE-ECTM-cDNA in Ariad-Vektoren	71
3.1.1.2	Umklonierung der VE-ECTM-1xFKBP- bzw. VE-ECTM-2xFKBP-cDNA in eukaryontische Expressionsvektoren	73
3.1.2	Generierung und Charakterisierung stabiler CHO-Zellklone	75
3.1.3	Untersuchung zum Einfluss der Dimerisierung bzw. Oligomerisierung von VE-Cadherin auf die Transinteraktion	77
3.1.3.1	Charakterisierung von Zell-Mikroperlen-Kontakten	82
3.1.4	Charakterisierung der Bindung mit Hilfe von Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie	84
3.2	Herstellen eines monomeren VE-Cadherin-Fusionsproteins mit Dimerisierungsdomäne	86
3.2.1	Herstellung eines Vektors zur Expression des sekretorischen VE-Cadherin-Monomers mit Dimerisierungsdomäne	87
3.2.1.1	Klonierung der VE-EC-cDNA in den Ariad-Vektor	87
3.2.1.2	Anhängen eines Hexahistidin-Terminus	88
3.2.1.3	Umklonierung der VE-EC-1xFKBP-His6-cDNA in einen eukaryontischen Expressionsvektor	89
3.2.2	Generierung und Charakterisierung eines VE-EC-1xFKBP-His6 stabil exprimierenden CHO-Zellklons	90
3.2.3	Proteingewinnung und Charakterisierung des Fusionsproteins VE-EC-1xFKBP-His6	91
3.2.3.1	Proteinreinigung mit Ni-NTA Affinitätschromatographie	91
3.2.3.2	Dimer-Beweis durch Gelfiltration	93
3.3	Kolokalisation und Assoziation von VE-Cadherin und TRPC4	95
3.3.1	Koimmunfluoreszenzen an MyEnd-Zellen	95
3.3.2	Rekrutierung von TRPC4 zu VE-Cadherin vermittelten Kontakten durch Transfektion von TRPC4-exprimierenden HEK-Zellen mit einem VE-Cadherin-GFP enthaltenden Plasmid	98

4	Diskussion	100
4.1	Überblick	100
4.2	Die Cis-Dimerisierung von VE-Cadherin ist notwendig und ausreichend für eine effektive Transinteraktion	101
4.2.1	Die Fusionsproteine VE-ECTM-1xFKBP und -2xFKBP werden korrekt in die Plasmamembran eingebaut	101
4.2.2	Die zwei in dieser Arbeit hergestellten Zelllinien enthalten vergleichbare Mengen der jeweiligen Fusionsproteine in ihrer Plasmamembran	102
4.2.3	Die VE-Cadherin-FKBP-Moleküle werden als Monomere in die Plasmamembran eingebaut und können dort durch FKBP dimerisiert werden	103
4.2.4	Die Bedeutung von Dimerisierung und lateraler Beweglichkeit der VE-Cadherin-Moleküle in der Plasmamembran bei der Transinteraktion	104
4.2.4.1	Die Bildung von VE-Cadherin-Dimeren ist für eine Transinteraktion notwendig	104
4.2.4.2	Eine forcierte Oligomerisierung der VE-Cadherin-2xFKBP-Fusionsproteine führt zu keiner Steigerung der Bindungsaktivität	108
4.2.4.3	Effektive Cadherin-Interaktionen sind nur möglich, wenn die Cadherine in der Membran beweglich sind	109
4.3	VE-Cadherin und TRPC4 liegen an endothelialen Zell-Zell-Kontakten in einem Komplex vor	111
4.4	Ausblick	115
5	Zusammenfassung	117
6	Literatur	122
7	Anhang	132
7.1	Datenergänzungen	132
7.1.1	Vektorkarten der Ariad-Vektoren	132
7.1.2	Klonierungsstrategien	133
7.1.2.1	Klonierungsstrategie zur Herstellung der Expressionsvektoren pEGFP-C3 ⁻ -VE-ECTM-1xFKBP und pIRES-VE-ECTM-2xFKBP	133
7.1.2.1.1	Herstellung der Vektoren pVE-ECTM-A1 und pVE-ECTM-A2	133
7.1.2.1.2	Herstellung des Expressionsvektors pEGFP-C3 ⁻ -VE-ECTM-1xFKBP	134
7.1.2.1.3	Herstellung des Expressionsvektors pIRES-VE-ECTM-2xFKBP	135
7.1.2.2	Klonierungsstrategie zur Herstellung des Expressionsvektors pIRES-VE-EC-1xFKBP-His6	136
7.1.2.2.1	Herstellung des Vektors pVE-EC-A1	136
7.1.2.2.2	Einfügen eines His6-tags	137
7.1.3	Herstellung des Expressionsvektors pIRES-VE-EC-1xFKBP-His6	138
7.2	Abkürzungen	139
7.3	Lebenslauf	142
7.4	Verzeichnis der akademischen Lehrer	143
7.5	Danksagung	144
7.6	Ehrenwörtliche Erklärung	145

1 Einleitung

Gefäßendothelzellen bilden eine kontinuierliche Zellschicht, die die innere Oberfläche des gesamten Gefäßsystems auskleidet. Sie sorgen also im Körper für eine Abgrenzung des Blutkompartiments gegen das Interstitium. Die Adhäsion zwischen Endothelzellen wird vor allem durch das Ca^{2+} -abhängige Adhäsionsmolekül VE-Cadherin vermittelt und reguliert. Sie muss so fest sein, dass sie der mechanischen Beanspruchung durch Blutdruck und Scherkräfte standhält, andererseits aber auch Prozesse wie den parazellulären Transport oder die Zellmigration erlaubt. So kommt es beispielsweise bei Entzündungen durch ein reguliertes Öffnen endothelialer Zell-Zell-Kontakte zum Zusammenbruch dieser Barriere. Dagegen kann eine zu starke Schwächung der Zelladhäsion zu lebensbedrohlichen Flüssigkeitsverlusten und Blutungen führen.

Eine genaue Kenntnis von Bau und Funktion endothelialer Zellkontakte ist daher nicht nur für das Verständnis ihrer Rolle bei der Kontrolle der Gefäßpermeabilität wichtig, sondern auch im Hinblick auf Krankheiten, wie die Arteriosklerose (Nielsen, 1996) und das Lungenödem (Dudek & Garcia, 2001), die mit gestörter Gefäßpermeabilität assoziiert sind. Bei Prozessen wie der Metastasierung (McDonald & Baluk, 2002) und der Entstehung endothelialer Tumore spielt ebenfalls fehlerhaftes Verhalten der Cadherine eine Rolle (Dejana, 2004). Um hier therapeutisch eingreifen zu können, muss die Regulation der Endothelbarriere präzise verstanden werden.

1.1 Zellen bilden Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte aus

Die meisten Zellen vielzelliger Organismen bilden Zellverbände (Gewebe), die sich wiederum zu komplexeren Funktionseinheiten (Organe) organisieren. Die Grundlage dieser Prozesse liegt in der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion.

Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen (= Junktionen) werden entsprechend ihres Aufbaus und ihrer Funktion in drei Klassen unterteilt:

1. Undurchlässige Verbindungen, die den Interzellularraum einer Epithelzellschicht so abdichten, dass selbst die meisten kleinen hydrophoben Moleküle wie Ionen diese Grenze nicht - oder nur geringfügig - passieren können (Verschlusskontakt, Zonula occludens bzw. Occludensjunktion).

2. Haftverbindungen, die der mechanischen Festigung von Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Junktionen dienen (Adhärensjunktion, Desmosom, Hemidesmosom, Fokaler Kontakt).
3. Verbindungen, die die interzelluläre Kommunikation durch die transzelluläre Passage von Molekülen und Ionen ermöglichen (Gap junctions, Plasmodesmen (bei Pflanzen)) (Alberts et al., 1997).

1.2 Es gibt verschiedene Zelladhäsionsmoleküle

Zelladhäsionsmoleküle (**cell adhesion molecules, CAMs**) aus fünf unterschiedlichen Familien vermitteln die Bindung in Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Junktionen. Diese sind die Cadherine, Mitglieder der Immunglobulin(Ig)-Superfamilie, Selektine, Mucine und Integrine. Die Interaktionen, die dabei auftreten, können homophiler (durch Interaktion identischer CAMs) oder heterophiler (durch Interaktion verschiedener CAMs) Natur sein.

Cadherine sind wichtige CAMs, die Ca^{2+} -abhängig homophile Bindungen eingehen. Sie sind in Zonula adherens, Punctum adherens und in Desmosomen zu finden. Der Hauptvertreter ist das E-Cadherin, das im adulten Organismus in Epithelzellen und in Embryonalzellen schon im Morulastadium nachzuweisen ist (daher auch der Name Uvomorulin).

Mitglieder der **Ig-Superfamilie** besitzen extrazellulär eine unterschiedliche Anzahl von Ig-Domänen, mit denen sie homo- und heterophile Bindungen ausbilden. Am bekanntesten ist das neuronale Adhäsionsprotein N-CAM, das bei der Differenzierung von Muskel-, Glia- und Nervenzellen eine wichtige Rolle spielt (Drenckhahn, 2003a).

Selektine und andere CAMs sind an der Extravasation von Leukozyten beteiligt: Endothelzellen der Blutgefäße besitzen endotheliales E-Selektin und Blutplättchen-, P-Selektin. Diese Selektine binden Ca^{2+} -abhängig an Zuckerguppen so genannter **Mucin-ähnlicher CAMs** und werden bei Entzündungsreizen vermehrt in die Zellmembran von Endothelzellen eingebaut. Lymphozyten besitzen auf ihrer Zelloberfläche P- bzw. E-Selektin-spezifische Liganden, die das Oligosaccharid Sialyl-Lewis-X tragen. Die Lymphozyten binden durch diese Selektin-Ligand-Wechselwirkung zunächst nur schwach am Endothel, sodass sie noch kurze Strecken vom Blutstrom mitgerissen werden („Rolling“). Durch die kurzzeitigen Bindungen kann der PAF(**platelet-activating-**

factor)-Rezeptor der Lymphozyten mit PAF auf der Endotheloberfläche interagieren, was zur Aktivierung eines Lymphozytenintegrins führt, das eine feste Bindung mit ICAM-1 und ICAM-2 (interzelluläres **CAM**) der Endothelzelle eingeht und schließlich den Durchtritt der Lymphozyten durch das Endothel ermöglicht (Dunon et al., 1996; Vestweber, 2002).

Integrine vermitteln hauptsächlich eine Zell-Matrix-Interaktion. Sie sind die Hauptadhäsionsmoleküle der Fokalkontakte und Hemidesmosomen. Integrine sind Heterodimere aus je einer α - und einer β -Untereinheit. Ihre extrazellulären Liganden sind z.B. Typ IV Kollagen, Laminin oder Fibronectin (Burrige & Chrzanowska-Wodnicka, 1996; Jones et al., 1998).

1.3 Cadherine und ihre Funktion

1.3.1 Cadherine bilden eine große Proteinfamilie

Als erstes Cadherin wurde 1981 E-Cadherin beschrieben (Hyafil et al., 1981; Peyrieras et al., 1983). Weitere Cadherine und Cadherin-ähnliche Proteine wurden in den folgenden Jahren entdeckt. Derzeit sind über 50 verschiedene Gene bekannt, die für Cadherine kodieren (Angst et al., 2001). Sie wurden von Nollet et al. (2000) in fünf Subfamilien unterteilt: Klassische/Typ I, atypische/Typ II Cadherine, Desmogleine, Desmocolline und BS-Cadherin. Außerdem gibt es zahlreiche Cadherin-verwandte Proteine. Typ I-Cadherine besitzen eine konservierte **Histidin-Alanin-Valin**(HAV)-Sequenz sowie ein Tryptophan (W2) in ihrer EC1 (**extrazelluläre Cadherindomäne 1**), die eine zentrale Rolle bei der extrazellulären Bindung spielen sollen (s. 1.5) (Prototyp: E-Cadherin). Typ II-Cadherine besitzen dagegen zwei konservierte Tryptophan-Reste (W2 und W4) und anstatt der HAV eine XAX-Sequenz, wobei die randständigen Aminosäuren bei jeder Subfamilie unterschiedlich sind (Prototyp: Cadherin 11). VE-Cadherin wurde 1991 von Suzuki, Sano und Tanihara identifiziert. 1992 produzierten Lampugnani et al. einen Antikörper, der das Protein an endothelialen Zellgrenzen lokalisierte. Von den Typ II-Cadherinen, zu denen es gezählt wird, unterscheidet sich VE-Cadherin, da ihm das zentrale Alanin der XAX-Sequenz fehlt, wie sonst nur einem weiteren Cadherin. Es ist auf dem humanen Chromosom 16q21/22 kodiert (CDH5) (www.gdb.org). Wegen der Unterschiede in seiner zytoplasmatischen Domäne wurde für VE-Cadherin schon eine dritte Untergruppe vorgeschlagen (Shimoyama et al., 2000).

Bei allen Cadherinen enthalten die extrazellulären Anteile Ca^{2+} -bindende EC-Domänen. Sie können allerdings 5 (klassische Cadherine) bis 34 (FAT-family Cadherine) EC-Domänen besitzen und sind meistens über eine **Transmembran(TM)**region in der Zytoplasmamembran verankert. Eine Ausnahme bilden T-Cadherin, das über einen GPI-Anker (**G**lycosyl-**p**hosphatidyl-**i**nositol) in der Zytoplasmamembran verankert ist, und das 7TM-Cadherin, das über sieben TM-Regionen verfügt. Die verschiedenen zytoplasmatischen Regionen der Cadherine tragen Bindungsstellen für unterschiedliche intrazelluläre Bindungspartner, mit denen sie u.a. an Zytoskelettbestandteile binden und in Signalwege eingreifen können (Angst et al., 2001).

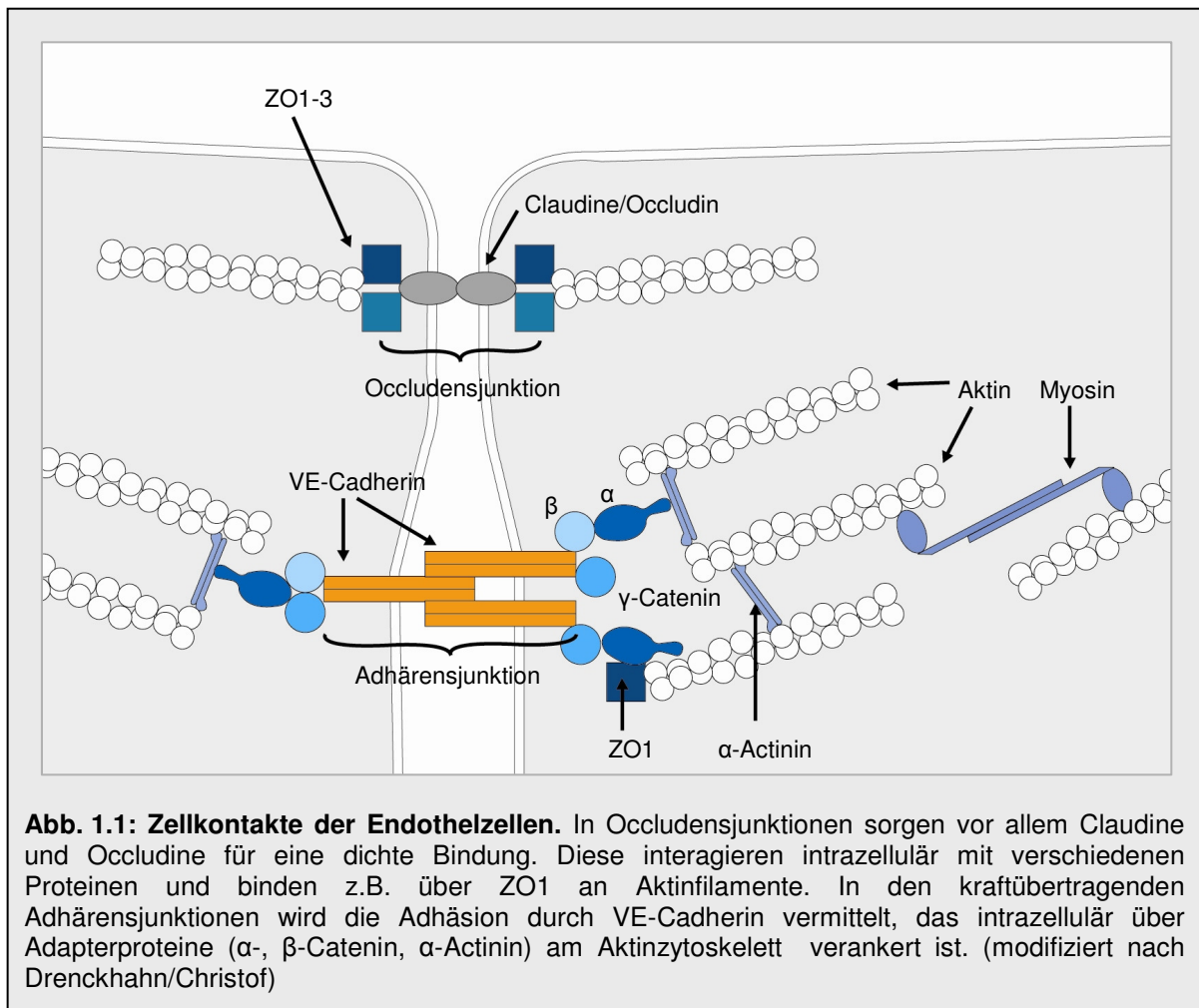
1.3.1.1 VE-Cadherin ist ein essentieller Bestandteil endothelialer Junctionen

Endothelzellen bilden als einschichtiges Plattenepithel die Kontaktzone des Blutgefäßes zum Blutstrom und bauen so eine Barriere zwischen Blut und Interstitium auf. Neben dieser mechanischen Barrierefunktion vermitteln sie einen para-/transzellulären Stoffaustausch (Flüssigkeit, Proteine und Zellen). Dafür koordinieren sie die Durchlässigkeit der Zellkontakte an den Interzellularspalten (Dvorak et al., 1996; Stevens et al., 2000).

Endothelzellen besitzen Adhärensjunctionen und Occludensjunctionen, welche nicht, wie im junctionalen Komplex des Epithels, scharf getrennt sind, sondern miteinander vermischt sein können (Simionescu, 1977). Obwohl Desmosomen fehlen, findet man im Endothel der Venen und Lymphgefäße innerhalb so genannter „Complexus adherentes“ die desmosomalen Adaptermoleküle Plakoglobin und Desmoplakin (Schmelz & Franke, 1993). Auch in kultivierten Endothelzellen der Nabelschnurvene wurde Desmoplakin nachgewiesen (Valiron et al., 1996). Die Zell-Zell-Kontakte werden durch transmembranäre Junctionsproteine gebildet, die intrazellulär mit akzessorischen Proteinen und dem Zytoskelett interagieren. Endothelzellen exprimieren die Zonula occludensspezifischen Adhäsionsproteine Claudin 5 (auch 1, 3 und 12), Occludin, JAM (**j**unctionale **A**dhäsions**m**oleküle) A, B und C sowie ESAMs (**E**ndothelial cell **s**elective **a**dhesion **m**olecule) (Aurrand-Lions et al., 2001; Dejana et al., 1999; Nitta et al., 2003) und das für Adhärensjunctionen typische VE-Cadherin.

Occludensjunctionen besitzen intrazelluläre Komponenten (z.B.: ZO-1, -2 (zonula occludens), CASK (calcium/calmodulin-dependent serine proteine kinase), ZONAB (ZO1-associated nucleic-acid binding)), die die Transkription bestimmter Gene beeinflussen können. VE-Cadherin ist intrazellulär zur Stabilisierung und dynamischen Regulation der Zelladhäsion an Aktinfilamenten verankert und bindet verschiedene Signalproteine (s.u.) (Braga, 2002; Wheelock & Johnson, 2003).

VE-Cadherin ist ausschließlich in Endothelzellen exprimiert. Dort ist es für die Bildung der Endothelbarriere maßgeblich verantwortlich und an der physiologischen Regulation der Durchlässigkeit der endothelialen Zelljunctionen für Flüssigkeiten und lymphatische Zellen beteiligt (Nusrat et al., 2000; Venkiteswaran et al., 2002). Durch Inkubation von Endothelzellrasen mit Antikörpern gegen die extrazelluläre Domäne von VE-Cadherin bildeten sich *in vitro* Lücken im Zellrasen und es wurde eine Steigerung der Permeabilität für Makromoleküle gemessen (Gulino et al., 1998). *In vivo* führten Antikörper gegen VE-Cadherin intravenös zu einer Zunahme der Gefäßpermeabilität im Myokard und in der Lunge. Außerdem ließen sich auch hier Lücken im Endothel und eine gesteigerte Extravasation von Leukozyten nachweisen (Corada et al., 1999 u. 2001).



Die Organisation der Junctionen variiert entsprechend der Permeabilitätsbedürfnisse im Blutgefäßsystem. Occludensjunctionen, die für eine Abdichtung der Interzellularspalten sorgen, sind in der Blut-Hirn-Schranke komplex und in postkapillären Venolen wenig organisiert (Wolburg & Lippoldt, 2002). Adhärensjunctionen sind für die mechanische Festigkeit der Junctionen verantwortlich und ubiquitär vorhanden. Nectin, ein Adhäsionsprotein der Immunglobulinfamilie, ist an der Bildung beider Junctionen beteiligt. Außerhalb dieser spezialisierten Zellkontakte besitzen Endothelzellen andere zelltypspezifische homophile Adhäsionsproteine wie PECAM (platelet endothelial cell adhesion molecule) (Ilan & Madri, 2003), oder N-Cadherin (Navarro et al., 1998).

Endothelzellen sind ständig dem Blutfluss ausgesetzt. Vor allem in Bereichen, in denen dieser nicht laminar, sondern durch Biegungen, Verzweigungen oder Stenosen turbulent ist, sind sie Scherstress ausgesetzt und reagieren mit chronischen Veränderungen (Arteriosklerose) (Glagov et al., 1988). In diesen

Bereichen wurde auch eine erhöhte Gefäßpermeabilität gemessen (Barakat et al., 1992). Die regionale Permeabilität für LDL (low-density lipoprotein) korreliert dabei mit dem Entstehen von Arteriosklerose im selben arteriellen Segment (Nielsen et al., 1992). Miao et al. (2005) konnten zeigen, dass die Junctionen zwischen Endothelzellen abhängig vom Flussmuster umgebaut werden und dass dies durch eine Umverteilung von VE-Cadherin innerhalb der Zellmembran zustande kommt.

1.3.1.2 Cadherine erfüllen bei der Morphogenese und Homöostase von Geweben wichtige Aufgaben

Cadherine vermitteln nicht nur Zelladhäsion, sondern auch Zell-Zell-Erkennung, Zytoskelett-Organisation, Signaltransduktion und Wachstumskontrolle. Durch diese Eigenschaften kontrollieren Cadherine in der Embryonalentwicklung sowohl die Trennung als auch das Verbinden von Zellen zur Bildung unterschiedlicher Gewebe (Takeichi, 1995) und sind bei der Aufrechterhaltung stabiler Gewebeorganisationen wichtig, um eine Dissoziation und ein Auswandern von Tumorzellen zu verhindern (Cano et al., 2000; Berx et al., 1998). Gewebegrenzen werden durch Cadherine gebildet (Kim et al., 2000; Tepass et al., 2002). Der Wechsel zwischen verschiedenen Zelltypen (epithelial gegen mesenchymal) (Gumbiner, 1996; Hay & Zuk, 1995; Cano et al., 2000), die Migration von Zellen (Matsunaga et al., 1988; Geisbrecht & Montell, 2002) und die Bildung und Plastizität von Synapsen (Uchida et al., 1996; Murase & Schuman, 1999; Togashi et al., 2002; Baumgartner et al., 2003a) sind ebenfalls Cadherin-abhängige Prozesse.

Unter Homöostase versteht man die Fähigkeit eines Gewebes, sich durch Regelung innerhalb gewisser Grenzen in einem stabilen Zustand zu halten. Das Endothel muss z.B. zum Abdichten der Blutgefäße eine konfluente Zelllage bilden. Dagegen müssen die Zellen bei Verletzungen in der Lage sein, kontrolliert zu proliferieren, um die Wunde zu schließen, aber trotzdem dürfen sie nicht unkontrolliert wuchern. Zellkontakte generieren Stabilisierungssignale und halten Zellen im Ruhezustand. Allerdings müssen bei der Angiogenese Junctionen teilweise gelockert werden. Dies zeigt sich in einem inversen Verhältnis zwischen der Stärke der Junctionen und der Neubildung von Gefäßen (Carmeliet & Jain, 2000). Wahrscheinlich ist VEGF (vascular

endothelial growth factor) für die notwendige Lockerung der Kontaktinhibition verantwortlich. VEGF bewirkt die Phosphorylierung von Cadherin-Catenin-Komplexen, wodurch sowohl die Adhäsion geschwächt als auch die Permeabilität gesteigert wird (Essner et al., 1998; Dvorak et al., 1999).

In erwachsenen Geweben sind Cadherine durch Kontaktinhibition (s.u.) an der Kontrolle von sich schnell erneuernden Geweben, wie der Epidermis oder des Darmepithels, beteiligt (Hermiston et al., 1996; Tinkle et al., 2004). Konfluente Zellen reagieren nicht mehr auf Wachstumsfaktoren, sondern stoppen den Zellzyklus. Nach einer Verletzung gewinnen sie allerdings die Fähigkeit zurück, auf diese Faktoren zu reagieren und wandern in die verletzte Stelle ein (Fagotto & Gumbiner, 1996). Diese durch Zell-Zell-Kontakt induzierte Inhibition des Zellwachstums (Kontaktinhibition) wird wahrscheinlich über β -Catenin vermittelt, das bei voll ausgebildeten Zellkontakten überwiegend an die intrazelluläre Domäne von VE-Cadherin gebunden ist. Mit der Bindung an VE-Cadherin - und auch an α -Catenin - wird verhindert, dass freies β -Catenin an den Transkriptionsfaktor LEF-1 (lymphoid enhancer factor) bindet, in den Kern wandert und dort die Transkription proliferationsaktivierender Gene induziert (z.B. Cyclin D und Myc) (Ben-Ze'ev et al., 1998; Drenckhahn, 2003b). Eine verminderte Cadherin-Expression verursacht möglicherweise eine erhöhte Zellinvasion und wird mit einer negativen Prognose für Krebspatienten in Verbindung gebracht (Takeichi, 1993). Bei Mutationen in den Genen für β -Catenin oder E-Cadherin liegt eine Prädisposition zur Entwicklung eines Kolonkarzinoms vor. Hingegen führt eine Überexpression von Cadherin bzw. α -Catenin zur Stabilisierung des freien β -Catenins in Zell-Zell-Verbindungen und so zu einer Inhibition der Transkriptionsaktivierung (Simcha et al., 1998).

VE-Cadherin interagiert wie andere Cadherine mit einem Wachstumsfaktorrezeptor: VEGF-Rezeptor 2 (N-Cadherin: FGFR 1 (Pece & Gutkind, 2000), E-Cadherin: EGFR (Suyama et al., 2002)) und reduziert dadurch stark die proliferative Antwort auf VEGF (vascular endothelial growth factor) (Takahashi et al., 2001). Außerdem ist VE-Cadherin über p120 und β -Catenin mit DEP-1 (density enhanced protein-1) assoziiert. Diese Phosphatase ist in der Lage, selektiv Tyrosinreste zu dephosphorylieren (Dejana, 2004). Ist VE-Cadherin in Junctionen aggregiert, so wird selektiv ein Phospho-Tyrosinrest am VEGFR 2 dephosphoryliert, der ansonsten Phospholipase C γ rekrutieren

und Proliferation auslösen würde (Takahashi et al., 2001). Ein anderes Phospho-Tyrosin ist nicht betroffen und kann über Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase die Zelle vor Apoptose schützen (Gerber et al., 1998). In nicht konfluenten Zellen oder bei verminderter VE-Cadherin-Expression dagegen wird vermehrt der Signalweg über die Phospholipase $C\gamma$ zur Proliferationsaktivierung angesteuert.

Es gibt also zwei Möglichkeiten wie Cadherine beim Vermitteln extrazellulärer Signale ins Zellinnere wirken. Sie können direkt auf Signalmoleküle oder Wachstumsfaktorrezeptoren wirken (VEGF-Rezeptor), oder indirekt die subzelluläre Lokalisation von Plaqueproteinen beeinflussen (β -Catenin).

1.4 Der Aufbau der klassischen Cadherine ist hoch konserviert

Klassische Cadherine sind Transmembranproteine mit einer einfachen transmembranären α -Helix, einem zytoplasmatischen C-Terminus und einem extrazellulären N-Terminus.

Der N-terminale Abschnitt besteht aus fünf homologen EC-Domänen (extrazelluläre Cadherindomänen EC1-EC5, je 110 Aminosäuren lang), die strukturelle Ähnlichkeit mit Immunglobulindomänen aufweisen. Diese sind über vier verschiedene Ca^{2+} -Bindungsstellen miteinander verbunden (Koch et al., 1997; Ozawa & Kemler, 1998; Pertz et al., 1999). Die Spezifität der Cadherine liegt in der äußersten EC-Domäne, EC1 (Nose et al., 1990). Schon 1981 bewiesen Hyafil et al., dass die Cadherin-vermittelte Adhäsion Ca^{2+} -abhängig ist. Die Ca^{2+} -Ionen binden zwischen den EC-Domänen und bewirken dort eine Konformationsänderung, sodass die Cadherin-Monomere eine stäbchenförmige Struktur bilden (Pokutta et al., 1994; Nagar et al., 1996). Sie sind so geschützt vor proteolytischer Degradation (Ozawa et al., 1990a). Außerdem ist die Ca^{2+} -Bindung notwendig für eine Cis-Dimerisierung, d.h. eine laterale (parallele) Bindung von zwei Monomeren derselben Zelle zu einem Dimer (s.u.).

Der intrazelluläre C-Terminus enthält Bindungsstellen für Proteine aus der Gruppe der Catenine. Diese Proteine werden in der Literatur oft als Plaque- oder Adapterproteine bezeichnet. p120-Catenin bindet an die Juxtamembranregion, β -Catenin an die distale Region der zytoplasmatischen Cadherindomäne, und außerdem bindet β -Catenin α -Catenin, das wiederum Aktin und aktinbindende Proteine wie Vinculin, α -Actinin oder Formin-1 bindet

(Peifer & Wieschaus, 1990; Peifer et al., 1992; Reynolds et al., 1994). An VE-Cadherin bindet auch γ -Catenin (Plakoglobin) und stellt über Desmoplakin eine Verbindung zu Intermediärfilamenten her (Kowalczyk et al., 1998). Die zytoplasmatische Cadherindomäne sowie die Catenine sind Substrate verschiedener Kinasen und Phosphatasen. Ihr Phosphorylierungszustand beeinflusst die Adhäsion (Dejana et al., 1999; Roura et al., 1999).

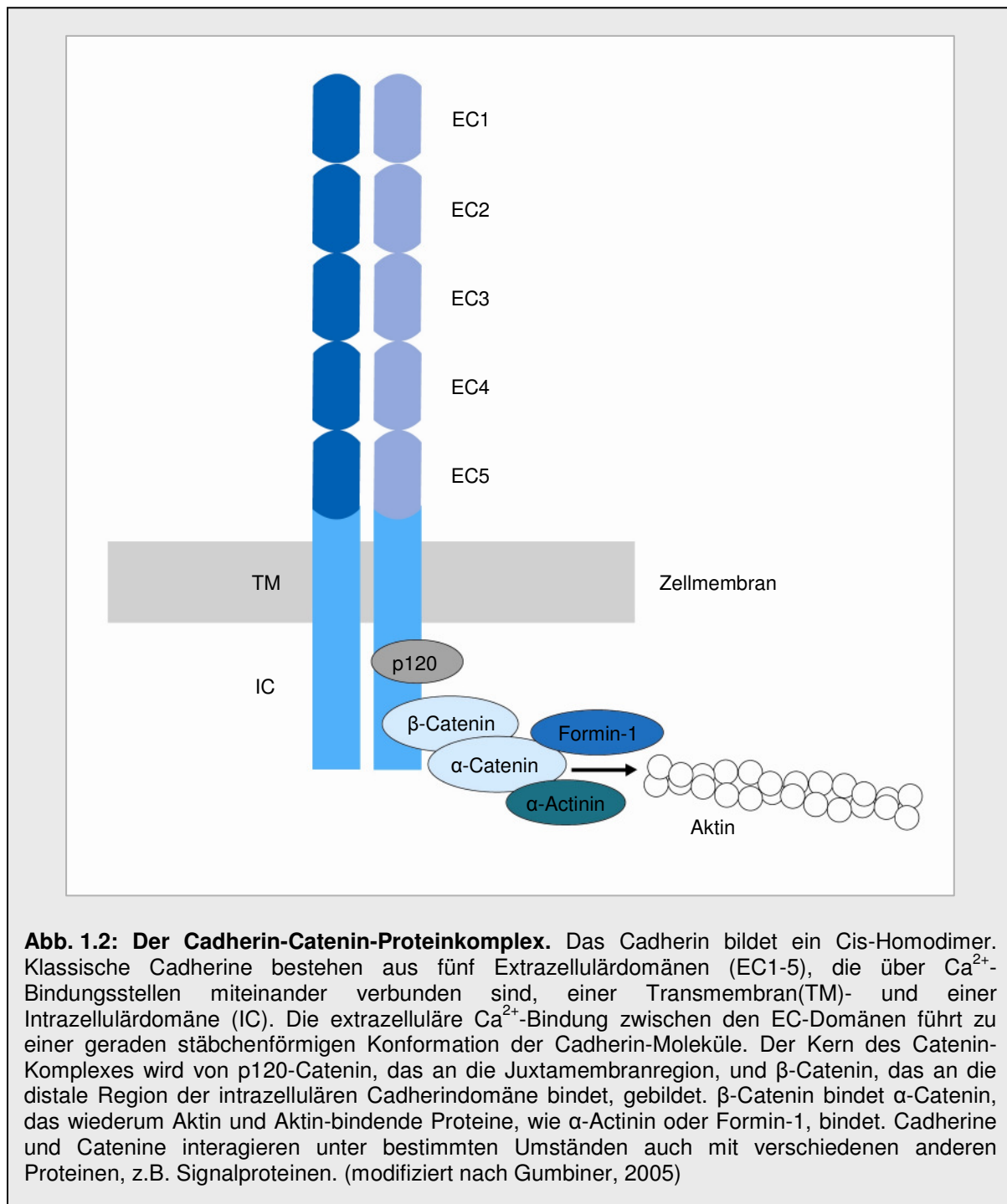


Abb. 1.2: Der Cadherin-Catenin-Proteinkomplex. Das Cadherin bildet ein Cis-Homodimer. Klassische Cadherine bestehen aus fünf Extrazellulärdomänen (EC1-5), die über Ca^{2+} -Bindungsstellen miteinander verbunden sind, einer Transmembran(TM)- und einer Intrazellulärdomäne (IC). Die extrazelluläre Ca^{2+} -Bindung zwischen den EC-Domänen führt zu einer geraden stäbchenförmigen Konformation der Cadherin-Moleküle. Der Kern des Catenin-Komplexes wird von p120-Catenin, das an die Juxtamembranregion, und β -Catenin, das an die distale Region der intrazellulären Cadherindomäne bindet, gebildet. β -Catenin bindet α -Catenin, das wiederum Aktin und Aktin-bindende Proteine, wie α -Actinin oder Formin-1, bindet. Cadherine und Catenine interagieren unter bestimmten Umständen auch mit verschiedenen anderen Proteinen, z.B. Signalproteinen. (modifiziert nach Gumbiner, 2005)

1.5 Cadherine bilden Ca^{2+} -abhängig bevorzugt homophile Bindungen aus

Es gibt derzeit sechs verschiedene Modelle, die die molekulare Struktur der homophilen Cadherinbindung zu erklären versuchen. Viele Untersuchungen sprechen dafür, dass die Cis-Dimerisierung eine Voraussetzung für die Adhäsion ist, d.h. zwei Cadherin-Monomere derselben Zelle bilden ein Dimer (Cis-Dimer), das dann mit einem Cis-Dimer einer benachbarten Zelle eine Transinteraktion eingeht.

1. Das „linear zipper model“ (**Reißverschlussmodell**) beruht auf Röntgenstrukturanalysen von N-Cadherin EC1 (Shapiro et al., 1995). In diesem Modell bildet sich das Cis-Dimer durch die gegenseitige Insertion eines Tryptophan-Restes (Trp, W2) aus der EC1-Domäne der einen Untereinheit in die hydrophobe Tasche der EC1-Domäne der anderen Untereinheit. Die Trans-Interaktion findet an einer anderen Stelle der EC1-Domänen statt, die die in Cadherinen vom Typ I (z.B. N- oder E-Cadherin) hoch konservierte **Histidin-Alanin-Valin(HAV)**-Sequenz umgibt und zwar mit mehreren Cis-Dimeren der benachbarten Zelle (Reißverschluss). Diese Multivalenz der Bindungen (Avidität) könnte zu einer Affinitätssteigerung führen (Kooperativität). Auf die Bildung des Cis-Dimers über den Trp-Rest weisen auch andere Experimente hin (Briehner et al., 1996; Tamura, 1998; Takeda et al., 1999; Shan et al., 2000), wohingegen die Existenz der Trans-Bindungsstelle um die HAV-Sequenz durch Mutagenesestudien nicht unterstützt werden konnte (Kitagawa et al., 2000; Renaud-Young & Gallin, 2002).

2. Ein „**Trans-Trp-Dimerisierungsmodell**“ wurde aus der Kristallstruktur der C-Cadherin-Ektodomäne abgeleitet (Boggon et al., 2002). Hierbei vermittelt das Trp2 durch Bindung in die hydrophobe Tasche eines gegenüber liegenden Cadherin-Moleküls einer benachbarten Zelle die Trans-Dimerisierung. Eine Cis-Interaktion könnte über die EC2/EC3-Domänen (Boggon et al., 2002) oder durch ein Hin-und-her-springen des Trp2-Restes zur Vermittlung der Cis- und Trans-Interaktion bei der Adhäsion erreicht werden (Klingelhofer et al., 2002).

3. Auf Basis der Kristallstruktur eines EC1-EC2-Moleküls von E-Cadherin und elektronenmikroskopischen Versuchen mit artifiziell multimerisierten E-Cadherin-Ektodomänen (E-Cadherin-Ektodomäne mit dem pentamerisierenden cartilage oligomeric matrix protein) wurde ein Modell entwickelt, bei dem die

EC1-EC2- Domänen eines Cis-Dimers eine **X-förmig gekreuzte Orientierung** einnehmen sollen. Die Cis-Dimerisierung erfolgt an der Ca^{2+} -Bindungsstelle zwischen EC1 und EC2. Durch die intramolekulare Bindung des Trp2-Restes kommt es zu einer Konformationsänderung in EC1, wodurch die Trans-Bindungsstelle entsteht (Pertz et al., 1999).

4. Das „**Domänenüberlappungsmodell**“ wurde nach Kraftmessungen zwischen mit C-Cadherin-Ektodomänen beschichteten Oberflächen und anderen biophysikalischen und biochemischen Studien vorgeschlagen (Sivasankar et al., 1999; Leckband & Sivasankar, 2000; Chappuis-Flament et al., 2001; Zhu et al., 2003). In diesem Modell beschränkt sich die Transinteraktion Trp-vermittelter Cis-Dimere nicht auf die EC1-Domäne, sondern es wird diskutiert, dass sich die vier anderen membranproximalen Domänen (EC2-EC5) überlappen und zusätzliche Bindungen eingehen können. Für diese Möglichkeit sprechen auch Untersuchungen an LCAM (Hühnchen E-Cadherin) und NCAM (Renaud-Young & Gallin, 2002; Ranheim et al., 1996).

5. Von Chitaev und Troyanovsky (1998) wurde nach Transfektionsversuchen mit E-Cadherin auch ein **Trans-Dimerisierungsmodell** vorgeschlagen. Dabei ist eine Cis-Dimerisierung die Voraussetzung für eine adhäsive Transinteraktion. Bei der Ausbildung der Trans-Bindung sollen diese Cis-Dimere aber zugunsten der Trans-Dimerisierung aufgelöst werden, denn es konnte kein Trans-interagierender Komplex nachgewiesen werden, der zwei Cis-Dimere enthielt. Das ergibt ein Modell, in dem die Cis- und Trans-Dimerisierung zwei konsekutive Ereignisse bei der Ausbildung einer adhäsiven Zell-Zell-Bindung darstellen.

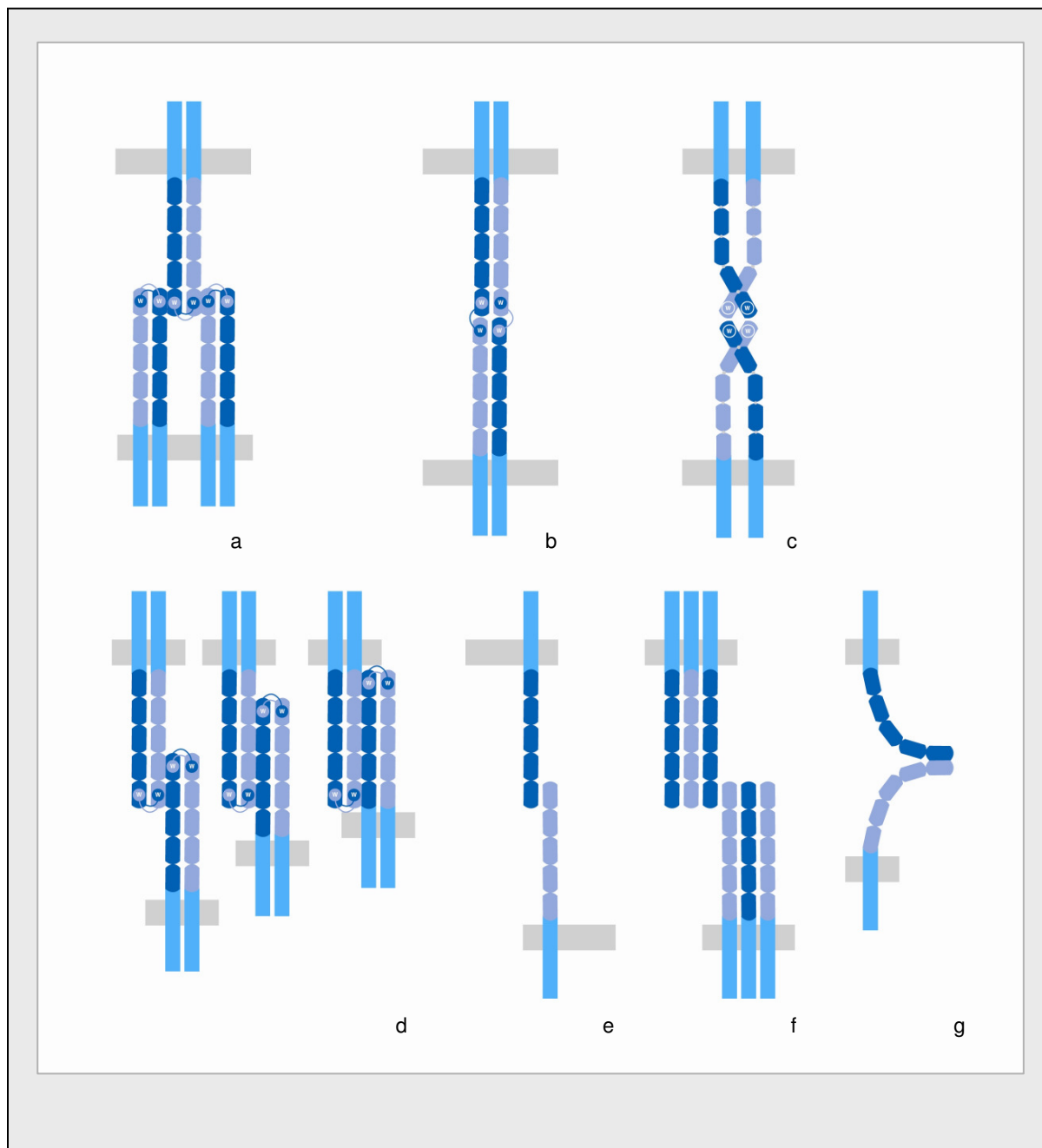
6. Für VE-Cadherin wurde ein „**Hexamerisierungsmodell**“ vorgeschlagen (Legrand et al., 2001). Dieses basiert auf elektronenmikroskopischen Untersuchungen an isolierten VE-Cadherin EC1-EC4-Domänen, die *in vitro* Ca^{2+} -abhängig auch Hexamere bilden können. Durch kryoelektronenmikroskopische Ansichten artifizieller Adhärenskontakte zwischen Cadherin-Fragmente tragender Liposomen wurden erneut Anhaltspunkte für dieses Modell gefunden (Lambert et al., 2005).

VE-Cadherin ist ein Cadherin vom Typ II. Diese besitzen zwar ein Trp2, aber statt des HAV-Motivs ein VIV-Motiv (**Valin-Isoleucin-Valin**) (Tanihara et al., 1994). Man geht davon aus, dass dieses Cadherin die Zelladhäsion über

analoge Mechanismen vermittelt, wie die Typ I - Cadherine, denn es kommt auch bei VE-Cadherin bei Ca^{2+} -Entzug zu Konformationsänderungen, sodass unter 0,5 mM Ca^{2+} so gut wie keine Transinteraktionen beobachtet werden können (Baumgartner et al., 2000; Baumgartner & Drenckhahn, 2002a).

Weitere Untersuchungen werden zeigen, welches Modell die homophile Cadherinbindung am besten erklärt, oder ob sich auch noch für andere denkbare Modelle Anhaltspunkte finden. So könnten die Cadherin-Moleküle unter einem anderen als dem 90° -Winkel aus der Membran ragen, womit sich weitere Interaktionsmöglichkeiten ergeben (s. Abb. 1.3). Auch ist noch nicht abschließend geklärt, ob Monomere eine Transinteraktion eingehen können. Es wäre interessant zu wissen, welche Kräfte Cadherin-Monomere aufeinander ausüben, denn die Untersuchungen von Chitaev und Troyanovsky (1998) lassen auf eine Monomer-Monomer-Transinteraktion schließen (s.o.). Außerdem bleibt die Möglichkeit, dass alle Modelle verschiedene Konformationen repräsentieren, die bei der Regulation der Adhäsion eine Rolle spielen.

Abb. 1.3: Verschiedene Modelle der homophilen Cadherinbindung. **a** Bei dem Reißverschlussmodell bindet ein Trp2-vermitteltes Cadherin-Cis-Dimer je zwei Dimere der gegenüberliegenden Membran. So entsteht ein Band abwechselnder Trans-Bindungen zwischen EC1-Domänen. Die gegenseitige Insertion des Trp2-Restes aus EC1 in eine hydrophobe Tasche von EC1 des Cis-Partners vermittelt die Bildung des Cis-Dimers. Die Trans-Bindung geschieht an einer Domäne, die bei Typ I-Cadherinen die HAV-Sequenz umgibt. **b** Im Trans-Trp-Dimerisierungsmodell vermittelt das Trp2 die Trans-Bindung durch gegenseitige Insertion des Trp2 in die hydrophobe Tasche des Trans-Partners. Eine Cis-Dimerisierung könnte an den Domänen EC2/EC3 stattfinden. **c** Eine X-förmig gekreuzte Orientierung nehmen die EC1-EC2-Domänen eines Cis-Dimers bei diesem Modell ein. Die Cis-Dimerisierung geschieht an der Ca^{2+} -Bindungsstelle zwischen EC1 und EC2. Der Trp2-Rest bindet intramolekular und sorgt damit für die richtige Konformation der EC1-Domäne für eine Transinteraktion. **d** Bei dem Domänenüberlappungsmodell können nicht nur die EC1-Domänen Bindungen miteinander eingehen, sondern auch andere extrazelluläre Domänen, sodass es bei der Bindung zu einer unterschiedlich starken Überlappung der Extrazellulärdomänen kommen kann. **e** Die Cis-Dimerisierung ist bei dem Trans-Dimerisierungsmodell nur die Voraussetzung dafür, dass sich ein Trans-Dimer bilden kann. Am bindenden Trans-Dimer sind nur je ein Monomer von den gegenüberliegenden Seiten beteiligt. **f** Hexamerisierungsmodell: VE-Cadherin bildet hexamere Bindungskomplexe, wobei je drei Monomere von einer Seite beigesteuert werden. **g** Ragen die Cadherin-Moleküle unter einem anderen als dem 90° Winkel aus der Membran, so könnten Monomere-in-Trans die gleiche Konformation einnehmen, wie Cis-liegende Monomere und so über die für Cis-Dimere vermuteten Mechanismen eine Trans-Bindung eingehen. (a-c modifiziert nach Gumbiner, 2005; d-g modifiziert nach Drenckhahn/Christof)



1.6 Eine supramolekulare Organisation ist anscheinend für eine starke Zell-Zell-Adhäsion essentiell

Adhäsive Interaktionen zwischen Zellen sind dynamisch. Prinzipiell ist die Adhäsionsstärke von der Plasmamembrankonzentration der Cadherine und von der Adhäsionsaffinität ihrer Transinteraktion abhängig. Verschiedene Faktoren sind an der Regulation dieser beiden Grundparameter beteiligt:

Eine große Rolle bei der Regulation spielt die Stärke der Cadherin-Genexpression. Die **Expressionsstärke** der Cadherine beeinflusst die Stärke der Adhäsion (Steinberg & Takeichi, 1994). In der lateralen Membran werden Cadherine ständig endozytiert und wieder in die Plasmamembran eingebaut. Dieser Prozess wird bei der Lockerung der Interzellularkontakte verstärkt (Kamei et al., 1999; Le et al., 1999). Es ist möglich, dass die **Endozytose** von Cadherinen einen Mechanismus der De-adhäsion darstellt (Wrobel et al., 2004). Kleine **GTPasen** der Rho- und Ras-Familien beeinflussen Membranverkehr und Umsatz von Cadherinen und kontrollieren die Organisation des Aktinzytoskeletts und die Polarisierung von Zellen.

Veränderungen der extrazellulären Cadherin-Interaktion und der intrazellulären Verbindung zum Zytoskelett beeinflussen sich gegenseitig. So ist die **Bindung an Aktinfilamente** wesentlich für die Stabilisierung der Adhäsionskontakte. Sie sorgt wahrscheinlich für eine korrekte laterale Anordnung der Cadherine in der Membran und für eine lokale Erhöhung der Konzentration im Bereich der Zellgrenzen (Kemler, 1993). Andererseits führt eine Störung der extrazellulären Cadherin-Bindung durch Ca^{2+} -Entzug oder Cadherin-Antikörper auch zu einer Desintegration des Aktinfilamentsystems (Volk und Geiger, 1986; Volberg et al., 1986).

Durch die Cadherin-Zytoskelett-Verbindung können Kräfte übertragen werden, um die Zellform zu ändern oder eine Bewegung zu generieren. Bei den klassischen Cadherinen ist die Verankerung am Zytoskelett Voraussetzung für die extrazelluläre Bindung. Baumgartner et al. (2003b) konnten zeigen, dass eine Depolymerisation des Aktinfilamentsystems (F-Aktin) durch Cytochalasin D oder das Ca^{2+} -Ionophore A23187 in Endothelzellen in Kultur die Cadherin-vermittelte Adhäsion verringert. Auch eine Stabilisierung von F-Aktin mit Jasplakinolid führte zu wesentlich geringeren Cadherin-vermittelten Bindungsereignissen als in unbehandelten Kontrollen. Hatte die Cadherin-

Bindung allerdings bereits stattgefunden, bevor die Zellen mit Jasplakinolid behandelt wurden, war diese umso stärker (Baumgartner et al., 2003b). So wurde nicht nur die Abhängigkeit der Cadherin-Bindung von ihrer Interaktion mit dem Aktinzytoskelett gezeigt, sondern auch die Wichtigkeit des dynamischen Auf- und Abbaus von F-Aktin für die Cadherin-Bindung.

Es gibt allerdings auch Cadherine, die keine Bindung zum Zytoskelett ausbilden. So besitzen T-Cadherin und Li-Cadherin keine Zytoplasmadomäne, haben aber dennoch Zelladhäsions-Eigenschaften (Vestál & Ranscht, 1992; Kreft et al., 1997). Außerdem gibt es verschiedene Anhaltspunkte, die vermuten lassen, dass die Cadherin-Extrazellulärdomänen alleine eine gewisse funktionale Aktivität besitzen. So wurde gezeigt, dass chimere Proteine, bestehend aus dem extrazellulären Teil von E-Cadherin und dem transmembranären sowie zytoplasmatischen Teil von N-CAM (Jaffe et al., 1990) bzw. Desmoglein 3 (Roh & Stanley, 1995), Zytoskelett-unabhängige adhäsive Eigenschaften besitzen, obwohl beide keine Catenine binden. Ebenso ist Neuriten- und Astrozytenwachstum auf gereinigtem N-Cadherin möglich (Bixby & Zhang, 1990; Payne & Lemmon, 1993). Ein proteolytisch gewonnenes extrazelluläres Segment von E-Cadherin kann Zell-Zell-Kontakte zerstören (Wheelock et al., 1987). VE-Cadherin besitzt eine 164 Aminosäuren lange zytoplasmatische Domäne. In CHO-Zellen wurde ein trunkiertes VE-Cadherin, dem die 82 C-terminalen Aminosäuren fehlten, exprimiert. Diese Mutante, der die Catenin-Bindungsstelle fehlte, war immer noch in der Lage, eine Zellaggregation zu fördern (Navarro et al. 1995). Bei E-Cadherin führte eine Deletion der Catenin-Bindungsstelle zum Verlust der adhäsiven Aktivität (Nagafuchi & Takeichi, 1988; Ozawa et al., 1990b). Wurde aber zusätzlich die membranproximale Region entfernt, zeigte sich wieder eine E-Cadherin-abhängige Zellaggregation (Ozawa & Kemler, 1998). Die membranproximale Region scheint eine laterale Dimerisierung der E-Cadherin-Moleküle zu inhibieren, während die β -Catenin/Plakoglobin und α -Catenin-bindende distale zytoplasmatische Region eine laterale Oligomerisierung bewirkt. Durch Entfernen der inhibierenden Region wurde ein Aggregieren ohne Verbindung zum Zytoskelett ermöglicht (Ozawa & Kemler, 1998). Entgegen den Beobachtungen an E-Cadherin waren partiell trunkierte VE-Cadherine ebenso wie N-Cadherine, die die membranproximale Region behielten, adhäsiv

(Ozawa, 2003). Dies lässt auf unterschiedliche Funktionen entsprechend dem Cadherin-Subtyp schließen.

Es wird vermutet, dass die Cadherin-Adhäsion vor allem durch die Regulation der lateralen Mobilität der Cadherine in der Membran kontrolliert wird (Baumgartner & Drenckhahn, 2002b). Dies wird auch durch die Tatsache gestützt, dass die Cadherin-vermittelte Aggregation temperaturempfindlich ist, was an der Reduktion der Membranfluidität liegen könnte, die eine Bildung von Aggregaten verlangsamt (Takeichi, 1977; Angres et al., 1996). Da die Cadherinbindung eine sehr geringe Affinität aufweist - die Bindungen lösen sich alle 0,55-0,7 s - wird eine gewisse Immobilisierung der Cadherine benötigt, damit sie nach der Dissoziation schnell wieder zurückbinden können (Baumgartner et al., 2003b). Ohne Zytoskelettverankerung würden die Moleküle mit einer 10-20fach erhöhten lateralen Mobilität davondriften und so die Zeit bis zur erneuten Bindung verlängern. Durch eine Immobilisierung der Cadherine dagegen, z.B. durch eine Verankerung am Zytoskelett, wird die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung einer erneuten Bindung und damit die gesamte Bindungsstärke erhöht (Baumgartner & Drenckhahn, 2002c). Somit wird durch die Bindung der Cadherine an Aktinfilamente die Dimerisierung und Aggregation erleichtert. Bei Cadherinen ohne Verankerung könnten andere Mechanismen dasselbe bewirken.

Die Funktion fast aller Cadherine ist abhängig von der **extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration**. Nur in Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} im millimolaren Bereich bilden Cadherine die richtige Konformation aus, um eine Cis- und danach eine Transinteraktion eingehen zu können. Einen Hinweis darauf, dass diese Abhängigkeit von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auch physiologisch zur Adhäsionsregulation genutzt wird, ergaben Versuche an Nervenzellen des Hippocampus. Eine tetanische Stimulation führt zur Vergrößerung der Synapse, wie es bei synaptischen Bahnungs- und Lernvorgängen der Fall ist. Dabei kommt es zur Erniedrigung der Ca^{2+} -Konzentration im synaptischen Spalt auf Werte um 0,3-0,8 mM. Wahrscheinlich können sich dadurch N-Cadherin-Kontakte ($K_D = 0,8 \text{ mM } \text{Ca}^{2+}$), die die Synapse stabilisieren, lösen, was den Umbau der synaptischen Kontaktzone erst ermöglicht (Murase & Schuman, 1999; Baumgartner et al., 2003a).

Klassische Cadherine wechseln von einer monomeren nicht aktiven Konformation zu einer dimeren aktiven Konformation (**Cis-Dimerisierung**). Nur Cis-Dimere sind wahrscheinlich in der Lage, mit Cadherinen benachbarter Zellen effektive Transinteraktionen einzugehen (Takeda et al., 1999). So wurde anhand rekombinanter *Xenopus* C-Cadherin EC1-EC5-Moleküle gezeigt, dass spontan dimerisierende Cadherine eine größere homophile Bindungsaktivität entwickeln als nicht dimerisierende Monomere (Brieher et al., 1996).

Als Antwort auf äußere Signale, z.B. Wachstumsfaktoren, wird die Zelladhäsion schnell moduliert (Zhong et al., 1999; Shibamoto et al., 1994). So geht eine Verminderung der Adhäsionsaktivität von C-Cadherin in *Xenopus laevis*-Embryos als Antwort auf den Wachstumsfaktor Activin schnell und ohne Änderung der plasmalemmalen C-Cadherin-Konzentration oder seiner Assoziation mit zytoplasmatischen Komponenten des Adhärenskomplexes einher. Deshalb wird vermutet, dass es für C-Cadherin - ähnlich wie für Integrine - ein „inside-out signaling“ gibt, das direkt die Bindungsaffinität der Cadherin-Ektodomänen beeinflusst (z.B. über eine Konformationsänderung) (Brieher & Gumbiner, 1994). Dabei könnten **Signalwege** über Rezeptortyrosinkinasen wie EGFR, VEGFR 2, nicht-Tyrosinkinase-Rezeptoren wie Src oder Abl (Hemmung der Adhäsion) oder Rezeptor- und nicht-Rezeptor-Tyrosinphosphatasen (Erhöhung der Adhäsion) eine Rolle spielen (Takeda et al., 1995; Roura et al., 1999; Rhee et al., 2002; Marsden & DeSimone, 2003).

Die **Catenine** haben drei Aufgaben bei der Cadherinfunktion: Sie vermitteln den direkten physikalischen Kontakt der Cadherine zum Aktinzytoskelett. Sie interagieren auch mit anderen Signalmolekülen, die das Aktinzytoskelett regulieren. Beispielsweise kann p120 die GTPasen Rho und Rac regulieren. Dagegen interagiert β -Catenin mit der Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase (Woodfield et al., 2001; Perez-Monero et al., 2003). Es wird diskutiert, ob Catenine auch direkt durch ihren Phosphorylierungsstatus die Bindungsaffinität der Cadherin-Extrazellulärdomäne beeinflussen. Jedenfalls gibt es Anhaltspunkte dafür, dass die Cateninbindung an die zytoplasmatische Domäne den Dimerisierungsstatus oder das Aggregieren von Cadherinen reguliert (Yap et al., 1998; Aono et al., 1999).

Ein Model für die Adhäsionsregulation, das keine Konformationsänderung der Adhäsionsmoleküle zugrunde legt, geht von Zytoskelett-vermittelter **Aggregat-**

Bildung der Adhäsionsmoleküle aus (Kusumi et al., 1999; Gumbiner, 2000). Yap et al. (1997) tauschten die gesamte intrazelluläre C-Cadherindomäne gegen eine Oligomerisierungsdomäne aus und zeigten, dass eine Anordnung von C-Cadherin in punktuellen Aggregaten eine höhere Adhäsionsstärke bedingt als die diffuse Verteilung dieser Fusionsproteine in der Zellmembran. Daraus schlossen sie, dass eine Oligomerisierung der Extrazellulärdomänen für eine Bindung notwendig ist und dass die zytoplasmatische Domäne bei intakten Proteinen die Anordnung von Cadherinen in Aggregaten fördert (Yap et al., 1997). Diese forcierte Oligomerisierung führt aber nicht nur zur Bildung von Aggregaten, sondern auch zu einer Immobilisierung der Cadherine und damit zu einer lokalen Konzentrationserhöhung. Sie dürfte auch eine Cis-Dimerisierung der trunkierten Cadherine stimulieren. Da durch eine Cis-Dimerisierung die Voraussetzung für eine Transinteraktion geschaffen ist (s.o., Takeda et al., 1999), ist es möglich, dass diese Dimerisierung für eine effektive Zell-Zell-Adhäsion ausreicht. Das Dimer-Stadium bei der Ausbildung einer Bindung wurde durch den gewählten Versuchsansatz aber übersprungen, da sofort Oligomere gebildet wurden. So bleibt unklar, ob eine Dimerisierung alleine ausreicht, um eine verstärkte Adhäsion zu erreichen, oder ob eventuell die Beschränkung der Diffusion in der Membran die Ursache für die erhöhte Adhäsion ist.

1.7 Das FKBP/FK506-Dimerisierungssystem

1.7.1 FK506 ist ein wirksames Immunsuppressivum, das über die Bindung an FKBP12 wirkt

FK506 (auch Tacrolimus, $C_{44}H_{69}NO_{12}$) wurde 1987 von den Japanern T. Goto, T. Kino und H. Hatanaka als erste immunsuppressive Macrolidverbindung entdeckt. Der Name Tacrolimus kommt von „Tsukuba macrolide immunosuppressant“. Es wird von einem Bakterium (*Streptomyces tsukubaensis*) produziert. 1994, erstmals von der „Federal Drug Association“ zugelassen, wurde FK506 bei einer Lebertransplantation eingesetzt. Das Medikament (Handelsname Prograf, Astellas Pharma Inc.) wurde seitdem auch bei anderen Transplantationen zur Immunsuppression und außerdem zur Behandlung von Neurodermitis angewandt. Es entfaltet, wie auch Cyclosporin A, seine pharmakologische Wirkung durch Bindung an eine Gruppe

intrazellulärer Proteine, die so genannten Immunophiline. FK506 bindet an das zelluläre Immunophilin FKBP (**FK** bindendes **P**rotein). Dieser Komplex verhindert die klonale Expansion der T-Zellen durch eine Verminderung der Expression von Zytokin-Genen, vor allem von Interleukin-2 (IL-2), dessen Synthese durch T-Lymphocyten ein wichtiges Wachstumssignal für T-Zellen darstellt.

FKBP ist (ebenso wie der Bindungspartner von Cyclosporin A, Cyclophilin) eine Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase. Die Isomeraseaktivität scheint jedoch nicht mit der immunsuppressiven Wirkung der Medikamente zusammenzuhängen.

Bei der Aktivierung des T-Zell-Rezeptors durch Antigene wird der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel erhöht und die Synthese der nukleären Komponente des Transkriptionsfaktors NF-AT (**nuclear factor of activation in T-cells**), NF-ATn wird induziert. NF-AT besteht aus zwei Komponenten, NF-ATn (s.o.) und NF-ATc, die zytosolische Komponente. Das durch die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors frei gewordene Ca^{2+} aktiviert die Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin, die die zytosolische Komponente des NF-AT, NF-ATc dephosphoryliert, welche daraufhin in den Zellkern wandern kann, an NF-ATn bindet und mit ihm gemeinsam die Transkription des IL-2-Gens induziert.

Der Komplex aus Immunophilin und Medikament bindet an Calcineurin, sodass dieses nicht mehr Ca^{2+} binden und nicht aktiviert werden kann. So wird die Signalgebung des T-Zell-Rezeptors unterbrochen und die IL-2-Produktion gehemmt. Ohne IL-2 kommt es nicht zur Proliferation von T-Zellen und dadurch zu keiner Immunantwort (Dumont, 2000).

Bislang ist nicht bekannt, weshalb Calcineurin diesen Komplex aus Medikament und Immunophilin bindet. Man geht davon aus, dass es endogene Äquivalente von Cyclosporin A und FK506 gibt, die ähnliche regulatorische Aufgaben erfüllen.

Die FKBP-Familie besteht aus mehr als 20 Mitgliedern mit mindestens acht Säugetierproteinen. Diese Proteine sind nach ihrem Molekulargewicht benannt (z.B. FKBP12 = 12 kDa, FKBP52 = 52 kDa etc.) (Chelu et al., 2004). Das humane FKBP12 hat 108 Aminosäuren und ist für die immunsuppressive Wirkung von FK506 verantwortlich. Es wird in allen Geweben exprimiert und scheint verschiedene physiologische Funktionen zu erfüllen: FKBP12 ist eine Untereinheit zweier intrazellulärer Kalzium-Kanäle, des Inositol-1,4,5-

triphosphat-Rezeptors (IP3-R) und des Ryanodin-Rezeptors (Brillantes et al., 1994; Cameron et al., 1995), und ist außerdem eine Untereinheit des TGF- β -Typ I-Rezeptors (Wang et al., 1994). Bei diesen drei Rezeptoren inhibiert FKBP12 die basale Hintergrundaktivität (Brillantes et al., 1994; Cameron et al., 1995; Wang et al., 1996; Chen et al., 1997) und hat somit Auswirkungen auf den Zellzyklus (über den TGF- β -Rezeptor, Aghdasi et al., 2001) und auf die Herzfunktion (über den Ryanodin-Rezeptor, Chelu et al., 2004). Die durch Calcineurin am IP3-Rezeptor ausgelöste Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER wird durch FKBP12 wahrscheinlich mittels zweier Effektorproteine moduliert (über Calcineurin inhibierend, über **mammalian target of rapamycin** „mTOR“ aktivierend) (MacMillan et al., 2005). An der Regulation des P-Glycoprotein-multidrug-Transporters ist FKBP12 ebenfalls beteiligt (Hemenway & Heitman, 1996).

1.7.2 Ein FKBP-Analogon kann künstlich dimerisiert werden

FKBP12 (im Folgenden nur noch mit FKBP bezeichnet) und sein Ligand FK506 wurden in der experimentellen Zellbiologie als Grundlage für ein induzierbares Dimerisierungssystem ausgewählt. Basierend auf den genannten Bindungspartnern wurde dieses Dimerisierungssystem 1993 von Schreiber & Crabtree Laboratories entwickelt (Spencer et al., 1993). Prinzipiell ist ein Dimerisierer ein membrangängiges organisches Molekül mit zwei getrennten Bindungsstellen für ein spezifisches Protein. Es wurde zunächst ein semisynthetischer Dimerisierer hergestellt, indem zwei FK506-Moleküle chemisch miteinander verbunden wurden. Dieser konnte Fusionsproteine, die eine FKBP-Domäne enthielten, dimerisieren. Das weiterentwickelte System besteht aus einem synthetischen Dimerisierer (AP20187), der endogenes FKBP nicht mehr binden kann und somit keine pharmakologische Aktivität besitzt, und einer FKBP-Domäne, bei der die entsprechende Ligandenbindungsstelle verändert wurde (Clackson et al., 1998). AP20187 bindet an FKBP mit einem Aminosäureaustausch (Phe36Val) mit einer $KD_{(\text{FKBP/AP})}$ von 50 nM. An das Wildtypprotein bindet es nur mit 1000fach geringerer Affinität. Bei Fusion einer FKBP-Domäne an ein Protein wird eine Dimerisierung desselben erreicht. Sind mehrere FKBP-Domänen an ein Protein fusioniert, so kommt es nach Zugabe des Dimerisierers zu einer Multimerisierung (s. 3.1).

Mit Hilfe dieses Modellsystems kann der Einfluss einer Dimerisierung der Cadherin-Extrazellulärdomänen auf die Cadherin-Bindung im Vergleich zu einer Oligomerisierung (Aggregat-Bildung) unabhängig von der zytoplasmatischen Cadherindomäne und deren Verbindung zum Zytoskelett und zu Signalmolekülen untersucht werden. Es kann damit geklärt werden, ob eine Cadherin-Dimerisierung für eine effektive Bindung ausreicht, oder ob eine Oligomerisierung von Cadherin-Molekülen nötig ist, wie von Yap et al. (1997) vorgeschlagen.

1.8 TRPC4 und seine mögliche Rolle bei der Regulation der VE-Cadherin-Adhäsion

1.8.1 Ca²⁺-Signale spielen bei der Regulation der Endothelpermeabilität eine große Rolle

Entzündungsmediatoren induzieren eine erhöhte Endothelpermeabilität, die - bedingt durch die Bildung interzellulärer Lücken - zur Entstehung von Ödemen führen kann (Lum & Malik, 1994; Dudek & Garcia, 2001). Dies geschieht durch Umorganisation des Zytoskeletts und Verlust funktioneller Adhärensjunktionen (Thrombin: Rabiet et al., 1996; Corada et al., 1999; Histamin: Winter et al., 1999). In beiden Fällen spielen Ca²⁺-Signale eine entscheidende Rolle. Die Ca²⁺-abhängige Depolymerisierung von F-Aktin führt dazu, dass VE-Cadherin von Aktin gelöst wird und aus dem funktionellen Adhärenskomplex herausdiffundieren kann, denn die VE-Cadherin-Transinteraktion besitzt nur eine sehr geringe Affinität ($K_D \sim 10^{-4}$ M, Baumgartner et al., 2000). Zusätzlich kann die Phosphorylierung der MLC (**M**yo**s**in **l**ight **c**hain) durch die Ca²⁺-Calmodulin-abhängige MLCK (MLC-**K**inase) zu einer lokalen Kontraktion der Endothelzelle führen, wodurch die Zellgrenzen auseinander gezogen werden (Schnittler et al., 1989; Lum & Malik, 1994; Dudek & Garcia, 2001).

Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass inflammatorische Stimuli die Endothelpermeabilität dadurch steigern, dass sie zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) von 30 - 100 nM auf das 5 - 10fache führen (Lum & Malik, 1994; Dudek & Garcia, 2001).

Dabei binden inflammatorische Mediatoren (z.B. Thrombin, Histamin oder Bradykinin) an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die über die **P**hospholipase **C** (PLC) die Bildung von **I**nositol-**t**riphosphat (IP3) induzieren. IP3 bindet an IP3-

Rezeptoren des ER und sorgt so für ein Freisetzen von Ca^{2+} aus diesem intrazellulären Ca^{2+} -Speicher. In nicht-erregbaren Zellen führt ein Entleeren des ER- Ca^{2+} -Speichers zum Öffnen spannungsunabhängiger Plasmamembran-Kationenkanäle, durch die extrazelluläres Ca^{2+} ins Zellinnere einströmt (Putney, 1999; Nilius & Droogmans, 2001). Möglicherweise sind IP₃-Rezeptoren direkt an die Plasmamembran-Kationenkanäle gekoppelt, sodass das frei gewordene Ca^{2+} unmittelbar die Öffnung dieser Kanäle verursachen kann, oder ein noch unbekannter zytoplasmatischer Faktor öffnet die Membrankanäle (Putney 1999; Nilius & Droogmans, 2001). Diesen an die Kapazität der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher gekoppelten Ca^{2+} -Einstrom bezeichnet man als „kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom“ (CCE, **capacitative Ca^{2+} entry**) und die dafür verantwortlichen Kationenkanäle als „speicherregulierte Kanäle“ (SOC, **store-operated channels**) (Nilius & Droogmans, 2001).

Die Agonist-induzierte Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erfolgt in zwei Phasen. Einer initialen Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch die Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher folgt eine Signalverstärkungsphase durch Ca^{2+} -Eintritt aus dem Extrazellulärraum (Putney, 1999; Freichel et al., 1999). Insbesondere der zweite speicheraktivierte Ca^{2+} -Einstrom durch Plasmamembran-Kanäle ist für die erhöhte Endothelpermeabilität von Bedeutung (Tiruppathi et al., 2002).

1.8.2 In Säugetierzellen agieren TRPCs als SOCs

In den letzten Jahren wurde zu den schon bekannten Drosophila TRP (**t**ransient **r**eceptor **p**otential) Kanälen eine homologe Genfamilie entdeckt, die in Säugetierzellen als SOCs fungieren (Nilius & Droogmans, 2001; Putney, 1999; Montell et al., 2005). Zurzeit sind 28 Säugetier-TRP-Isoformen bekannt (plus Splicevarianten), von denen mindestens 19 in Endothelzellen verschiedener Herkunft exprimiert werden (Yao & Garland, 2005). Diese TRP-Superfamilie wird heute in sechs Familien unterteilt: TRPC (**c**anonical), TRPV (**v**anilloid), TRPM (**m**elastatin), TRPP (**p**olycystin), TRPML (**m**ucolipin), TRPA (**a**nkyrin transmembrane proteins) (Montell, 2005). Die TRPC-Familie enthält Kationenkanäle verschiedener Ionenselektivität (Birnbaumer et al., 1996). Die sieben Isoformen der TRPC-Proteinfamilie werden nochmals in vier Familien gruppiert (Nilius & Droogmans, 2001).

1. TRPC1: SOC mit geringer Ca^{2+} -Selektivität.

2. TRPC2: eventuell bei Menschen ein Pseudogen (Montell, 2005). Das Maus-Homologe Trp2 ist ein SOC (Vannier et al., 1999).

3. TRPC3, TRPC6, TRPC7: speicherunabhängige nichtselektive Kationenkanäle.

4. TRPC4 und TRPC5: SOCs mit hoher Ca^{2+} -Selektivität.

Vier TRPCs wirken also als SOCs (TRPC1, 2, 4, 5; Hofmann et al., 2000; Vannier et al., 1999).

Funktionelle Kanäle entstehen wahrscheinlich durch Bildung von Tetrameren, die als Homo- oder Heteromultimere existieren (Birnbaumer et al., 1996). Die meisten TRPCs gehen Kombinationen innerhalb ihrer Gruppe, aber nicht mit Proteinen aus anderen Gruppen, ein (Hofmann et al., 2002; Goel et al., 2002).

1.8.3 TRPC4 ist in Endothelzellen verantwortlich für den speicherregulierten Ca^{2+} -Einstrom

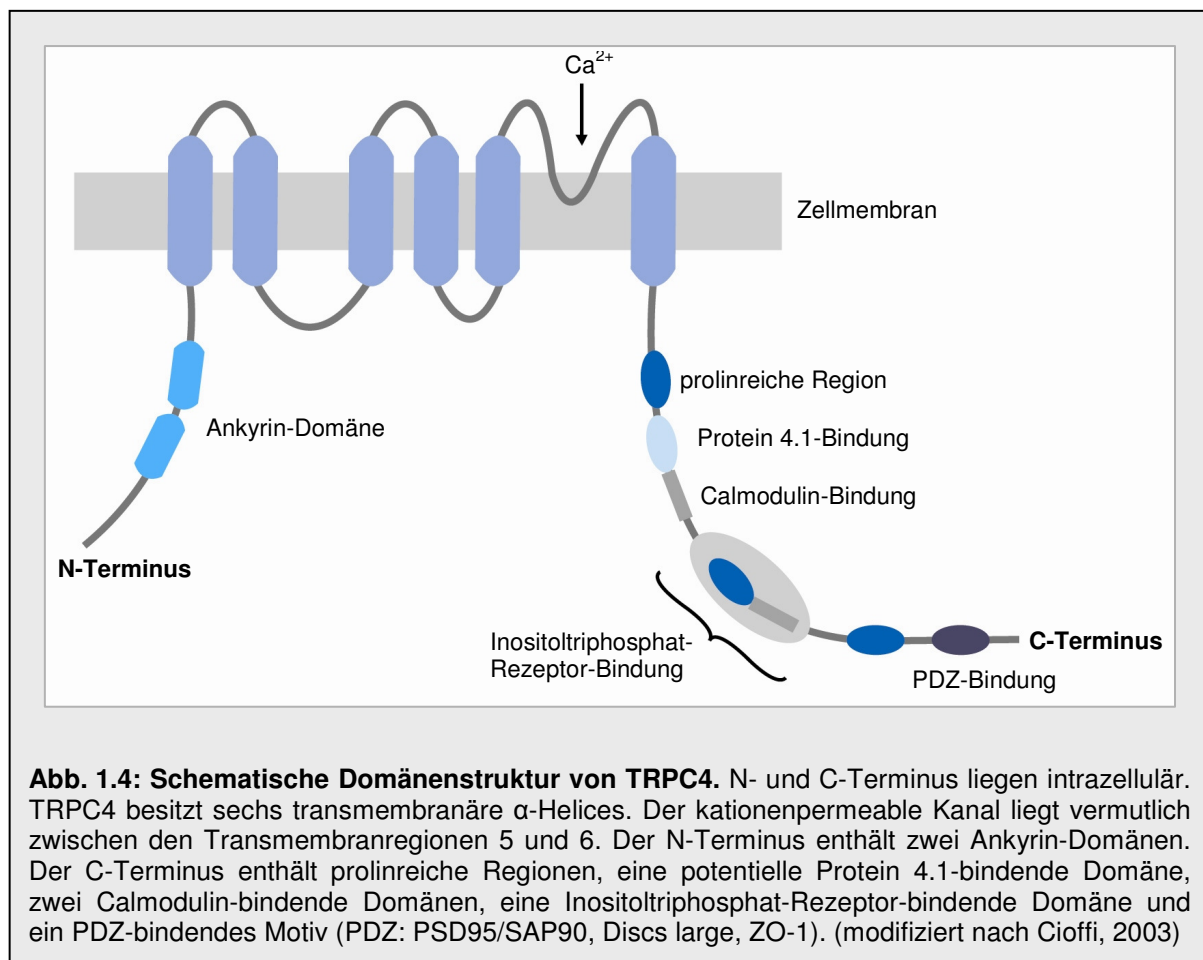
Die molekulare Basis für den speicherregulierten Ca^{2+} -Einstrom in Endothelzellen bilden hauptsächlich TRPC1 und TRPC4 (Brough et al., 2001; Cioffi et al., 2003). Freichel et al. entwickelten 2001 eine TRPC4-knockout-Maus (TRPC4^{-/-}) und zeigten, dass es bei Endothelzellen aus der Aorta von TRPC4^{-/-}-Mäusen keinen durch IP₃ ausgelösten speicherregulierten Ca^{2+} -Einstrom mehr gab, einhergehend mit einer geringeren endothelabhängigen Vasorelaxation (Freichel et al., 2001). Auch kam es in Lungenendothelzellen der TRPC4^{-/-}-Mäuse im Gegensatz zur Wildtyp-Maus nach Thrombin-Behandlung zu einer geringeren Ca^{2+} -Antwort, verbunden mit einer geringeren Steigerung der Gefäßpermeabilität und zu keiner Bildung von Aktin-Stressfasern (Tirupathi et al., 2002).

Ca^{2+} -Einstrom durch TRPCs in Endothelzellen führt durch die erhöhte Bildung vasoaktiver Botenstoffe, wie NO, EDHF (endothelial-derived hyperpolarizing factor) und Prostazyklin, zu einer endothelabhängigen Vasorelaxation. Außerdem wird die Gefäßpermeabilität erhöht und der hypoxie-induzierte Gefäßumbau angeregt (Freichel et al., 2001; Tirupathi et al., 2002).

1.8.4 Die TRPC4-Domänenstruktur lässt Rückschlüsse auf seine Interaktionspartner zu

TRPCs bestehen aus 700 - 1000 Aminosäuren. Der N-Terminus aller Isoformen enthält zwei bis fünf hoch konservierte Ankyrinbindedomänen (mögliche Interaktion mit dem Zytoskelett). Es folgen sechs transmembranäre α -Helices, von denen zwischen der fünften und sechsten die kurz eintretende Schleife liegt, die den kationenpermeablen Kanal bildet. Der C-Terminus der TRPC-Familie besitzt dagegen die größte Aminosäurevariabilität. Dort findet sich eine konservierte prolinreiche Region, die einige Serin- und Threoninreste für mögliche Phosphorylierungen enthält. Prolinreiche Regionen vermitteln in Signalkaskaden oft Protein-Protein-Wechselwirkungen (Suzuki-Inoue et al., 2002) und ihre Aktivität wird oft durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung gesteuert (Yudowski et al., 2000). Alle TRPCs besitzen eine Calmodulin-bindende Domäne, die mit einer IP3R(IP3-Rezeptor)-Bindungsstelle überlappt (Tang et al., 2001). Zusätzlich besitzen TRPC4, TRPC5 und TRPC2 eine weitere C-terminale Calmodulin-Bindungsstelle (Tang et al., 2001; Trost et al., 2001). Für TRPC4 wurde eine Interaktion mit dem IP3-R gezeigt (Mery et al., 2001). Beide Calmodulin-Bindungsstellen binden Ca^{2+} -abhängig Calmodulin (Tang et al., 2001; Trost et al., 2001). Am äußersten C-Terminus besitzen TRPC4 und 5 ein PDZ-bindendes Motiv (**PSD95/SAP90, Discs large, ZO-1**), das in keiner anderen TRPC-Isoform vorkommt (Tang et al., 2000). Mit diesem Motiv binden beide die PDZ-Domäne des NHERF (**Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor**) (Tang et al., 2000) und TRPC4 das humane Orthologe EPB50 (Mery et al., 2002). Diese Proteine interagieren über ERM-Proteine (**Ezrin-Radixin-Moesin**) mit dem Aktinzytoskelett, sodass sie TRPC4 und 5 indirekt am Zytoskelett verankern (Bretscher et al., 1997). Dazu kommt die potentielle Protein 4.1-Bindungsstelle am C-Terminus von TRPC4. Hier wurde eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen TRPC4 und Protein 4.1 nachgewiesen und gezeigt, dass Protein 4.1 wahrscheinlich über seine Bindung an Spectrin TRPC4 an das Aktinzytoskelett bindet (Cioffi et al., 2003). Spectrin ist ein Hauptbestandteil des Membranzytoskeletts. Es vernetzt F-Aktin und bindet Transmembranproteine entweder direkt oder über Ankyrin oder Protein 4.1 und unterstützt so die Anordnung der Zellmembran und intrazellulärer Kompartimente wie das ER (Devarajan et al., 1997). Die

Aktivierung von SOCs ist von einem dynamischen Aktinzytoskelett abhängig. Sowohl eine Stabilisierung als auch ein Auflösen der Aktinfilamente verhindern ihre Aktivierung (Watanabe et al., 1996; Holda & Blatter, 1997). So könnte das Spectrin-Membranzytoskelett über Protein 4.1 eine Verbindung zwischen dem ER und SOCs darstellen, die wichtig für deren Aktivierung ist. Neben diesen Domänen besitzen alle TRPCs am C-Terminus eine hoch konservierte 25 Aminosäuren lange Sequenz, die TRP-Domäne genannt wird (Nilius & Droogmans, 2001; Montell et al., 2002). Abb. 1.4 zeigt schematisch die Domänenstruktur von TRPC4.



TRPC4 wird infolge einer Stimulation von Rezeptoren aktiviert, die ihr Signal über PLC weiterleiten. Hierzu zählen zum Beispiel G-Protein(G_q)-gekoppelte Rezeptoren, die über PLC β (H1 Histaminrezeptoren, M3 Muscarin-Acetylcholin-Rezeptoren) oder Rezeptor-Tyrosinkinasen, die über PLC γ signalisieren (EGF-Rezeptor) (Schaefer et al., 2000). Es sollte erwähnt werden, dass es neben der oben beschriebenen von der Speicherentleerung abhängigen Aktivierung (Philipp et al., 1996; Philipp et al., 1998; Warnat et al., 1999; Freichel et al.,

2001; Philipp et al., 2000) auch andere Untersuchungen gibt, die gerade diesen Signalweg nicht nachweisen konnten. Es konnte allerdings auch keine alternative Aktivierung gezeigt werden (Okada et al., 1998; Schaefer et al., 2000; Schaefer et al., 2002; Strubing et al., 2001; Xie et al., 2005).

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Blutgefäße sind innen mit einem einschichtigen Verband aus Endothelzellen ausgekleidet, die die Barriere zwischen Blut und Interstitium bilden. Die Zell-Zell-Adhäsion der Endothelzellen untereinander wird durch verschiedene Zellkontakte vermittelt. Das Adhäsionsmolekül der Endothelzell-Adhärenskontakte ist das VE-Cadherin. Es ist bekannt, dass die Bindung von VE-Cadherin an das Aktinzytoskelett wichtig für die VE-Cadherin-vermittelte Adhäsion ist und dass diese Verankerung unter anderem von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängig ist.

Da weiterhin die VE-Cadherin-Transinteraktion mit geringer Affinität erfolgt, ist es möglich, dass die Stärke der Adhäsion durch Dimerisierung oder Aggregatbildung der Cadherin-Moleküle beeinflusst wird. Dabei ist unklar, ob Cadherine als Monomere eine Transinteraktion eingehen können, oder ob hierfür eine Dimerisierung oder sogar eine Oligomerisierung notwendig ist.

In dieser Arbeit soll der Einfluss der Dimerisierung und Oligomerisierung von Cadherinen unabhängig von deren Verbindung zum Zytoskelett auf die Stärke der Zelladhäsion untersucht werden. Dazu sollen VE-Cadherin-Fusionsproteine zum Einsatz kommen, bei denen die zytoplasmatische Domäne durch eine Di- oder Oligomerisierungsdomäne ersetzt wurde. Dadurch ist es möglich, die Fusionsproteine *in vivo* künstlich zu di- bzw. oligomerisieren. Mit Hilfe der Laserpinzettentechnik und Einzelmolekülfluoreszenz-Messungen sollen die Bindungseigenschaften dieser Fusionsproteine in Abhängigkeit von ihrer Di- bzw. Oligomerisierung untersucht werden. Außerdem soll ein monomeres VE-Cadherin-Fusionsprotein, bestehend aus der extrazellulären VE-Cadherin-Domäne fusioniert an eine Dimerisierungsdomäne, produziert werden, mit dem es möglich ist, die Kräfte, die VE-Cadherin-Monomere im Vergleich zu Dimeren bei Transinteraktionen aufeinander ausüben, direkt zu messen.

Des Weiteren soll in der vorliegenden Arbeit der Mechanismus näher charakterisiert werden, der die Ca^{2+} -Konzentration in direkter Nachbarschaft der

VE-Cadherin-Moleküle reguliert. Es ist bekannt, dass bei der Entzündungsreaktion, die durch Lösung endothelialer Zellkontakte mit Bildung interzellulärer Lücken gekennzeichnet ist, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration eine wichtige Rolle spielt. Verschiedene Entzündungsmediatoren führen über ein Entleeren der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher und Ca^{2+} -Einstrom durch Ca^{2+} -Kanäle der Plasmamembran zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Da TRPC4 (transient receptor potential channel 4) der vorherrschende speicherregulierte Ca^{2+} -Kanal in Endothelzellen zu sein scheint, soll hier eine mögliche Assoziation von VE-Cadherin und TRPC4 untersucht werden. Eine Assoziation von TRPC4 mit VE-Cadherin könnte noch eine weitere wichtige Konsequenz haben, nämlich durch Einstrom von Ca^{2+} aus dem engen Interzellulärspalt zu einer lokalen extrazellulären Depletion von Ca^{2+} zu führen und dadurch die Transinteraktion von VE-Cadherin auf der extrazellulären Seite zu schwächen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Versuchsmaterialien

Alle Chemikalien entsprachen dem höchstmöglichen Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen bezogen:

Acrylamid, reinst	Serva, Heidelberg
Acrylamidlösung, 40 %	Roth, Karlsruhe
Agarose	GIBCO BRL, Eggenstein
Ampizillin	Boehringer, Mannheim
Ampuwa (deionisiertes H ₂ O)	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Bacto-Agar	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Bacto-Trypton	GIBCO BRL, Eggenstein
Bacto-Yeast	BD Biosciences, Heidelberg
Bradford-Reagenz	Roth, Karlsruhe
BSA	Sigma, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blau R250	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Dimethyl-pimelimidat-dihydrochlorid (DMP)	Pierce, Rockford
Dimethylsulfoxid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, reinst	Roth, Karlsruhe
Ethanolamin	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Genitizin, G418	PAA, Cölbe
Glukose	AppliChem, Darmstadt
Glyzerin	Merck, Darmstadt
HBSS	AppliChem, Darmstadt
Kaliumazetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogensulfat	Merck, Darmstadt

Kanamycin	ICN Biomedicals Inc, Aurora
Magnesiumchlorid	AppliChem, Darmstadt
2-Morpholinoethan-Sulfonsäure (MES)	Roth, Karlsruhe
Methanol, reinst	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	privat
Natriumazetat	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Normal goat serum (NGS)	Sigma, Deisenhofen
N-propyl-gallat (NPG)	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure	AppliChem, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
TEMED (N',N',N',N'-Tetramethylethylen-diamin)	Roth, Karlsruhe
Penizillin	Sigma, Deisenhofen
Proteaseinhibitoren:	AppliChem, Darmstadt
Aprotinin	
Pepstatin	
Leupeptin	
Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
Tris	AppliChem, Darmstadt
Triton-X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	Serva, Heidelberg
Tween 20	Merck, Darmstadt

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Baysilone-Paste	GE Bayer Silicones, Wilton
Dialyseschläuche	Zellutrans; Roth Karlsruhe
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg
Fotolaborchemikalien	Kodak, Paris
Gasflammer	Gasi; Schütt, Göttingen
Gel Blotting Filterpapier	Whatman, Middlesex
Glaswaren	Schott, Wertheim
Handschuhe	Kimberly-Clark, Mainz
Frischhaltefolie	Dow, Midland

Kryoröhrchen	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Latexperlen	Interfacial Dynamics, Portland
Ni-NTA-Säulenmaterial	Qiagen, Hilden
Nitrilhandschuhe	Ansell Protective Products, Coshocton
Nitrozellulosemembran	Amersham, Braunschweig
Papier	Kimwipes; Kimberly-Clark, Mainz
Parafilm	Pechiney plastic packaging, Menasha
Petrischalen (div. Größen)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Plastikpipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Plastikreaktionsgefäße (div. Größen)	Eppendorf, Hamburg
Plastikröhrchen (div. Größen)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Polaroidfilme	Polaroid, Enschede
Protein-A-Mikroperlen	Dynal, Oslo
Protein-A-Agarose	Oncogene, Darmstadt
Fritten	Mo Bi Tec, Göttingen
Superdex 200	GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala
Spritzen	B Braun, Melsungen
Röntgenfilme	Amersham Biosciences, Buckinghamshire
Sterilfilter	Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen (T25, T75) und Platten (96 well, 12 well, 6 well, Petrischalen)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen

2.1.3 Geräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Varioklav, Oberschleißheim
Automatikpipetten	Eppendorf, Hamburg
Blot-Kammer	Sigma, Deisenhofen
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Digitalkamera	Powershot A75, Canon, Tokio
Elektrophoresekammern für	Spezialanfertigung der Fa.
Polyacrylamid-Minigele	Noras, Würzburg
Feinwaage AB 104	METTLER TOLDEO GmbH, Gießen
Fluoreszenz activated cell sorter (FACS)	Digital vantage, Becton Dickinson, Heidelberg
Folienschweißgerät	handelsübliche Haushaltsware
FPLC-System mit Dual Path Monitor UV-2	Pharmacia Biosystems, Freiburg
Gefrierschrank	Heraeus, Hanau
Gelkammern	GIBCO BRL, Keutz
Heizwasserbad	Haake Messtechnik, Karlsruhe
Kühlwasserbad	Lauda, Lauda
Magnetrührer	Janke & Kunkel, Staufen
Mikrowelle	Moulinex, Leipzig
Mikroskope:	
• Fluoreszenz-Mikroskop:	Axioskop 2 mot plus; Zeiss Hamburg
• Konfokales UV Laserscanning- mikroskop (Zeiss LSM 510):	Zeiss, Hamburg
• Optische Pinzette:	Eigenbau mit Nd:Yag-Laser (1064 nm) und NA-Objektiv (100 x 1.3, Öl; Zeiss); Mikroskop: Axiovert 135; Zeiss, Oberkochen
• Einzelmolekülfluoreszenzmikroskop:	Ar ⁺ -Laser (514 nm, C306, Coherent, CA), NA-Objektiv (PlanNeofluar, 100 x 1.3, Öl;

	Zeiss) Epifluoreszenzmikroskop (Axiovert 135TV, Zeiss Hamburg)
	CCD-Kamerasystem (Roper Scientific, Trenton, NJ; Micro Max 1300-PB)
	akustooptischer Modulator (1205 c-1 Isomet, Springfield, VA)
Netzgeräte	GIBCO BRL, Keutz
PCR-Thermocycler	Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Hanna-Instruments, Kehl am Rhein
Photometer	LKB Biochrom Ultraspec II; Pharmacia Biosystems, Freiburg
Schüttler	Unimax 2010; Heidolph, Schwabach
Sonifier 250	Branson Ultrasonics, Danbury
Spektrophotometer	LKB bromma, Muskegon
Sterilisator	Heraeus, Hanau
Thermoblock	Liebisch, Bielefeld
UV-Tisch mit UV-Kontaktlampe	Vetter GmbH, Wiesloch
	Chroma 43 (Mittelwelle 302)
Vakuumsaugpumpe	Heinse Ziller, Würzburg
Vortex-Gerät	Bender & Hobein AG, Zürich
Waage	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen/Rotoren	Tischzentrifuge 5415C; Eppendorf, Hamburg
	5804 R; Eppendorf, Hamburg
	SorvallRC5B und SorvallRC5B Plus mit Rotoren GSA und SS- 34; L-80 Ultrazentrifuge mit Rotoren; Beckmann, München
	SW 55 Ti und 50.2 Ti

2.1.4 Kulturzellen, Bakterienstämme

Chinese-Hamster-Ovary-Zellen (CHO)

"Chinese Hamster Ovary"-Zellen (CHO) wurden 1958 aus einer syrischen Hamsterart isoliert (Puck, 1958). Diese Zellen eignen sich aufgrund ihrer hohen Proliferations- und Expressionsrate besonders gut zur Transfektion.

CHO-Zellen dienen zur Sekretion des VE-Cadherin-Fc-Fusionsproteins (Gotsch et al., 1997).

MyEnd-Zellen

MyEnd-Zellen sind Endothelzellen, die aus dem Myokard der Maus präpariert und immortalisiert wurden (Golenhofen et al., 1999).

Mit TRPC4 stabil transfizierte HEK-Zellen (T4-60)

Die T4-60 HEK (**h**uman **e**mbyonic **k**idney) Zelllinie ist aus einer HEK 293 Zelllinie entstanden, die mit einem TRPC4 (**t**ransient **r**eceptor **p**otential **c**hannel 4) enthaltenden Vektor stabil transfiziert wurde (Zhang et al., 2001).

Bakterien

Chemisch kompetente E. coli **DH5 α** Bakterien wurden von der Firma Invitrogen, Carlsbad bezogen.

Genotyp: *supE44 Δ lacU169 (Φ 80lacZ Δ M15) hsdR17recA1 endA1 gyrA96thi-1 relA1*
(Hanahan, 1983)

2.1.5 Vektoren

Tab. 2.1: alle Vektoren und ihr Verwendungszweck

Vektor	Größe	Herkunft	Verwendungszweck
pBlueskriptSK ⁻ - "VE-Cadherin"	5487 bp	Navarro et al., 1995	Template für PCR
pC4-Fv1E	5371 bp	Ariad, MA, USA	Klonierung eines Expressionsvektors zur transienten Transfektion
pC4M-Fv2E	5726 bp	Ariad, MA, USA	Klonierung eines Expressionsvektors zur transienten Transfektion
pEGFP-C3	4727 bp	Clontech, CA, USA	Klonierung eines Expressionsvektors zur stabilen Transfektion
pEGFP-N3		Clontech, CA, USA	Co-Transfektion zur erleichterten Selektion
pEGFP-C3-"VE-Cadherin"			Transfektion
pEGFP-C3-"ZO-1"			Transfektion
pGEM-T Vektor	3003 bp	Promega, Madison, USA	Zwischenklonierung von PCR-Produkten
pIRES2-EGFP	5308 bp	Clontech, CA, USA	Klonierung eines Expressionsvektors zur stabilen Transfektion

2.1.6 Datenbanken und Analyseprogramme im Internet

Zur Literatursuche und Analyse von Nukleotidsequenzen dienten folgende Internetseiten:

MWG (<https://ecom.mwgdna.com/register/index.tcl>)

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

BLAST 2 sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>)

ExPASy translate tool (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>).

PeptideMass (<http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html>)

Primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)

Primerkonzepte (http://www.qiagen.com/resources/info/guidelines_for_pcr.asp)

PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=Limits&DB=PubMed>)

2.1.7 Statistische Analyse

Unterschiede der Perlenhaftung zwischen verschiedenen Versuchsansätzen wurden anhand eines zweiseitigen "student's T-Test" (Microsoft ExcelTM) beurteilt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Mittelwertabweichung angegeben. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologie

2.2.1.1 Bakterienkulturen

Alle verwendeten thermostabilen Lösungen wurden vor Gebrauch durch Autoklavieren sterilisiert (121 °C, 2 bar, 4 Stunden). Thermolabile Lösungen wurden durch Sterilfiltration entkeimt (Sterilfilter Porengröße 0,2 μm). Zur Positivselektion plasmidhaltiger Bakterien wurde den Kulturen Ampizillin oder Kanamycin (dem Plasmid entsprechend) beigefügt.

Ampizillin-Stammlösung:	100 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert
Einsatz:	100 $\mu\text{g/ml}$ LB-Medium
Kanamycin-Stammlösung:	50 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert
Einsatz:	25 $\mu\text{g/ml}$ LB-Medium

2.2.1.1.1 Anzucht von Bakterien auf Agarplatten

Der LB-Agar wurde in der Mikrowelle vorsichtig aufgeköcht und anschließend zum Abkühlen ins Wasserbad (50 °C) gestellt. Nach dem Abkühlen auf eine Temperatur ≤ 60 °C wurde das Antibiotikum zugefügt. Die Agarlösung wurde anschließend in Plastik-Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm gegossen. Nachdem die Platten getrocknet waren, wurden sie kühl gelagert

(4°C). Plattenkulturen ermöglichten die Isolation von Einzelkolonien, die zur Animpfung von Flüssigkulturen verwendet wurden. Einzelklone erhielt man entweder aus einer Glyzerinkultur durch Ausstreichen mit einer Impföse oder durch Ausstreichen einer Flüssigkultur mit einem Drigalski-Spatel. Nach dem Ausstreichen wurden die Platten bei 37°C für ca. 16 bis 18 Stunden (über Nacht) im Brutschrank inkubiert. Einzelne Kolonien wurden mit einem Zahnstocher bei Bedarf aufgenommen und in einer Flüssigkultur vermehrt. Die Agarplatten wurden mehrere Wochen bei 4°C aufbewahrt, wobei Austrocknung und Kontamination durch den Verschluss der Petrischalen mit Parafilm verhindert wurde.

LB-Agar: 10 g NaCl
10 g Bacto-Tryptone
5 g Bacto-Yeast (Casein-Hydrolysat)
15 g Bacto-Agar
ad 1 l H₂O, mit 1 N NaOH auf pH 7 einstellen, autoklaviert

2.2.1.1.2 Anzucht von Bakterien in Flüssigkulturen

Flüssigkulturen wurden zum Gewinnen von Plasmid-DNA verwendet. 5 ml LB-Medium mit Antibiotikazusatz wurden in sterile Reagenzgläser gefüllt und mit einzelnen Klonen, die entweder von einer Plattenkultur oder aus einer Glyzerinkultur stammten, angeimpft. Die Kulturen wuchsen über Nacht (16-18 Stunden) auf einem Drehrad bei 37°C.

LB-Medium: 10 g NaCl
10 g Bacto-Tryptone (Casein-Hydrolysat)
5 g Bacto-Yeast
ad 1 l H₂O, mit 1 N NaOH auf pH 7 eingestellt, autoklaviert

2.2.1.1.3 Glyzerinkulturen

Zur Lagerung über einen längeren Zeitraum wurden Glyzerinkulturen angelegt. Dafür wurde 1 ml Flüssigkultur mit 250 µl 85 % Glyzerin gut vermischt und anschließend bei -80°C gefroren und gelagert.

2.2.1.2 Arbeiten mit DNA

2.2.1.2.1 DNA-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten (Johnson & Grossman, 1977). Aufgrund der negativen Ladung der Phosphatreste bei alkalischem pH-Wert wandern Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld zur Anode. DNA-Moleküle unterschiedlicher Größe wandern

unterschiedlich schnell durch die Agarose. In dieser Arbeit wurde 0,8 %ige Agarose verwendet. Durch die Gelelektrophorese wird die DNA von Verunreinigungen wie Proteinen, Enzymen oder Salzen getrennt. Dies ist für mögliche, darauf folgende Verwendung der DNA von Bedeutung (Gelextraktion, Ligation).

Die Agarose wurde durch Aufkochen in 1 x TBE-Puffer gelöst, auf etwa 50°C abgekühlt und in einen Gelschlitten mit Probenkamm gegossen. Nach Erstarren der Agarose wurde der Gelschlitten in die mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und die DNA-Proben (1:6 mit DNA-Probenpuffer versetzt) in die durch den Probenkamm geformten Taschen pipettiert. Durch das im Probenpuffer enthaltene Glycerin kommt es zum Absinken der Proben in die Geltaschen. Außerdem ermöglicht der Probenpuffer durch die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol ein Abschätzen der Wanderungstrecke der DNA-Moleküle während der Elektrophorese. Gleichzeitig mit den DNA-Proben wurde ein DNA-Größenmarker aufgetragen. Die Gelelektrophorese lief bei einer angelegten Spannung von 80 - 130 V für 30 - 60 min.

Durch Ethidiumbromid, dessen planare Moleküle zwischen den Basenpaaren der DNA interkalieren, wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente sichtbar gemacht. Es absorbiert UV-Licht (302 nm - 366 nm) und emittiert Licht im sichtbaren Bereich (590 nm, rot-orange). Die Intensität des emittierten Lichtes ist proportional zur Menge der in der DNA interkalierten Moleküle. Daher kann man DNA sowohl im Gel sichtbar machen als auch deren Konzentration durch Vergleich mit Banden bekannter Konzentration abschätzen (s. 2.2.1.2.2).

Nach der Elektrophorese wurde das Agarosegel für etwa 10 min in einer 0,1 %igen Ethidiumbromidlösung gefärbt, anschließend auf einem UV-Tisch betrachtet und mit einer Digitalkamera fotografiert. Bei Bedarf wurden auch bestimmte DNA-Fragmente aus dem Gel geschnitten und geleluiert.

10 x TBE-Puffer:	108 g	Tris
	55 g	Borsäure
	9,3 g	EDTA, pH 8,0
	ad 1 l mit H ₂ O, mit HCl auf pH 8,3	
6 x Agarosegel-Probenpuffer:	0,2 ml	100 mM EDTA, pH 8,0
	10 g	Glycerin
	50 mg	Bromphenolblau
	50 mg	Xylencyanol
	ad 20 ml mit H ₂ O	
DNA-Größenmarker: Leon-Rot)	Lambda DNA/ <i>Eco</i> 911 (<i>Bst</i> II) Marker (Fermentas, St. mit Banden bei folgenden Fragmentgrößen in bp: 8453, 7242, 6369, 5687, 4822, 4324, 3675, 2323, 1929, 1371, 1264, 702	

2.2.1.2.2 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines quantitativen Agarosegels bestimmt. Dabei wurde die Intensität der Banden der zu untersuchenden Proben mit der Intensität der Banden eines „Mass-Ladders“ verglichen. Durch Vergleich mit einer definierten Menge von Standard-DNA entsprechender Größe kann der Gehalt der zu untersuchenden Probe abgeschätzt werden. Als Standard wurde ein DNA-Mix in definierter Zusammensetzung, der MassRuler™DNALadder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) benutzt. Alternativ wurde die DNA-Menge auch durch Vergleich mit dem Größenstandard (s.u.) abgeschätzt.

Fünf µl des Mengenstandards MassRuler™DNALadder enthalten:

50 ng eines	10.000 bp-Fragments
40 ng eines	8.000 bp-Fragments
30 ng eines	6.000 bp-Fragments
25 ng eines	5.000 bp-Fragments
20 ng eines	4.000 bp-Fragments
15 ng eines	3.000 bp-Fragments
13 ng eines	2.500 bp-Fragments
10 ng eines	2.000 bp-Fragments
8 ng eines	1.500 bp-Fragments
50 ng eines	1.031 bp-Fragments
45 ng eines	900 bp-Fragments
40 ng eines	800 bp-Fragments

2.2.1.2.3 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen oder von Reaktionsbestandteilen

Zur Gewinnung der DNA aus einem Agarosegel wurden die Fragmentbanden nach Ethidiumbromid-Behandlung zunächst im UV-Licht ausgeschnitten und die DNA-Gelextraktion mit Hilfe des DANN-Extraktion-Kit (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dafür wurden in einem 2 ml Eppendorfgefäß zu dem gewogenen Agarosegelstück das 4,5fache Volumen der Binde-Lösung und $\frac{1}{2}$ Volumenanteil TBE-Konversionspuffer pipettiert und zum Lösen 5 min unter mehrmaligem Mischen im Wasserbad auf 55°C erwärmt. Nach Zugabe von 5 µl Silikagel wurde der Ansatz erneut unter mehrmaligem Vortexen 5 min bei 55°C inkubiert. Dann wurde die Lösung 5 sek zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Silikagel mit gebundener DNA wurde 3 x mit 500 µl eiskaltem Waschpuffer gemischt, anschließend sedimentiert und der Überstand jeweils verworfen. Nach den drei Waschsritten wurde das Sediment 10 - 15 min luftgetrocknet und die DNA in 50 µl autoklaviertem H₂O eluiert. Die Lösung wurde 5 min auf 55°C erhitzt, um

die DNA quantitativ vom Silikapuder zu lösen. Schließlich wurde die danach im Wasser gelöste DNA durch Zentrifugation vom Silikapuder getrennt und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur Kontrolle und Konzentrationsbestimmung wurde ein Aliquot der DNA auf ein Agarosegel aufgetragen.

Dasselbe Reaktionskit wurde zur Reinigung der DNA von Reaktionsbestandteilen verwendet. Dabei wurden zu einem Teil Reaktionsvolumen, z.B. aus einem Restriktionsverdau oder einer PCR mit sehr kleinen verunreinigenden DNA-Bruchstücken und Enzym, drei Teile Binde-Lösung und 5 µl Silikagel (bis zu 2,5 µg DNA oder 2 µl/ 1 µg DNA) pipettiert und zum Binden der DNA unter wiederholtem Vortexen bei 55°C 5 - 10 min inhubiert. Alle daran anschließenden Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

2.2.1.2.4 Oligonukleotide

Die Sequenzen der Oligonukleotide, die für PCR und Sequenzierung Verwendung fanden, wurden soweit möglich entsprechend der Regeln für Primerkonzepte erstellt (http://www.qiagen.com/resources/info/guidelines_for_pcr.asp; Taylor, 1993). Die lyophilisiert gelieferten Oligonukleotide (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) wurden durch Zugabe von autoklaviertem H₂O jeweils auf eine Konzentration von 100 pmol/µl verdünnt. Aus dieser Stammlösung wurde die Oligonukleotidkonzentration für die anschließenden Versuche durch Verdünnen mit autoklaviertem H₂O auf 10 pmol/µl eingestellt. Die für die PCR und Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide sind im entsprechenden Abschnitt angegeben.

2.2.1.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (Mullis and Faloona, 1987; Higuchi et al., 1988) ermöglicht es, DNA-Nukleotidsequenzen *in vitro* enzymatisch zu amplifizieren. Die Methode basiert auf der exponentiellen Vermehrung eines DNA-Moleküls mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und zwei gegenläufiger, sequenzspezifischer Oligonukleotide. Die Reaktion gliedert sich in drei unterschiedliche Temperaturschritte. Zuerst erfolgt eine Denaturierung der DNA, danach ein Anlagern der DNA-spezifischen Oligonukleotide an die komplementäre

Sequenz („Annealing“) und abschließend eine Nukleotid-Kettenverlängerung („Elongation“). Diese Reaktionsschritte wurden 20-40 mal wiederholt.

Die Annealing-Temperatur kann mit einer Faustformel, die die Basenzusammensetzung der eingesetzten Oligonukleotide berücksichtigt, grob abgeschätzt werden:

$$T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T) - 2 \text{ (Suggs et al., 1981)}$$

Es wurden ca. 50-100 ng DNA mit PCR-Supermix versetzt, sodass sich ein Gesamtvolumen von 50 µl ergab. Darauf folgte die Durchführung des für die jeweiligen Primerpaare spezifischen PCR-Programms in einem PCR-Thermocycler.

Nach initialer Denaturierung der DNA für 2 min bei 98 °C wurden 21-35 Zyklen, bestehend aus 30 sek 95 °C (Denaturierung), 30 sek Primeranlagerung (Annealing, diese Temperatur ist primerspezifisch, siehe Tab. 2.1) und 45 sec bei 72 °C Kettenverlängerung, durchgeführt. Bei der letzten Kettenverlängerung (Elongation) wurde 5 min bei 72 °C inkubiert, um vollständige doppelsträngige PCR-Fragmente zu erhalten. PCR-Produkte wurden bei -20 °C gelagert.

PCR-Standard-Supermix:

Komponenten	Volumen
10 x PCR-Puffer (s.u.)	5 µl
dNTP Mix (MBI Fermentas)	1 µl
3`-Oligonukleotid (100 pmol/µl)	0,5 µl
5`-Oligonukleotid (100 pmol/µl)	0,5 µl
Pfu-Polymerase (2,5 u/µl, MBI Fermentas)	1 µl
Template (DNA)	0,5 - 4 µl
autoklaviertes H ₂ O	ad 50 µl

10 x PCR-Puffer mit MgSO₄: 200 mM Tris-HCl (pH 8,8)
 100 mM (NH₄)₂SO₄
 100 mM KCl
 20 mM MgSO₄
 1% Triton X-100
 1 mg/ml BSA

Der dNTP-Mix enthielt jedes Nukleotid in 10 mM Konzentration.

Tab. 2.2: für die PCR verwendete Oligonukleotide

	Produkt	Oligonukleotidsequenz (Restriktionsstellen fett gedruckt)	Annealing-Temperatur	Fragmentgröße
1	<i>EcoRI</i> -VE-ECTM(1932)- <i>XbaI</i>	5`-CCG- GAA-TTC -ATG-CAG-AGG-CTC-ACA-CAG-3` 5`- TCT-AGA -ATG-AGC-ATG-CGC-CTG-CTT-CCG-3`	54 °C	1873 bp
2	<i>NheI</i> -VE- ECTM-2FKBP- <i>PstI</i>	5`- AGC-TAG-CCA -TGC-AGA-GGC-TCA-CAG-AGC-3` 5`-CTC- CTG-CAG -TTA-TGC-GTA-GTC-TGG-TAC-GTC-3`	58 °C	2654 bp
3	<i>EcoRI</i> -VE-EC(1821)- <i>XbaI</i>	5`-CCG- GAA-TTC -ATG-CAG-AGG-CTC-ACA-CAG-3` 5`- TCT- AGA -CTG-GGC-TGC-CAT-CTC-CTC-3`	54 °C	1794 bp

2.2.1.2.6 Isolierung doppelsträngiger Plasmid-DNA

Die Plasmid-Minipräparation wurde mit Hilfe eines Reaktionssatzes von NucleoSpin, Marchery-Nagel (Düren) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. 2 ml einer 5 ml Übernachtskultur wurden zweimal bei 11 000 x g 30 sek zentrifugiert. Es bildete sich hierbei ein Bakteriensediment am Boden des Röhrchens. Das Bakteriensediment wurde mit 250 µl Lösung A1 resuspendiert. Lösung A1 enthält Lysozym, das die Bakterienzellwände perforiert und die in den Bakterien enthaltene RNA durch die enthaltene RNase A verdaut. Anschließend wurden 250 µl Lösung A2 hinzugegeben, um die Zellen alkalisch zu lysieren, und das Reaktionsgefäß vorsichtig mehrere Male invertiert. Die Lysereaktion mit Lösung 2 durfte nicht länger als fünf Minuten andauern. Die Zugabe von 300 µl Stopplösung A3 bewirkte durch die eintretende pH-Neutralisierung die Präzipitation von Proteinen, chromosomaler DNA und anderer Zellbestandteile. Die folgende Zentrifugation von 10 min bei 11 000 x g trennte das Präzipitat von der DNA-haltigen Lösung.

Der Überstand wurde in ein NucleoSpin-Plasmid-Gefäß überführt, das in einem Auffanggefäß platziert war. Bei der anschließenden Zentrifugation (1 min, 11 000 x g) wurde die DNA von dem NucleoSpin-Säulenmaterial gebunden, der Durchfluss wurde verworfen. Es folgten zwei Waschschrte: 500 µl auf 50 °C mit erwärmter Lösung AW und 600 µl Lösung A4 wurden auf die Säule pipettiert und jeweils 1 min bei 11 000 g zentrifugiert. Danach wurde das Säulenmaterial durch eine weitere Zentrifugation von 2 min bei 11 000 x g getrocknet. Zur Elution der immobilisierten DNA wurden 50 µl autoklaviertes H₂O auf die Säule appliziert und nach einer Inkubation von 1 min nochmals 2 min bei 11 000 x g zentrifugiert. Das Eluat wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß aufgefangen, in das die NucleoSpin-Säule zuvor platziert worden war.

2.2.1.2.7 Annealing zweier Oligonukleotide

Die lyophilisiert gelieferten Oligonukleotide wurden in TE-Puffer zu einer Endkonzentration von 100 pmol/µl gelöst. 1 µl jedes Oligonukleotids wurde in einem Reaktionsgefäß gemischt und mit TE-Puffer auf 20 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde in einem PCR-Thermocycler jeweils 10 min bei 80 °C, 60 °C, 40 °C und 20 °C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Nun

konnten die annealten Oligonukleotide (4 µl) mit einem vorher linearisierten und aufgereinigten Vektor ligiert und transformiert werden .

TE-Puffer: 10 mM Tris, pH 8
1 mM EDTA, pH 8

Tab. 2.3: Oligonukleotide zum Einfügen eines His6-tags

Produkt	Oligonukleotidsequenz (Restriktionsstellen fett gedruckt)	Fragment- größe	Annealing- Temperatur
<i>SpeI</i> -7xAlanin-6xHistidin- Stop- <i>SalI</i> - <i>PstI</i> - <i>XhoI</i>	5'- CTA-GTG -CTG-CCG-CAG-CGG-CTG- CCG-CAC-ATC-ACC-ACC-ATC-ACC- ATT-AAG- TCG-ACC-TGC-AGC -3' 5'- TCG-AGC-TGC-AGG-TCG-ACT -TAA- TGG-TGA-TGG-TGG-TGA-TGT-GCG- GCA-GCC-GCT-GCG-GCA-GCA3'	60 bp	>75°C

2.2.1.2.8 Restriktion von DNA

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme erkennen 4 bis 8 bp-Sequenzen, die man Restriktionsschnittstellen nennt. Diese sind meist kurze palindromische Sequenzen. Manche Restriktionsenzyme schneiden „gerade“ und bilden „blunt ends“, andere schneiden so, dass überhängende Einzelstränge entstehen, so genannte „sticky ends“.

Die Restriktion von DNA wurde in 10 µl Gesamtansatz durchgeführt. Dabei sollte die Enzymmenge nicht mehr als 10% des Gesamtvolumens betragen, da das im Enzympuffer enthaltene Glycerin die Enzymaktivität verringert. Zu 2-3 µg der DNA kamen 3-5 U/µg DNA des betreffenden Enzyms sowie 1 µl des entsprechenden zehnfach konzentrierten Reaktionspuffers. Mit autoklaviertem H₂O wurde das Reaktionsvolumen auf 10 µl aufgefüllt. Die Inkubationsdauer betrug 1,5 - 2 h bei 37°C. In einem Agarosegel wurde der Erfolg der Restriktion überprüft. Sollte durch die Restriktion ein DNA-Fragment für die Ligation gewonnen werden, so wurde ein entsprechend größeres Reaktionsvolumen gewählt und das gewünschte Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel wieder aus diesem eluiert.

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sind in Tab. 2.4 zusammengefasst.

Tab. 2.4: verwendete Restriktionsenzyme und Puffer (Fermentas, St. Leon-Rot)

Enzym	Erkennungssequenz	Puffer
<i>EcoRI</i>	G↓AATTC	<i>EcoRI</i> - oder Tango-Puffer
<i>BamHI</i>	G↓GATCC	<i>BamHI</i> -, Tango-, Green-Puffer
<i>NheI</i>	G↓CTAGC	Tango-Puffer
<i>PstI</i>	CTGCA↓G	Orange- oder Tango-Puffer
<i>SmaI/BcuI</i>	A↓CTAGT	Tango-Puffer
<i>XhoI</i>	C↓TCGAG	Red- oder Orange-Puffer

2.2.1.2.9 Ligation

Ligasen sind Enzyme, die zwei DNA-Fragmente, von denen eines eine 3'-OH-Gruppe und das andere eine 5'-Phosphatgruppe besitzt, miteinander verknüpfen können. Man verwendet die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4.

Vektor und Insert wurden zur Vorbereitung mit den gleichen Enzymen geschnitten. Nach Möglichkeit erfolgte die Restriktion mit zwei unterschiedlichen Enzymen, am 3'-Ende mit einem anderen Enzym als am 5'-Ende, um eine ungewollte Religation des Vektors zu verhindern. In einem Standard-Ligationsansatz wurden 50-100 ng Vektor-DNA und die vier- bis sechsfach molare Menge des zu klonierenden DNA-Fragmentes eingesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug in allen Fällen nicht mehr als 20 µl und enthielt neben der DNA 1U T4-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot), zehnfach konzentrierten T4-Puffer und Wasser bis zum Erreichen des Reaktionsvolumens. Die Ligation fand über Nacht bei 16°C statt.

Tab. 2.5: verwendete Vektoren

Vektor	Resistenz
pC4-Fv1E (pA1)	Ampizillin
pC4M-Fv2E (pA2)	Ampizillin
pEGFP-C3	Kanamycin/Genitizin
pGEM-T Vektor	Ampizillin
pIRES2-EGFP	Kanamycin/Genitizin

2.2.1.2.10 Transformation von Bakterien mit Plasmiden

Für Transformationen wurden MAX Efficiency DH5αTM Competent Cells (Invitrogen, Carlsbad) verwendet. Diese chemisch kompetenten Zellen wurden bei -80°C gelagert und kurz vor Benutzung auf Eis aufgetaut. Zur Transformation wurden 50 µl Bakterien und 1/5 des Ligationsansatzes gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz 30 sek zum Hitzeschock auf 42°C erhitzt und danach sofort wieder 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 950 µl SOC-Medium wurden die transformierten Bakterien auf einem Drehrad bei 37°C für eine Stunde bewegt. 200 µl dieser Suspension wurden auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausplattiert. Die restlichen 800 µl wurden bei 2000 x g 5 min zentrifugiert, das Bakteriensediment in etwa 100 µl Medium resuspendiert und auf einer zweiten Platte ausplattiert. Von über Nacht bei 37°C gewachsenen Klonen wurden am folgenden Tag 5 ml Flüssigkulturen

angesetzt und von den angereicherten Bakterien die Plasmid-DNA, wie unter 2.2.1.2.6 beschrieben, isoliert.

SOC-Medium: 20 g Bacto-Tryptone (Casein-Hydrolysat)
 10 g Bacto-Yeast
 0,5 g NaCl
 ad 1 l mit H₂O, 10 ml 250 mM KCl zugegeben auf pH 7, autoklaviert
 auf 1 l Medium + 20 ml 1 M Glukoselösung, steril filtriert

2.2.1.2.11 Analyse positiver Plasmide durch Sequenzierung

Nach Isolierung der Plasmid-DNA wurde durch einen analytischen Restriktionsverdau festgestellt, ob das gewünschte Ligationsprodukt gebildet worden war. Positiv identifizierte Plasmid-DNA wurde sequenziert, um sie abschließend zu prüfen. Sequenzierungen wurden von MWG-Biotech AG (Ebersberg) durchgeführt. Dazu wurden 1-2 µg der DNA-Probe lyophilisiert und zusammen mit 25 µl der zu verwendenden Oligonukleotide (10 pmol/µl) an MWG gesandt (<https://ecom.mwgdna.com/register/index.tcl>). Die erhaltene Sequenz wurde computerunterstützt mit entsprechend bekannten Sequenzen verglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Die Sequenz größerer DNA-Fragmente wurde durch überlappende Sequenzierungen verifiziert.

Tab. 2.6: bei der Sequenzierung verwendete Oligonukleotide

Anlagerungsstelle	Oligonukleotidsequenz
Ariad1forward bp574	5'-TGA-CCT-CCA-TAG-AAG-ACA-CC-3'
Ariad1reverse bp31	5'-GTC-CGC-CCG-GTA-AAT-GGC-AT-3'
pIRESfor bp427	5'-AAG-TCT-CCA-CCC-CAT-TGA-CG-3'
pIRESrev bp705	5'-CTT-ATT-CCA-AGC-GGC-TTC-G-3'
VE-for2 bp538	5'-ACC-TCT-GTC-ATC-CGT-GTG-3'
VE-for3 bp1042	5'-TAC-ATT-GAG-GCC-ACA-GAC-3'
VE-for4 bp1543	5'-GCA-ACA-GAC-AAG-GAT-GTG-3'

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Routinekulturen

Die Zellkulturhaltung erfolgte als offenes System in einem CO₂-Auto-Zero-Brutschrank bei 37°C, ca. 80% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂. Als Kultivierungsmedien dienten DMEM (**D**ulbeccos **m**odified **E**agle **m**edium) und αMEM (**α**-modified **E**agles **m**edium). Das Medium wurde in fertigen Pulvermischungen geliefert, für den Gebrauch in H₂O gelöst und durch Zugabe von NaHCO₃ gepuffert (pH 7,5). Das Medium wurde steril filtriert und anschließend mehrere Monate bei 4°C gelagert. Vor dem Gebrauch wurde das Medium mit 3 ml Penizillin-G/Streptomycin und 10% FCS supplementiert.

Pen/Strep-Stammlösung: je 10 000 U Penizillin und Streptomycin pro 1000 ml PBS, pH 5,58

2.2.2.1.1 CHO-Routinekultur

Die in T25-Kulturflaschen mit 5 ml α MEM gehaltenen CHO-Zellen wurden etwa alle 2-5 Tage passagiert. Dafür wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Im Falle der T25-Kulturflasche wurden 1,5 ml Trypsin-Lösung zugegeben (andere Kulturgrößen siehe Tabelle 2.7). Die Zellen lösten sich nach etwa 5 min Inkubation bei 37°C im Brutschrank. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte durch Zugabe von 3,5 ml α MEM + 10% FCS. Die Zellen wurden durch vorsichtiges Spülen und Ansaugen mit der Pipette resuspendiert und anschließend - nach Bedarf - im Verhältnis 1:10, 1:20 oder 1:50 in neue Kulturgefäße überführt. Für immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen oder für Versuche an der Laserpinzette wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Mindestens jeden zweiten Tag wurde das Kulturmedium erneuert. Die Expression rekombinanter VE-Cadherin-Moleküle wurde in CHO-Zellen durchgeführt.

Trypsin-Lösung: 0,05 % Trypsin
 0,02 % EDTA
 in PBS, pH 7,2

Tab.2.7: Kulturgrößen

Kulturgefäß	Grundfläche	Mediummenge	Trypsinmenge
96 well	0,32 cm ²	200 μ l	50 μ l
12 well	3,83 cm ²	1 ml	300 μ l
6 well	9,4 cm ²	2 ml bzw. 3 ml	500 μ l
T 25	25 cm ²	5 ml bzw. 10 ml	1,5 ml
T 75	75 cm ²	10 ml bzw. 20 ml	3 ml

2.2.2.1.2 MyEnd-Routinekultur

Diese Zelllinie benötigte einen ausreichenden hydrostatischen Druck für optimales Wachstum. Das wurde durch das Verwenden von mehr Medium erreicht (s. Tabelle 2.7 größere Mediummengen). Die Kulturflaschen wurden außerdem vor Gebrauch gelatiniert. Der Medienwechsel erfolgte alle zwei Tage. Die Zellen waren bereits einen Tag nach dem Aussäen konfluent, wurden aber dennoch nur einmal pro Woche im Verhältnis 1:3 geteilt. Vor der etwa zehnminütigen Trypsin-Inkubation wurden sie nicht nur mit PBS, sondern auch kurz mit Trypsin-Lösung gewaschen und niemals durch Klopfen zum Ablösen gebracht. MyEnd-Zellen wurden in verschiedenen Konfluenz- und Reifestadien für die Fluoreszenzmikroskopie und zur Herstellung von Zelllysaten für die Immunoblotanalyse verwendet. Deckgläschen mussten vor dem Aussäen der Myoendothelzellen gelatiniert und die Gelatine mit Glutaraldehyd quervernetzt werden (s. 2.2.2.2).

2.2.2.1.3 T4-60-Routinekultur

Diese Zellen wurden in DMEM mit einem Zusatz von 0,178 g/l Genitizin (G418) in T25-Kulturflaschen kultiviert und alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:3 oder 1:5 geteilt. T4-60-Zellen lösten sich schon nach einminütiger Trypsin-Behandlung. Für immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden T4-60-Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgesät (s. 2.2.2.2), um sie am darauf folgenden Tag zur Messung von VE-Cadherin-TRPC4-Interaktionen zu transfizieren.

2.2.2.2 Vorbehandeln von Kulturschalen und Deckgläschen

2.2.2.2.1 Gelatinieren von Kulturschalen

Bevor MyEnd-Zellen in neue Kulturschalen überführt wurden, wurden diese gelatinisiert. Dafür wurde der Boden der Kulturflaschen mit Gelatine-Lösung bedeckt. Nach 30 min wurde die Gelatine-Lösung abgesaugt, die Flasche zweimal mit PBS gewaschen und danach Medium vorgelegt.

Gelatine-Lösung: 0,5 % Gelatine in H₂O bei 60°C lösen, autoklavieren

2.2.2.2.2 Quervernetzen der Gelatineschicht auf Deckgläschen

Die Deckgläschen für MyEnd-Zellen wurden in H₂O mit einer Spatelspitze EDTA aufgekocht und nochmals zweimal in frischem H₂O zum Kochen gebracht. Danach wurde 30 min unter sterilen Bedingungen mit Gelatine-Lösung inkubiert. Die Gelatine-Lösung wurde abgesaugt, und die Deckgläschen wurden 30 min mit 2 % Glutaraldehyd in PBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen mit quervernetzter Gelatine in PBS mit Penizillin-Streptomycin bei 4 °C aufbewahrt.

Gelatine-Lösung: 0,5 % Gelatine in H₂O bei 60°C lösen, autoklavieren

Glutaraldehyd: 2 % Glutaraldehyd in PBS

PBS, Pen/Strep: 100 ml PBS und 1 ml Penizillin-Streptomycin-Lösung

Pen/Strep-Stammlösung: je 10 000 U Penizillin und Streptomycin pro 1000 ml PBS, pH 5,58

2.2.2.2.3 Beschichtung von Deckgläschen mit Poly-L-Lysin

Deckgläschen wurden in Alufolie verpackt im Sterilisator sterilisiert (180°C, 4h), danach steril in Schalen verteilt und mit einer Poly-L-Lysin Gebrauchslösung 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen dreimal mit sterilem PBS gewaschen.

Poly-L-Lysin

Stammlösung: 5 mg/ml Poly-L-Lysin in sterilem H₂O (bei -20°C lagern)

Gebrauchslösung: 40 µg/ml (bei 4°C lagern), die Lösung wurde mehrere Male benutzt

2.2.2.3 Kryokonservierung von Zellen (Einfrieren, Auftauen)

Je häufiger eine Zelllinie passagiert wird, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass es zu morphologischen und genomischen Veränderungen der Zellen kommt. Alle Zelllinien wurden deshalb regelmäßig kryokonserviert und bei Bedarf rekultiviert.

2.2.2.3.1 Einfrieren von Zellen

Die Zellen einer konfluenten T75-Kulturflasche wurden durch Trypsinbehandlung abgelöst und bei 150 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment in 3 ml vorgekühltem Einfriermedium, das 10 % des kryoprotektiven Dimethylsulfoxid (DMSO) enthielt, resuspendiert. Da DMSO bei Raumtemperatur toxisch an den Zellen wirkt (Zerstörung der Membranen), wurde zügig gearbeitet. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und für eine Woche in einer Einfrierbox bei -80°C, danach in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfriermedium: 90 % Medium entsprechend der Zelllinie (mit 10 % FCS)
10 % DMSO

2.2.2.3.2 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen in ein 37°C warmes Wasserbad gehalten. Dann wurde die Zellsuspension zum schnellen Verdünnen des DMSO in 10 ml Medium getropft und zentrifugiert (150 x g, 5 min). Die abzentrifugierten Zellen wurden in 5 ml frischem Medium resuspendiert und in einer T25-Kulturflasche ausgesät. Am folgenden Tag wurden tote Zellen durch Mediumwechsel entfernt.

2.2.2.4 Transfektion

Die Transfektion eukaryontischer Zellen erfolgte mit Effectene (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Bei dieser Form der Transfektion wird die DNA mit Hilfe von Micellen durch Verschmelzen mit den Zytoplasmamembranen in die Zellen befördert.

Die Zellen wurden auf 6-well-Platten ausgesät und bei einer Dichte von 70-80 % transfiziert. Dafür wurde etwa 1 µg DNA, ~10 µl einer Plasmid-DNA-Minipräparation, eingesetzt. Diese wurden mit EC-Puffer auf 150 µl aufgefüllt und 16 µl Enhancer dazu pipettiert. Der Ansatz wurde mit einem Vortex-Gerät 10 sek gemischt, danach herunterzentrifugiert und 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden 20 µl Effektene zugegeben, 10 sek auf dem Vortex-Gerät gemischt, herunterzentrifugiert und 10 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde bei den Zellen das Medium entfernt und 1,5 ml frisches Medium zugegeben. Schließlich wurden 600 µl des Mediums zu dem Transfektionsansatz pipettiert, mit diesem vermischt und zurück auf die Zellen getropft. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen fixiert oder zur Selektion stabil transfizierter Zellen mit frischem genitizinhaltigen Medium versetzt. Als weitere Hilfe zur Selektion enthält der Vektor „pIRES“ ein GFP-Gen (**G**reen **F**luorescent **P**rotein), mit ihm transfizierte Zellen fluoreszieren demnach grün. Außerdem besitzt dieser Vektor eine interne ribosomale entry-side (IRES) zwischen der MCS (**m**ultiple **c**loning **s**ide) und dem GFP-Gen, d.h. das gewünschte Protein und das GFP-Signal werden von einer einzigen bizistronischen mRNA translatiert. Da bei pEGFP-C3⁻-VE-ECTM-1xFKBP das Insert ein Stop-Codon enthielt, wurde dem Protein kein GFP-Signal angehängt. Die transfizierten Zellen zeigten deshalb keine Fluoreszenz. Daher wurde zur Identifizierung und Selektion transfizierter Zellen die Transfektion des gewünschten Plasmids in Gegenwart des GFP-kodierenden Vektors pEGFP-N₃ durchgeführt.

Verwendete Plasmide:

- pVE-ECTM-A1 (s. 3.1.1.1)
- pVE-ECTM-A2 (s. 3.1.1.1)
- pEGFP-C₃⁻-VE-CadherinECTM-1FKBP (s. 3.1.1.2)
- pEGFP-N₃-Leervektor
- pIRES VE-CadherinECTM-2FKBP (s. 3.1.1.2)
- pIRES VE-CadherinEC-1FKBP-Ala-His (s. 3.2.1)
- pEGFP-C₃⁻-VE-Cadherin
- pEGFP-C₃⁻-ZO1

2.2.2.5 Generierung stabiler Zellklone

Bei transient transfizierten Zellen liegen die transfizierten Plasmide im Zytoplasma, werden bei Zellteilungen nicht repliziert und gehen somit im Laufe der Zellteilungen verloren. Bei stabil transfizierten Zellen ist das transfizierte Konstrukt in das Genom der Zellen integriert, sodass es bei Zellteilungen mitvermehrt wird und eine neue Zelllinie entsteht, die kontinuierlich das gewünschte Protein exprimiert.

Um eine stabile Zelllinie zu erhalten, wurden die Zellen zunächst wie oben beschrieben transfiziert. Ein konfluentes Well, in dem unter einem Fluoreszenzmikroskop grün leuchtende transfizierte Zellen identifiziert worden waren, wurde in einem sehr hohen Verhältnis gesplittet, sodass einzelne Zellklone in den neuen 6-Well als Zellinseln abgrenzbar wurden. Um solche grün leuchtende Zellklone herumliegende Zellen wurden unter sterilen Verhältnissen mit Hilfe eines Zellschabers entfernt, die so selektierten Klone trypsinisiert und in ein neues Well überführt. Da die Entfernung nicht-transfizierter Zellen nur unvollständig erfolgen konnte, wurden die „verunreinigten“ Klone zu konfluenten T75-Flaschen hochgezogen und anschließend mit Hilfe eines FACS (Fluoreszenz activated cell sorter) nur die grün fluoreszierenden Zellen auf einer 96-Well-Platte vereinzelt.

Bei Konfluenz wurden etwa 20 Klone auf 6-well-Platten umgesetzt, um sie im Folgenden durch Immunfluoreszenz und Immunoblot auf die Expression und korrekte subzelluläre Lokalisation des entsprechenden Proteins zu überprüfen. Mit diesen Techniken wurde schließlich der beste Klon für die folgenden Versuche ausgewählt und kryokonserviert.

Zur Selektion und zum Verhindern eines Hochwachsens von nicht transfizierten Zellen wurden die selektierten Zellklone weiterhin mit Genitizin im Kulturmedium (1,2 µg G418/ml Medium) kultiviert.

Genitizin-Stammlösung: 50 µg G418/ml steriles H₂O
Genitizin-Endkonzentration: 1,2 µg/ml Medium

2.2.2.6 Herstellen von Zelllysaten

2.2.2.6.1 Herstellung von trypsinisierten Zelllysaten

Konfluente Zellen aus einer 6-well-Platte wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin abgelöst. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 150 x g zentrifugiert und die Zellen in 100 µl 1 x Probenpuffer (s. 2.2.3.2) lysiert. Um die chromosomale DNA zu zerkleinern, wurde das Lysat in einem Sonifier mit 30 Pulsen beschallt. So konnte die Suspension für eine Amidoschwarz-Proteinbestimmung (s. 2.2.3.1.2) oder eine Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet werden. Für das Lösen der Zellen wurden drei verschiedene Trypsin-Lösungen verwendet:

Trypsin mit EDTA (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS)

Trypsin ohne EDTA (0,05 % Trypsin in PBS)

Trypsin mit Ca²⁺ (0,05 % Trypsin, 1,2 mM CaCl₂ in PBS)

2.2.2.6.2 Herstellung von Zelllysaten durch Ablösen mit einem Zellschaber

Konfluente Zellen aus einer 6-well-Platte wurden mit PBS gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS wurden 100 µl 1 x Probenpuffer zugegeben, und die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden gelöst. Das Zelllysate wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und nach der Beschallung entsprechend weiterverwendet (s. 2.2.2.6.1).

2.2.3 Biochemie

2.2.3.1 Proteinbestimmung

2.2.3.1.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Das Prinzip der Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976) beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie-brilliant-Blau (G-250) in saurer Lösung (Bradford-Reagenz, Roth, Karlsruhe) von 465 nm auf 595 nm durch Bindung von Protein. Diese Änderung kann photometrisch bestimmt werden. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist im Bereich von 0-1 mg/ml proportional zur Proteinkonzentration. Mit Hilfe eines Mengen-Standards (bekannte Proteinkonzentrationen von 0-1 mg/ml BSA in PBS) konnte so die Proteinkonzentration von Eluaten bestimmt werden.

10 µl der Proteinlösung wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz gemischt und die Absorption bei 595 nm nach einer zehnmütigen Inkubation gemessen. Aus

einer mit Hilfe der Standards erstellten Eichkurve konnte die Konzentration der Proben im Bereich von 0-1 mg/ml abgelesen werden. Zu stark konzentrierte Lösungen wurden entsprechend verdünnt und erneut gemessen.

2.2.3.1.2 Proteinbestimmung mit Amidoschwarz-Färbelösung

Diese Methode (Zlatanova et al., 1994) erlaubt im Gegensatz zu dem Verfahren nach Bradford eine genaue Proteinbestimmung auch in Anwesenheit hoher Konzentrationen an Detergentien oder Salzen und ermöglicht so die Messung von Proben, die in SDS-Probenpuffer gelöst sind.

Zuerst wurde eine Zelluloseazetatfolie in 1 cm² große Felder aufgeteilt und mit zwei Metallklammern frei schwebend aufgehängt. Je 5 µl der mit SDS-Probenpuffer versetzten Proben wurden auf ein entsprechend beschriftetes Feld aufgetragen. Als Proteinstandard wurde BSA in den Konzentrationen 1,25; 2,5; 5; 10; 20 und 40 µg pro 10 µl analog eingesetzt. Nach dem Trocknen wurden die Foliestreifen 10 min in der Amidoschwarz-Färbelösung auf dem Schüttler gefärbt. Mit Entfärber wurde durch mehrfaches Wechseln so lange entfärbt, bis der Hintergrund wieder weiß war. Die Zelluloseazetatfolie wurde in der Luft hängend gut getrocknet, bevor die Felder auseinander geschnitten und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit je 1 ml Auflöselösung 30 min im 50°C Wasserbad inkubiert wurden. Die Folie löste sich dabei vollständig auf und die Absorption wurde bei 620 nm im Photometer gemessen. Mit Hilfe des Standards wurde die Proteinkonzentration errechnet.

Amidoschwarz-Färbelösung:	2,5 g	Amidoschwarz
	225 ml	Methanol
	225 ml	H ₂ O
	50 ml	100 % (v/v) Essigsäure
Entfärber:	237,5 ml	Methanol
	237,5 ml	H ₂ O
	25 ml	100 % Essigsäure
Auflöselösung:	10 g	Trichloressigsäure
	80 ml	100 % Ameisensäure
	10 ml	100 % Essigsäure

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das Prinzip der von Laemmli (1970) beschriebenen **Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese** (SDS-PAGE) basiert auf der Trennung von Proteinen durch den Molekularsieb-Effekt einer polymerisierten Gelmatrix aus Acrylamid und Bisacrylamid. Durch das im Probenpuffer und im Gel enthaltene SDS werden die Proteine denaturiert und mit negativen Ladungen besetzt,

sodass sie nach Anlegen der Spannung in Richtung Anode wandern und dabei ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch ein vorgeschaltetes Sammelgel niedriger Dichte und mit niedrigerem pH-Wert als das Trenngel werden die Proben zunächst durch Isotachophorese am Übergang Sammelgel/Trenngel gestapelt. Erreichten die Folgeionen (Glycylionen) diesen Übergang, so ist der Spannungsgradient zwischen Leit- (Cl⁻-Ionen) und Folgeionen, der die Stapelung bewirkte, aufgehoben und die Proteine werden nun vom gleichen Startpunkt aus im Trenngel nach ihrer Größe aufgetrennt.

Die Flachbettgele wurden zwischen zwei Glasplatten, die durch ca. 1 mm dicke Abstandhalter voneinander getrennt und in einer Halterung eingespannt waren, gegossen. Die Polymerisierung der Gele wurde durch **Ammoniumpersulfat** (APS) initiiert und **Tetramethylethyldiamin** (TEMED) diente als Katalysator. Zunächst wurde die 10 %ige Trenngellösung zwischen die Platten gefüllt und mit Wasser überschichtet, um Sauerstoff fernzuhalten und für eine gerade Oberfläche zu sorgen. Nach dessen Polymerisation wurde das Wasser wieder entfernt, das 5 %ige Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Taschenkamm, der für das Einfüllen der Proben für Aussparungen im Sammelgel sorgte, eingesetzt.

Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 3:1 mit dreifach konzentriertem Probenpuffer mit DTT (**Dithiothreitol**, spaltet intra- bzw. intermolekulare Disulfidbrücken) vermischt und für 5 min auf 56°C erhitzt. Der Auftragspuffer enthielt Glycerin, damit die Gesamtprobe durch ihre höhere Dichte in die Taschen sank, und den Farbstoff Bromphenolblau zum visuellen Verfolgen des Auftrags- und Elektrophoreseprozesses. Es wurde immer auch ein Größenmarker aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in 1 x Elektrophoresepuffer bei einer Spannung von 80 V im Sammelgel und bis zu 180 V im Trenngel durchgeführt, bis die durch den Farbstoff markierte Lauffront aus dem Gel herausgelaufen war. Anschließend wurde das Gel entweder für einen Immunoblot genutzt oder mit Coomassie angefärbt.

Sammelgellösung

für 2 Gele:	3,1	ml	H ₂ O
	0,6	ml	30 % Acrylamid
	1,3	ml	0,5 M Tris, pH 6,8
	50	µl	10 % SDS
	15	µl	APS
	7,4	µl	TEMED

Trenngellösung			
für 2 Gele:	4,05	ml	H ₂ O
	3,35	ml	30 % Acrylamid
	2,5	ml	1,5 M Tris, pH 8,8
	100	µl	10 % SDS
	30	µl	APS
	15	µl	TEMED
3 x Probenpuffer:	0,454	g	Tris
	1,2	g	SDS
	7,56	g	Glyzerin, pH 6,0
	400	µl	Bromphenolblau (10 mg/ml Stammlösung)
	ad 20 ml mit H ₂ O		
	30 mg DTT frisch hinzufügen		
Größenmarker:	Prestained protein ladder (PPL, Fermentas, St. Leon-Rot)		
5xElektrophoresepuffer:	50	g	SDS
	720	g	Glycin
	150	g	Tris
	ad 10 l mit H ₂ O		

2.2.3.3 Färben eines Polyacrylamid-Gels mit Coomassie-Brilliant-Blau

Die Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau geschieht in saurer Lösung. Dabei werden alle Proteine fixiert und positiv geladen und binden in dieser Form den Farbstoff. So lassen sich 0,1 µg Protein nachweisen.

Das fertige Gel wurde direkt nach der Elektrophorese 30 min mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt und in Leitungswasser unter mehrmaligem Wechseln über mehrere Tage entfärbt, bis der Hintergrund durchsichtig war. Dann wurde das gefärbte Gel zur Dokumentation luftblasenfrei zwischen zwei Lagen Einmachfolie zum Trocknen aufgespannt.

Lösungen:

Coomassie-Lösung:	2,5 g	Coomassie-Brilliant-Blau G 250
	454	ml Isopropanol
	92	ml Eisessig
	ad 10 l mit H ₂ O	

2.2.3.4 Westernblot

Beim Westernblot werden Proteine nach einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese im elektrischen Feld auf eine Nitrozellulose-Membran mit hoher Proteinaffinität übertragen. Der Transfer wurde in einer Horizontal-Blot-Kammer mittels Semi-dry-Technik durchgeführt (Kyhse-Andersen, 1984).

Das Gel wurde im Blotpuffer luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Dann wurden Gel und Membran - flankiert von je zwei mit Blotpuffer angefeuchteten Filterpapieren gleicher Größe - zwischen die horizontal angeordneten Graphitplatten gelegt, die als Elektroden dienten. Da die Proteine im

elektrischen Feld in Richtung Anode wandern, wurde die Membran auf die Anodenseite und das Gel auf die Kathodenseite der Blotapparatur platziert. Der Transfer erfolgte bei 0,8 mA/cm² Gel über 90 min. Transferierte Proteine wurden zunächst zur Kontrolle des Transfers mit Ponceau für 1-2 min gefärbt. Nach Entfärben mit H₂O wurde das Proteinmuster sichtbar, und bei Bedarf konnten so verschiedene Spuren voneinander getrennt werden.

Aufbau der Blot-Kammer:

Graphitdeckel der Laufkammer (Kathode)
2 Filterpapiere
SDS-Polyacrylamidgel
Nitrozellulosemembran
2 Filterpapiere
Graphitboden der Laufkammer (Anode)

Blotpuffer: 25 mM Tris
 195 mM Glycin
 20 % Methanol
 0,1 % SDS
Ponceau: 5 g PonceauS
 30 g Trichloressigsäure
 ad 1 l mit H₂O

2.2.3.4.1 Westernblot-Analyse

Bei der Westernblot-Analyse können Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern auf der Nitrozellulosemembran nachgewiesen werden. Antigen-Antikörper-Komplexe wurden über das Peroxidase-System durch die Umsetzung eines Chemilumineszenzsubstrates (Entstehung von Photonen und Schwärzung eines Röntgenfilmes) nachgewiesen.

Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran durch Schwenken in 5 % Magermilchpulver in PBS + 0,05 % Tween blockiert. Danach wurde die Membran mit Primärantikörper inkubiert. Diese Inkubation erfolgte über Nacht in 5 % Magermilch in PBS + 0,05 % Tween. Am folgenden Tag wurde die Membran 3 x 5 min mit PBS + 0,05 % Tween gewaschen. Es folgten 45 min Inkubation der Membran mit dem in 5 % Magermilch in PBS + 0,05 % Tween verdünnten Sekundärantikörper. Dieser ist gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet und Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt. Nach erneuten 3 x 5 min Waschschritten mit PBS + 0,05 % Tween konnte die Detektion mit Hilfe der ECL-Lösungen (enhanced chemiluminescence) erfolgen. Die Nitrozellulosemembran wurde hierzu 1 min in einer 1 zu 1 Mischung aus den ECL-Lösungen I und II geschwenkt, in der Dunkelkammer in eine Röntgenfilmkassette gelegt und mit Klarsichtfolie

abgedeckt. Die Ecken der Nitrozellulosemembran wurden mit einem Edding markiert und schließlich bei Rotlicht ein Röntgenfilm darauf positioniert. Die Exposition erfolgte bei geschlossener Röntgenfilmkassette in der Regel für 1 min, bei Bedarf auch länger (10 min) oder kürzer (bis 5 sek). Hierbei katalysierte die Peroxidase die Oxidation des in der ECL I-Lösung enthaltenen Luminol und löste die Chemilumineszenz aus. Der Röntgenfilm wurde anschließend 1 min in Entwicklerlösung gebadet, dann in Fixierer gelegt und in Wasser gespült. Der Größenmarker der Nitrozellulosemembran wurde auf den getrockneten Röntgenfilm übertragen.

Der Nachweis von VE-Cadherin erfolgte durch Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper Ratte-IgG_{2a} 11D4.1. Dieser Antikörper wurde von Gotsch et al. (1997) mit Hilfe immunisierter Lewis-Ratten hergestellt. Lymphozyten dieser Ratten wurden mit einem Plasmazellklon hybridisiert und so Hybridoma-Zellen gewonnen, die den Antikörper in das Zellkulturmedium sezernieren. Dieser Zellkulturüberstand wurde ohne weitere Reinigung bei der Immundetektion und Immunfluoreszenz eingesetzt. Weitere Antikörper sind in Tabelle 2.4 genannt.

5 x PBS:	400,3 g NaCl 10 g KCl 65,3 g Na ₂ HPO ₄ ad 10 l mit H ₂ O
1 x PBS:	5 x PBS 1:5 verdünnt mit H ₂ O
PBS + 0,05 % Tween:	2 l PBS 1 g Tween 20
5 % Magermilch:	5 g Magermilchpulver in 100 ml PBS + 0,05 % Tween
ECL I-Lösung:	1 ml Luminol (250 mM 3-Aminophthalhydrazid in DMSO) 0,44 ml Coumaric Acid (90 mM Kumarinsäure in DMSO) 10 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,5 ad 100 ml mit H ₂ O
ECL II-Lösung:	64 µl 30 % H ₂ O 10 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,5 ad 100 ml in H ₂ O

Tab.2.4: für Immunoblots verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Erstantikörper gegen	Verdünnung	Ref./Quelle	Zweitantikörper	Verdünnung	Firma
VE-Cadherin	Hybridoma-überstand unverdünnt	IgG _{2a} 11D4.1, Hybridomazellen Gotsch et al.,1997	Goat anti-rat-POX	1:3000	Dianova, Hamburg
FKBP	1:1000	PA1-026A, Dianova, Hamburg	Goat anti-rabbit-POX	1:3000	Dianova, Hamburg
TRPC4	1:200	Alomone Labs. Ltd., Israel	Goat anti-rabbit-POX	1:3000	Dianova, Hamburg

2.2.3.5 Gelfiltration (Superdex 200)

Bei der Gelfiltration wird ausgenutzt, dass die Partikel des Säulenmaterials Poren definierten Durchmessers haben, in die kleine Moleküle eindringen, große Moleküle aber nicht eindringen können. Somit haben kleine Moleküle eine längere Verweildauer im Säulenmaterial, während große Moleküle durch den Flüssigkeitsstrom schneller durch die Gelfiltrationssäule wandern (Hagel 1989, Stellwagen 1990). Als Gelfiltrationsmaterialien werden Partikel aus hydrophilen Polymeren benutzt, die als sphärische Partikel unterschiedlicher Größe (10 - 500 µm Durchmesser) und Porenweite eingesetzt werden. Die Porenweite bestimmt den Bereich, in dem eine optimale Trennung gegeben ist. Je kleiner die Partikelgröße, desto geringer die Fließgeschwindigkeit und je länger die Säule, umso besser ist die Auftrennung.

In dieser Arbeit wurde eine Superdex-200-Säule, deren Säulenmaterial Agarose/Dextran einen Partikeldurchmesser von 11 - 15 µm besitzt, benutzt. Dieses Material kann Proteine zwischen 10 und 600 kD separieren. Die benutzte Säule (d = 0,5 cm, h = 9 cm) hatte ein Säulenvolumen von 1,5 ml und diente zur Analyse der Fusionsprotein(VE-Cadherin-EC-1xFKBP-His6)-Monomere (~100 kD) bzw. Dimere (~200 kD). Die Säule wurde an eine FPLC-Anlage (**F**ast **P**rotein **L**iquid **C**hromatography) angeschlossen, 30 min mit PBS equilibriert und nach dem Einspritzen der Probe (25 µl) mit PBS eluiert. Die Absorption des Eluats wurde kontinuierlich aufgezeichnet.

2.2.3.6 Proteinreinigung

Für diese Arbeit wurde eine Zelllinie hergestellt, die das Fusionsprotein - bestehend aus den extrazellulären Domänen von VE-Cadherin (EC1-EC5), einer FKBP-Domäne und einem Hexahistidin-Terminus (6xHis) - produzierte und in den Zellkulturüberstand abgab. Die 6xHis-Gruppen erlauben eine Reinigung über Affinitätschromatographie (s.u.). Die Zellen wurden für die Reinigung des Proteins im Verhältnis 1:20 auf T75-Kulturflaschen geteilt und nach zwei Tagen bei noch nicht ganz erreichter Konfluenz in Medium, dessen FCS-Konzentration nur bei 1 % lag, kultiviert. Zwei Tage später wurde das Medium gesammelt (200 ml pro Reinigung), mit den Proteaseinhibitoren Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin (jeweils 2 µg/ml) versetzt, in 50 ml Grainer-

Röhrchen zunächst bei 150 x g für 5 min und danach bei 22 100 x g 30 min zentrifugiert.

Die CHO-Zellen, die das VE-Cadherin-Fc-Fusionsprotein sezernierten, wurden von Gotsch et al. (1997) hergestellt. Das Protein besteht aus dem extrazellulären Teil des VE-Cadherins der Maus, das an den Fc-Teil von humanem IgG₁ fusioniert wurde. Die Reinigung dieses Fusionsproteins erfolgte mittels Protein-A-Säule, da Protein A die Fc-Teile von Immunglobulinen bindet. Die Zellen wuchsen vor der Reinigung in α MEM mit Immunglobulin-reduziertem Serum, um zu verhindern, dass Immunglobuline des Mediums an der Protein-A-Agarose mit aufgereinigt wurden. Es wurde 1 l Medium gesammelt, mit den Proteaseinhibitoren Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin (jeweils 2 μ g/ml) versetzt und bei 11000 g 30 min zentrifugiert.

Proteaseinhibitoren:

Aprotinin	1 mg/ml in H ₂ O
Pepstatin	1 mg/ml in 100 % DMSO
Leupeptin	1 mg/ml in H ₂ O

2.2.3.6.1 Ni-NTA-Säule

Eine Form der Affinitätschromatographie ist die Metallchelatchromatographie, oder IMAC (immobilied **metal ion affinity chromatography**) (Kagedal 1989; Yip & Hutchens 1996). Proteine, die in geeigneter Anordnung mehrere Histidinreste enthalten, werden von Säulen gebunden, die Metallchelate kovalent gebunden haben. In dieser Arbeit wurde eine Ni-Chelatchromatographie benutzt, um das rekombinante Protein VE-Cadherin-EC-1xFKBP, das C-terminal mit einer 6xHis-Gruppe fusioniert war, zu reinigen. Ni²⁺ ist auf diesen Säulen durch NTA-Reste (**N**itrilo**t**riessigsäure(**a**cetic-acid)) gebunden. NTA besetzt vier der insgesamt sechs Bindungsstellen eines Ni²⁺-Ions, zwei bleiben frei und können mit Histidin-Resten des Proteins interagieren.

Die Proteinreinigung erfolgte mittels einer 10 ml Spritze, in die eine Fritte platziert worden war. Die Säule wurde mit 1 ml Säulenvolumen Ni²⁺-NTA-Agarose gefüllt und wiederum mit einer Fritte bedeckt, um Austrocknen und Kompression der Agarose zu verhindern. Nachdem die Säule mit 10 ml Puffer 1 äquilibriert worden war, wurde sie bei 4°C mit 200 ml gesammeltem und zentrifugiertem Zellkulturüberstand beladen. Der Durchbruch wurde zur späteren Kontrolle gesammelt. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils 10 ml Puffer 1 (enthielt 1mM Imidazol) und danach mit Puffer 2 (enthielt 20 mM

Imidazol). Da Imidazol selbst an die Ni²⁺-Ionen binden kann, wird dadurch die unspezifische Bindung von Histidin-enthaltenden Proteinen verhindert. Die Elution erfolgte mit hohen Imidazolkonzentrationen, wodurch die Histidin-markierten Proteine aus der Bindung verdrängt wurden: viermal mit 1 ml Puffer 3 (200 mM Imidazol) und viermal mit 1 ml Puffer 4 (500 mM Imidazol). Der Erfolg der Reinigung wurde durch einen Immunoblot und ein Coomassie-Gel überprüft. Proteinhaltige Fraktionen wurden gegen HBSS dialysiert, die Proteinmenge mit der Bradford-Methode (s. 2.2.3.1.1) bestimmt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Puffer 1:	1 M NaCl 10 mM NaH ₂ PO ₄ 1 mM Imidazol pH 8	Puffer 3:	1 M NaCl 10 mM NaH ₂ PO ₄ 200 mM Imidazol pH 8
Puffer 2:	1 M NaCl 10 mM NaH ₂ PO ₄ 20 mM Imidazol pH 8	Puffer 4:	1 M NaCl 10 mM NaH ₂ PO ₄ 500 mM Imidazol pH 8

2.2.3.6.2 Protein A-Säule

Protein A stammt aus der Zellwand des Bakteriums *Staphylokokkus aureus* und bindet mit hoher Affinität Antikörper reversibel über ihre Fc-Domäne. Es wurde eine Säule aus einer 2,5 ml Spritze analog zur NTA-Säule gebaut, die aber diesmal mit 1 ml Protein A-Agarose befüllt wurde. Die Säule wurde zunächst mit 20 ml HBSS äquilibriert und anschließend mit dem gesammelten und zentrifugierten Zellkulturüberstand beladen. Der Durchbruch der Säule wurde aufgefangen, ebenso wie die 20 ml HBSS, mit denen die Säule gewaschen wurde. Die Elution erfolgte mit 20 mM Na-Citrat pH 2,4. Das Eluat wurde in 0,5 ml Aliquots in Eppendorfgefäßen portioniert, in die zuvor 15 µl 2 M Na-Carbonat-Lösung vorgelegt worden war. Sofort nachdem 0,5 ml aufgefangen worden waren, wurde das Eppendorfgefäß geschwenkt, der pH-Wert des Eluats bestimmt und, falls nötig, auf pH 7 eingestellt. Zur Einstellung des pH-Wertes wurden 1 N HCl- und 1 N NaOH-Lösungen verwendet. Nach einer Bradford-Proteinbestimmung wurden die Protein enthaltenden Fraktionen möglichst schnell dialysiert.

Aus einem Liter Zellkulturüberstand ließen sich 0,5-1,5 mg VE-Cadherin-Fc gewinnen.

2.2.3.7 Dialyse

Die Dialyseschläuche wurden zunächst in EDTA-haltigem H₂O aufgeköcht. Anschließend wurden sie 3 x in reinem H₂O aufgeköcht, um sie wieder vom EDTA zu befreien, welches das zu dialysierende Protein zerstören würde. Die Eluate wurden in die Dialyseschläuche überführt und über Nacht gegen 5 l HBSS dialysiert. Die Dialyse erfolgte über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag wurden die Eluate aus den Dialyseschläuchen zurück in Eppendorfgefäße überführt, erneut die Konzentration bestimmt und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C portioniert eingefroren.

2.2.4 Mikroskopie

2.2.4.1 Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden die Zellen auf nach Bedarf beschichtete Deckgläschen (Ø 15 mm) in Petrischalen ausgesät und entweder mit Formaldehyd oder Methanol fixiert. Bei der Formaldehydfixierung wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen, dann mit 2 % Formalin 5 - 7 min bei RT fixiert, 3 x mit PBS gewaschen und anschließend für 5 min mit 0,1 % Triton-X-100 in PBS permeabilisiert und wiederum 3 x mit PBS gewaschen. Alternativ wurden die Zellen in eiskaltem Methanol (-20°C) für 10 min fixiert und permeabilisiert.

Die Deckgläschen wurden aus den Petrischalen auf Objektträger platziert. Unspezifische Bindungsstellen wurden 30 min mit BSA/NGS abgesättigt und die Zellen anschließend über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer mit einem Erstantikörper inkubiert. Bei Negativkontrollen wurde der Erstantikörper weggelassen. Vor der Zugabe eines markierten Zweitantikörpers wurden die Objektträger wieder 3 x mit PBS gespült. Die Zellen wurden 45 min bei RT mit dem Zweitantikörper inkubiert, 3 x mit PBS gewaschen und mit Glycerin + NPG - zum Schutz vor Verbleichen - eingedeckt. Alle verwendeten Antikörper wurden in PBS/Acid verdünnt. Latexperlen, Dimerisierer und Toxin wurden in Medium verdünnt 30 min auf den Zellen inkubiert und anschließend wie beschrieben zur Färbung fixiert.

Tabelle 2.5 zeigt die für die Immunfluoreszenz verwendeten Antikörperkombinationen.

2 % Formalin: 2 g Paraformaldehyd
 100 ml PBS, pH 8 erwärmen und rühren bis es nicht mehr trüb ist
 (nicht länger als drei Wochen verwenden)

PBS/Acid: 0,05 % NaN₃ in PBS

BSA/NGS: 3 % BSA, 1 % NGS in PBS

Eindecklösung: 60 % Glycerin
 1,5 % NPG (**N-Propyl-gallat**)
 in PBS

Tab.2.5: für Immunfluoreszenzmikroskopie verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Erstantikörper gegen	Verdünnung	Referenz/Quelle	Zweitantikörper	Verdünnung	Firma
VE-Cadherin	Hybridoma-überstand, unverdünnt	IgG _{2a} 11D4.1, Hybridomazellen Gotsch et al.,1997	Goat anti-rat-Cy2 bzw. -Cy3	1:600	Dianova, Hamburg
FKBP	1:100	PA1-026A, Dianova, Hamburg	Goat anti-rabbit-Cy3	1:600	Dianova, Hamburg
TRPC4	1:50	Alomone Labs. Ltd., Israel	Goat anti-rabbit-Cy2 bzw. -Cy3	1:600	Dianova, Hamburg
Claudin5	1:100	Zymed Laboratories, San Fransisco	Goat anti-rabbit-Cy3	1:600	Dianova, Hamburg

Zum Anfärben von filamentärem Aktin wurde Alexa-Phalloidin in einer Verdünnung von 1:60 verwendet.

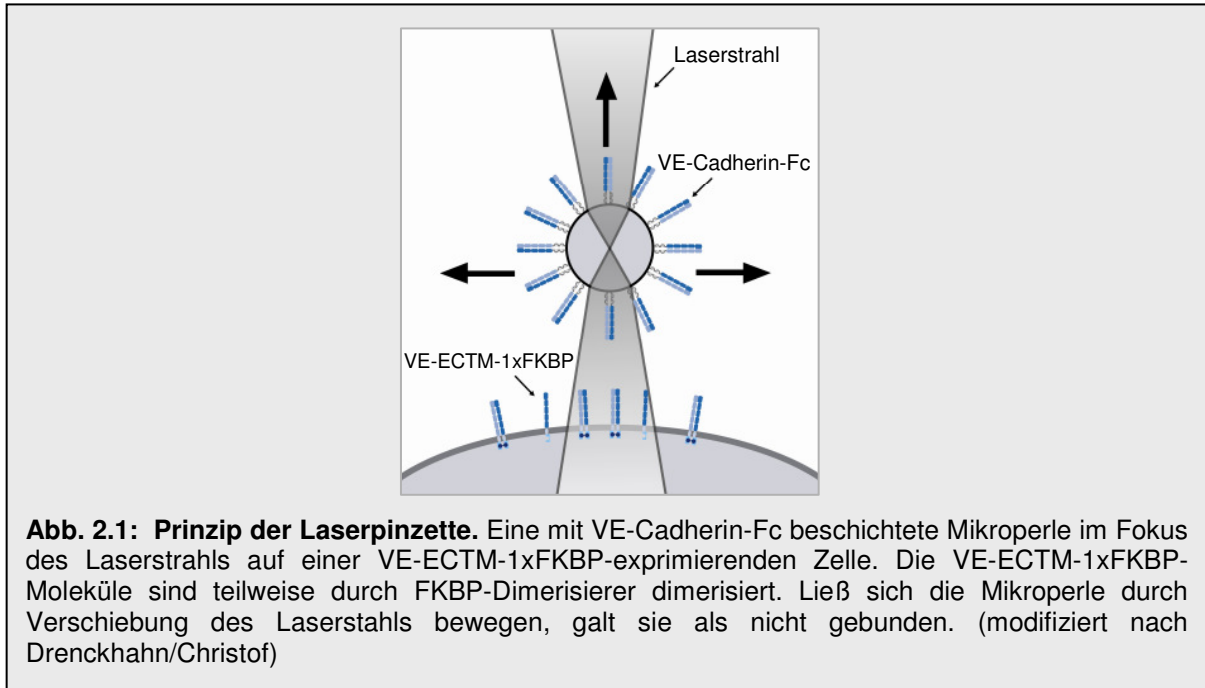
2.2.4.1.1 Beschichtung von Latexperlen

Für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit VE-Cadherin-Fc-beschichteten Mikroperlen dienten Latexperlen mit einem Durchmesser von 4,9 µm. 125 µl Perlenlösung (entsprechen 5 µl komprimierte Perlen) wurden zweimal mit 25 mM MES-Puffer pH 6 gewaschen und bei 3000 g für 10 min langsam sedimentiert. Die Perlen wurden in 500 µl MES-Puffer mit 2,5 µg VE-Cadherin-Fc-Protein zum Binden des Proteins an die Perlen über Nacht auf einem Drehrad bei RT inkubiert (über-Kopf-Rotation zum Vermeiden einer Sedimentation). Am folgenden Tag wurden sie bei 3000 g 10 min sedimentiert und dreimal mit je 1 ml PBS + 3 % BSA, welches übrige Bindungsstellen absättigt, gewaschen. Die Perlen konnten 10 Tage bei 4°C bei Rotation auf einem Drehrad aufbewahrt werden.

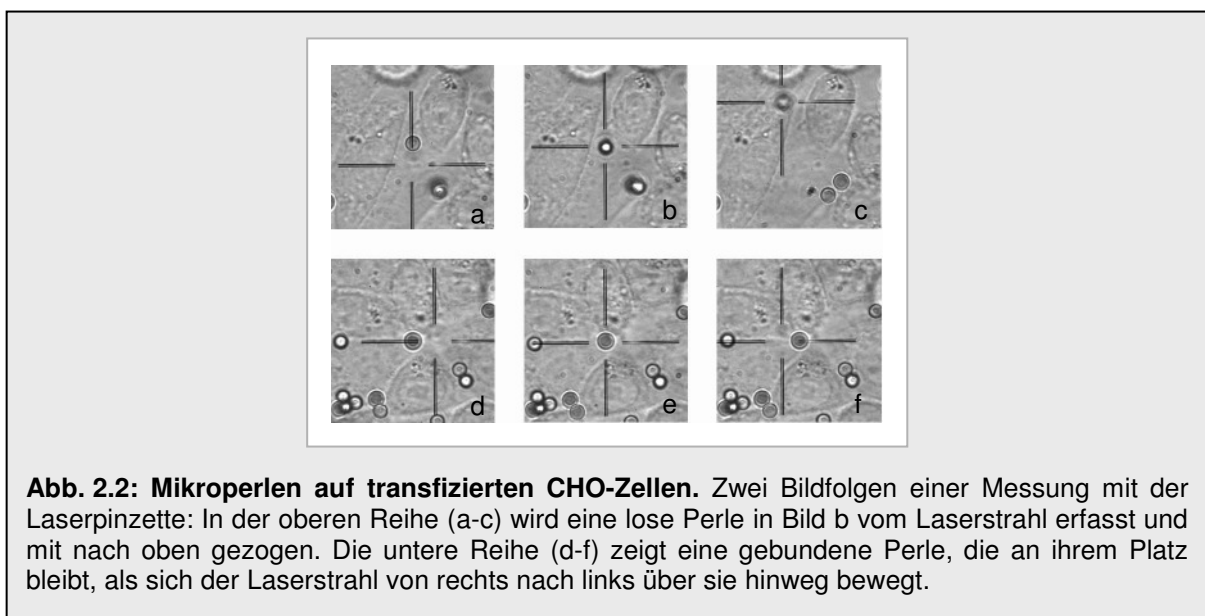
2.2.4.2 Laserpinzette

Seit den 80er Jahren wird in der physikalischen Grundlagenforschung der Impuls von Photonen (Lichtdruck) zur mechanischen Beeinflussung von kleinen Partikeln eingesetzt (Ashkin, 1985). In den Biowissenschaften wird diese Technik bei der Laserpinzette verwendet (Ashkin, 1987; Sheetz, 1998). Bei dieser Technik wird der Strahl eines Infrarotlasers ($\lambda=1064$ nm) in ein

Mikroskopobjektiv gelenkt und von diesem in die Objektebene fokussiert. Mit diesem Laserstrahl ist es möglich kleine Partikel einzufangen und zu bewegen. Denn aufgrund ihres elektrischen Dipols wandern diese in einem Lichtintensitätsgradienten immer in Richtung der höchsten Lichtintensität, daher bleiben sie bei Bewegung des Lasers (oder der Unterlage) immer im Fokus, solange sie nicht fest gebunden sind. Mit Hilfe einer Videokamera können die Aktionen auf einem Bildschirm übertragen und beobachtet werden.



An der Laserpinzette wurde die Haftung von mit VE-Cadherin beschichteten Mikroperlen auf VE-Cadherin-FKBP transfizierten CHO-Zellen in Abhängigkeit von Dimerisierung und Oligomerisierung untersucht.



2.2.4.2.1 Beschichtung von Protein A-Mikroperlen

10 µl der mit Protein A beschichteten Polystyren-Mikroperlen-Suspension (2×10^9 Mikroperlen/ml, Durchmesser 2,8 µm) wurden zunächst dreimal mit 100 µl 0,1 M Natriumphosphatlösung (pH 8,1) in einem Eppendorfgefäß gewaschen. In einem Magnethalter für das Eppendorfgefäß sammelten sich die magnetischen Mikroperlen an der Gefäßwand, sodass die Flüssigkeit zwischen den Waschschrritten abgezogen werden konnte. Zum Binden des Proteins an die Perlen wurden diese anschließend in 100 µl 0,5 M Natriumphosphatlösung (pH 8,1) mit 10 µg VE-Cadherin-Fc-Fusionsprotein über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Mikroperlen dreimal mit 0,1 M Natriumphosphatlösung (pH 8,1) gewaschen und anschließend durch dreimaliges Wechseln in 0,1 M Boratpuffer (pH 9) umgepuffert und 45 min in 0,1 M Boratpuffer (pH 8,5) mit 0,54 mg DMP, bei RT auf einem Drehrad, inkubiert. DMP diente zur Quervernetzung von Protein A mit den Proteinen. Die Mikroperlen wurden zweimal mit 100 µl 0,2 M Ethanolamin (pH 8,0) gewaschen und anschließend noch 2 h bei RT am Drehrad inkubiert, um restliche Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurden die Mikroperlen dreimal 5 min mit HBSS gewaschen, in 100 µl HBSS aufgenommen und bei 4°C auf dem Drehrad bis zum Gebrauch aufbewahrt. Es wurden keine Beschichtungen benutzt, die älter als zwei Wochen waren. Die Mikroperlen-Konzentration betrug etwa $1,6 \times 10^8$ Mikroperlen/ml.

2.2.4.2.2 Messungen mit der Laser-Pinzette

Sterile runde Deckgläser (Durchmesser 24 mm) mit einem konfluenten Zellrasen wurden auf einen Metallobjektträger mit passgenauer Fräsung gelegt, der das Betrachten des Deckglases in Ölimmersion von unten erlaubte, mit Baysilone-Paste abgedichtet und mit 200 µl dekomplementiertem αMEM-Medium bedeckt. Zu den Zellen wurde 10 µl mit VE-Cadherin beschichtete Mikroperlen-Suspension gegeben und 30 min gewartet, um das Absinken und die Anhaftung der Mikroperlen auf den Zellen zu ermöglichen. Einzelne Mikroperlen wurden durch Verschieben des Objektträgers in den Fokus des Laserstrahls gebracht. Lose Mikroperlen sprangen in den Laserfokus, feste blieben an ihrem Platz. Die Bindungseigenschaften wurden durch den prozentualen Anteil der Mikroperlen, die sich bei einer bestimmten

Laserleistung (60 mW) nicht von der Zelloberfläche bewegen ließen, quantifiziert. Zusätzlich wurden mit Mikroperlen inkubierte Zellen unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt, wie die Behandlung mit Dimerisierer (1 μM AP20187) oder mit 2 mM EGTA.

EGTA-Stammlösung: 100 mM EGTA in H_2O , pH 7,4
 Dimerisierer-Stammlösung: 1 mM AP20187 in Ethanol

2.2.4.3 Einzelmolekülfluoreszenz-Technik

Mit Hilfe der Einzelmolekülfluoreszenz-Technik können Bindungsereignisse einzelner Moleküle genau beobachtet werden. VE-Cadherin-FKBP-transfizierte Zellen wurden mit gelöstem fluoreszenzmarkiertem VE-Cadherin-Fc inkubiert und mit einem Epifluoreszenzmikroskop beobachtet. Während der Diffusion der fluoreszierenden Moleküle im HBSS gibt es keine spezifischen Fluoreszenzsignale. Bindet aber ein Cadherin-Dimer aus der Lösung an ein membrangebundenes Cadherin, so wird es für die Zeit der Bindung immobilisiert und ausreichend Photonen für ein distinktes Signal (kurzes Aufleuchten) an dieser Position gesammelt.

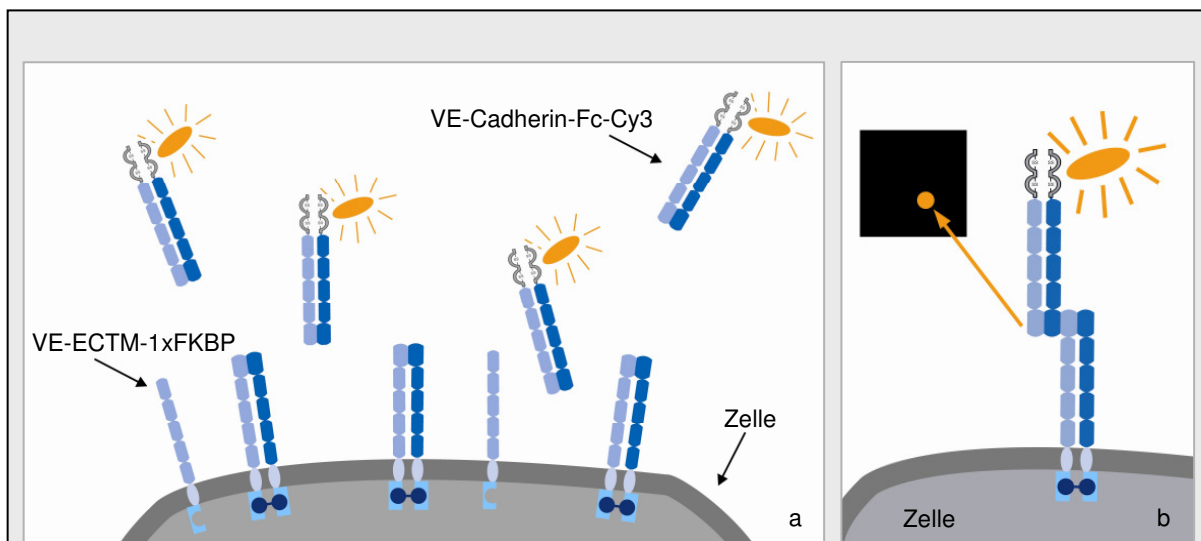


Abb. 2.3: Prinzip der Einzelmolekülfluoreszenz. **a** Eine VE-ECTM-1xFKBP-exprimierende Zelle. Die VE-ECTM-1xFKBP-Moleküle sind teilweise durch FKBP-Dimerisierer dimerisiert. Im Medium über den Zellen befinden sich fluoreszenzmarkierte VE-Cadherin-Fc-Dimere. Während der Diffusion dieser Proteine in der Lösung erscheint die Fluoreszenz der markierten VE-Cadherin-Fc-Dimere verwischt. **b** Bindet ein Cadherin-Dimer aus der Lösung (VE-Cadherin-Fc) an ein Cadherin-Dimer auf der Zelloberfläche (dimerisierte VE-ECTM-1xFKBP-Proteine), so wird dieses kurzfristig immobilisiert, sodass genug Photonen von dieser Position gesammelt werden, um ein Signal zu ergeben. (modifiziert nach Drenckhahn/Christof)

Es wurden konfluente Deckgläschen (Durchmesser 24 mm) transfizierter Zellen auf einen Metallobjektträger mit entsprechender Fräsung gelegt, abgedichtet und mit 200 µl HBSS bedeckt.

VE-Cadherin-Fc wurde durch Zugabe eines fünffachen molaren Überschusses von Cy3-markierten anti-human Fa/b fluoreszenzmarkiert. Die Zellen wurden mit dem Cy3-markierten VE-Cadherin-Fc in HBSS inkubiert. Cy3 wird mit blauem Licht (488 nm) angeregt und hat ein Emissionsmaximum bei 565 nm. Es ist sehr fotostabil, sodass ein mehrmaliges Scannen ohne Ausbleichen der Probe möglich ist. Die Proben wurden für 5 ms durch einen Ar⁺-Laser belichtet, es wurde ein 100 x 1,3 Objektiv in einem Epifluoreszenzmikroskop verwendet. Es wurden konsekutiv mit einem CCD-Kamerasystem sechs Fotos pro Sekunde gespeichert. Während der Verzögerungszeit (170 ms) wurde der Laser durch einen akustooptischen Modulator ausgeschaltet. Waren die fluoreszierenden Proteine an der Zelloberfläche gebunden, so blieben diese für mehrere Bilder an einem Punkt und wurden so sichtbar. Die Messungen wurden mit und ohne Dimerisierer (1 µM AP20187) und als Negativkontrolle mit 2 mM EGTA durchgeführt.

VE-Cadherin-Fc (0,24 mg/ml HBSS)
goat anti-human Fab-Fragment-Cy3 (1 mg/ml), Dianova, Hamburg

Ansatz für ein Deckgläschen:

10 µl VE-Cadherin-Fc + 3 µl anti-human Fab-Cy3 auf 200 µl HBSS
EGTA-Stammlösung: 100 mM EGTA in H₂O, pH 7,4
Dimerisierer-Stammlösung: 1 mM AP20187 in Ethanol

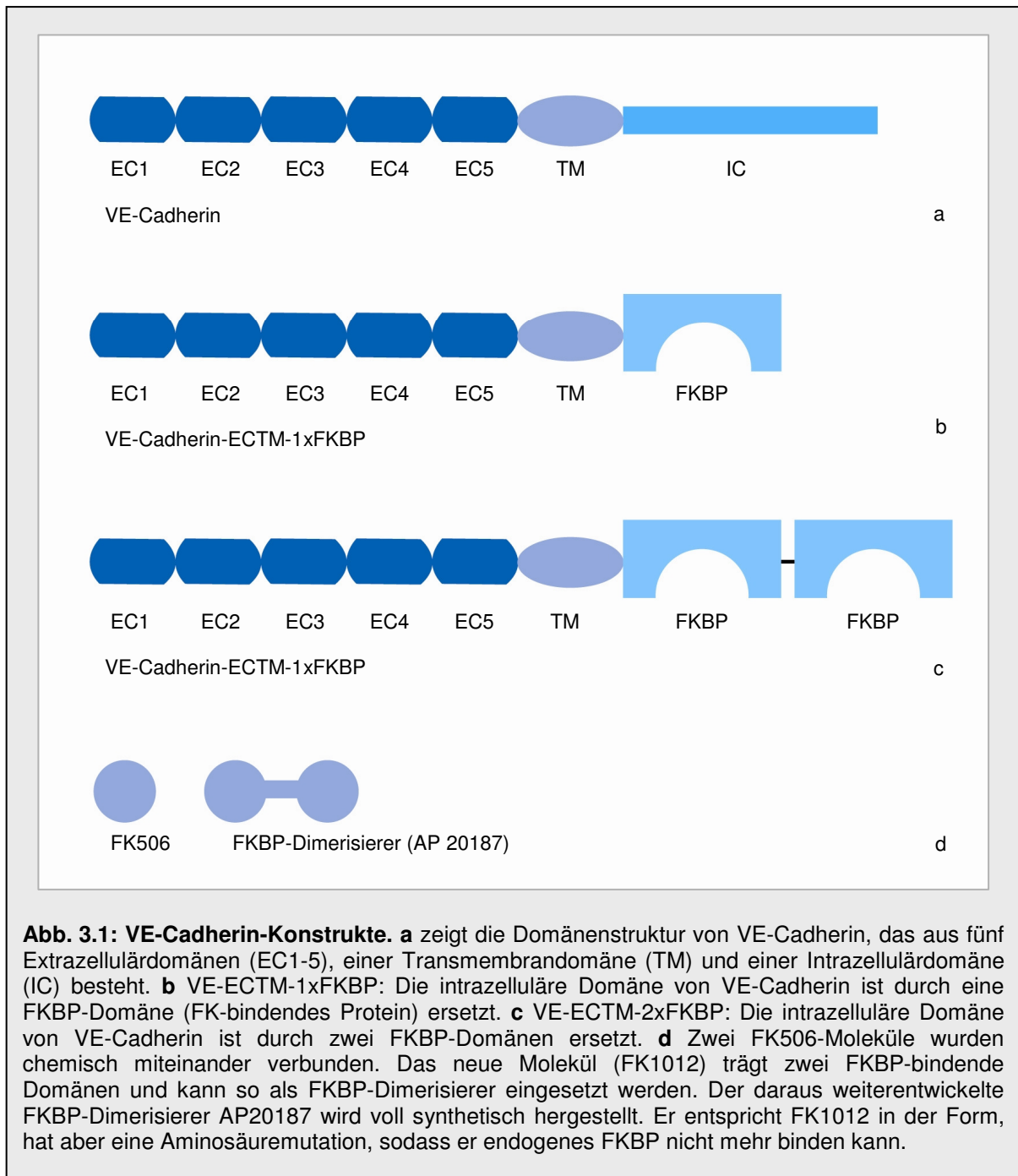
3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Dimerisierung und Oligomerisierung auf die Adhäsion von VE-Cadherin

Cadherine sind intrazellulär über die Plaqueproteine α - und β -Catenin mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Möglicherweise beeinflusst diese Interaktion die Dimer- bzw. Oligomerisierung der Cadherine und damit die Bindungsaffinität ihrer Extrazellulärdomänen (Yap et al., 1998; Aono et al., 1999).

In dieser Arbeit wurde die gesamte intrazelluläre VE-Cadherindomäne deletiert, um so den Effekt einer Aggregation der Cadherin-Moleküle auf ihre Adhäsionsstärke ohne zytoskelettale Verankerung zu untersuchen. Da für klassische Cadherine bekannt ist, dass sie von einer monomeren nicht aktiven Konformation zu einer dimeren aktiven Konformation wechseln (Cis-Dimerisierung, Takeda et al., 1999), wurde in der vorliegenden Arbeit die Adhäsion künstlicher Dimere und künstlicher Oligomere untersucht und verglichen.

Dazu wurden die cDNAs für VE-Cadherin-Fusionsproteine konstruiert und in eukaryontische Expressionsvektoren kloniert. Mit diesen Plasmiden wurden CHO-Zellen transfiziert und entsprechend zwei stabil transfizierte Zellklone selektiert. Bei diesen VE-Cadherin-Konstrukten war die zytoplasmatische Domäne entweder durch eine oder durch zwei FKBP-Domänen ersetzt (s. Abb. 3.1).



Nach Inkubation der transfizierten Zellen mit dem membrangängigen FKBP-Dimerisierer (AP20187) wurden eine Dimerisierung im Falle von VE-Cadherin-ECTM-1xFKBP und eine Oligomerisierung im Falle von VE-Cadherin-ECTM-2xFKBP erwartet (Abb. 3.2).

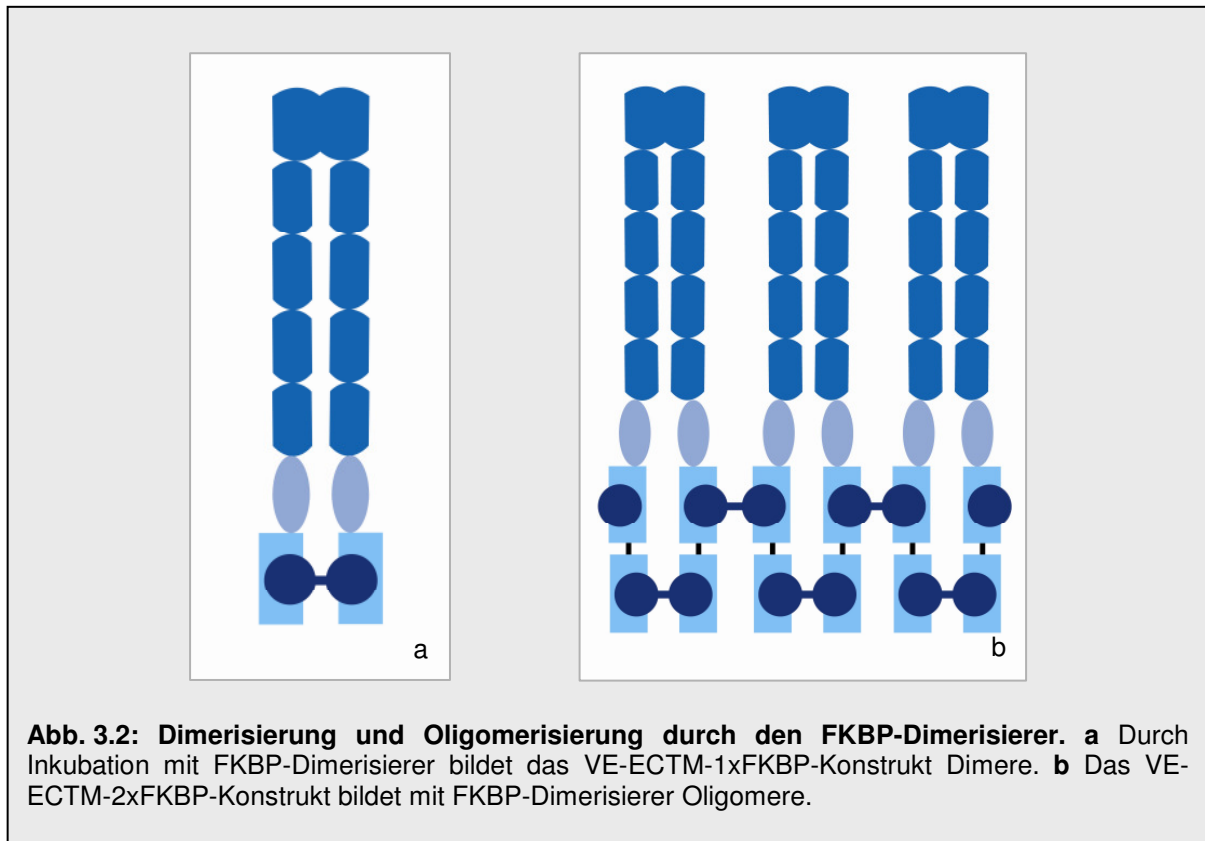


Abb. 3.2: Dimerisierung und Oligomerisierung durch den FKBP-Dimerisierer. **a** Durch Inkubation mit FKBP-Dimerisierer bildet das VE-ECTM-1xFKBP-Konstrukt Dimere. **b** Das VE-ECTM-2xFKBP-Konstrukt bildet mit FKBP-Dimerisierer Oligomere.

Mit der Laserpinzette und Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie wurde die Adhäsion von VE-Cadherin-Dimeren und -Oligomeren anhand dieser Zellen verglichen.

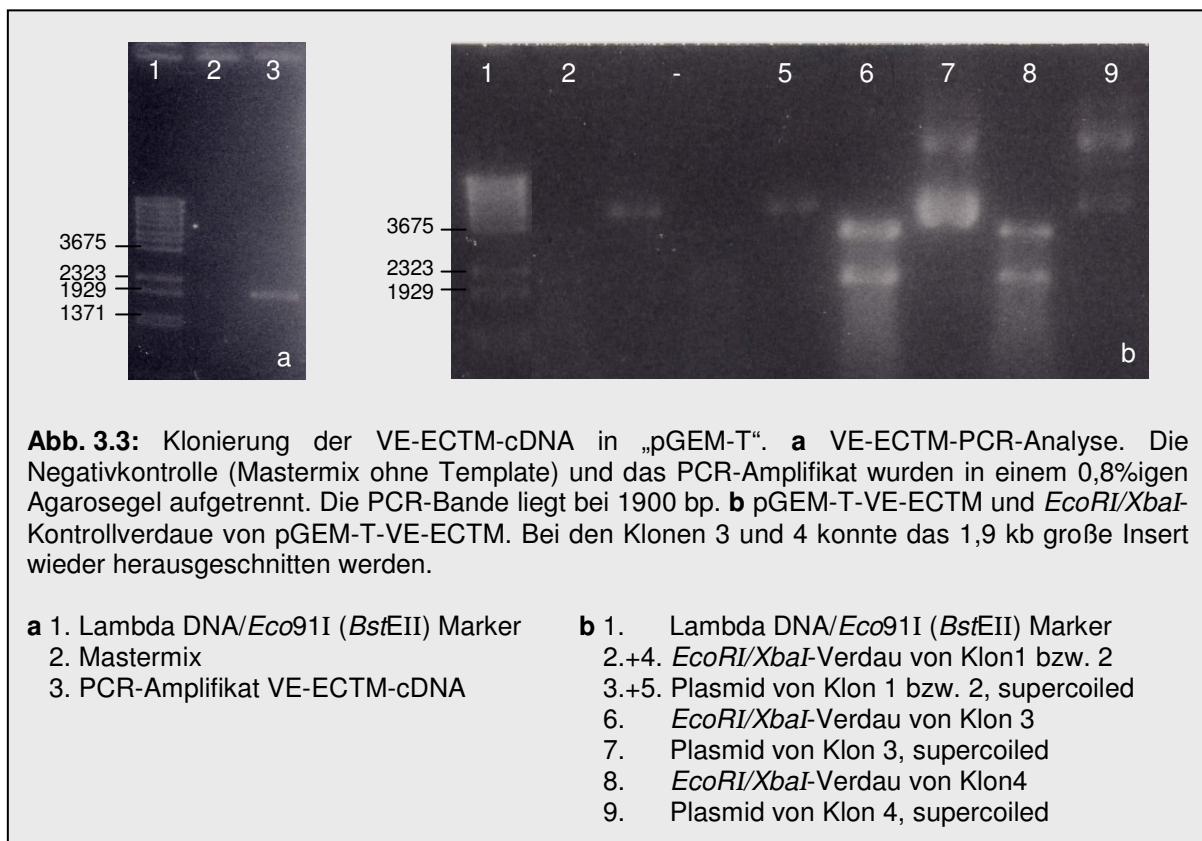
Im Folgenden werden die einzelnen Schritte genauer beschrieben.

3.1.1 Herstellung von Vektoren zur Expression künstlich dimerisierbarer bzw. oligomerisierbarer VE-Cadherin-Membranproteine

Es wurde zunächst die für die extrazelluläre und transmembranäre Domäne von VE-Cadherin kodierende cDNA (VE-ECTM) amplifiziert und diese daran anschließend in Vektoren kloniert, die über die cDNA für eine bzw. zwei FKBP-Domänen verfügten. Die so gewonnenen Konstrukte wurden zur stabilen Expression in eukaryontischen Zellen in geeignete Transfektionsvektoren umkloniert, die eine Genitizin-Resistenz zur Selektion der transfizierten Zellen enthielten (s. auch Klonierungsstrategien im Anhang 7.1.2.2.).

3.1.1.1 Klonierung der VE-ECTM-cDNA in Ariad-Vektoren

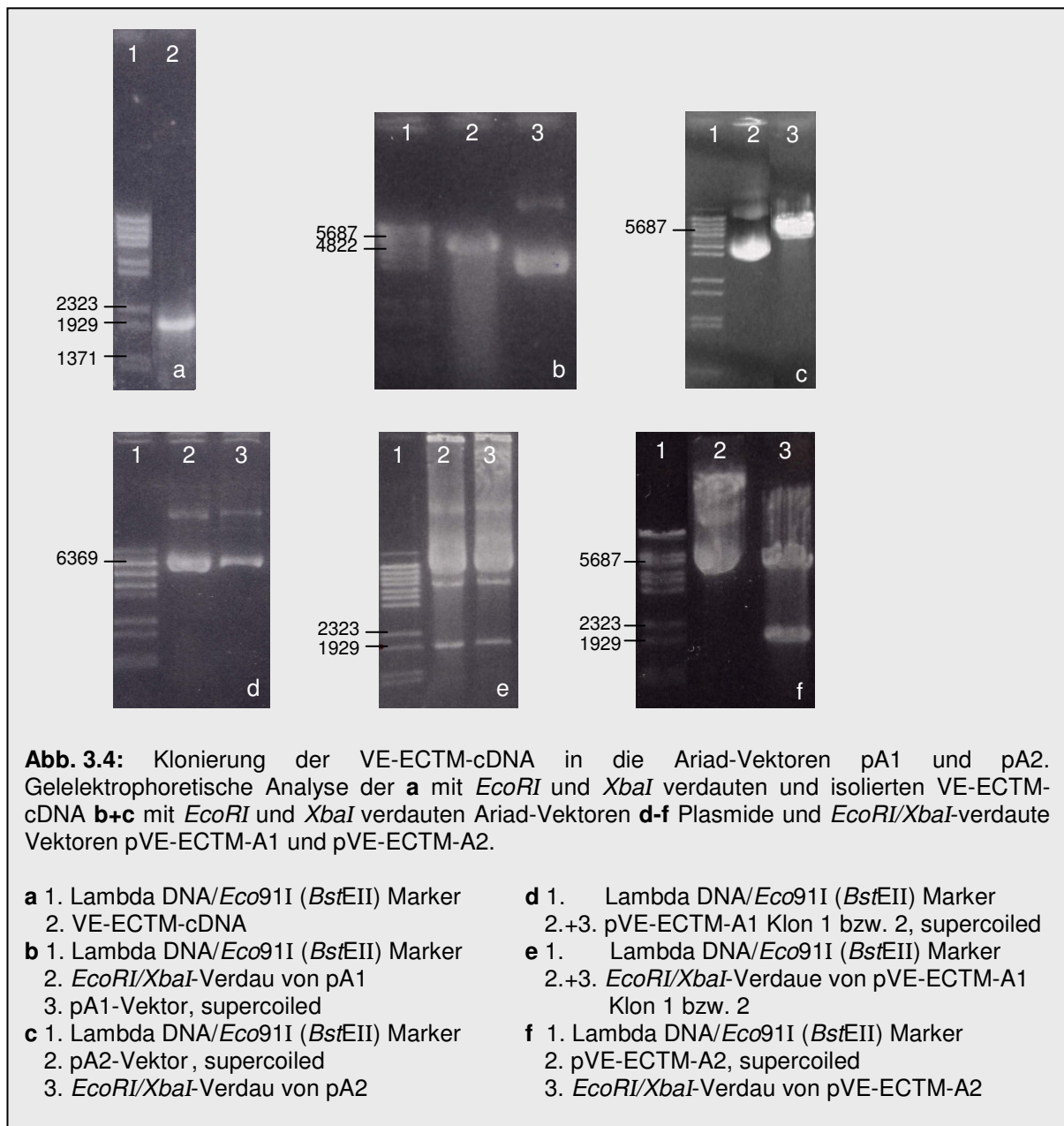
Mit Hilfe der PCR wurde nur die gewünschte ECTM-cDNA des VE-Cadherin-Gens amplifiziert. Als Template diente ein die VE-Cadherin-cDNA enthaltender pBlueskriptSK⁻-Vektor (s. 2.1.5). Das Oligonukleotidpaar 1 in Tab. 2.2 (s. 2.2.1.2.5) wurde für die PCR als Primer verwendet. Die Größe des VE-ECTM-Amplifikats (1905 bp) wurde in einem Agarosegel (Abb. 3.3a) in Gegenwart eines DNA-Größenmarkers überprüft. Die VE-ECTM-cDNA wurde im pGEM-T Vektor zwischenkloniert. Positive Klone wurden mit Hilfe eines *EcoRI/XbaI*-Doppelverdaus identifiziert (Abb. 3.3b) und die entsprechend isolierte Plasmid-DNA bei MWG sequenziert, um Mutationen, die bei der Amplifizierung entstehen können, auszuschließen.



Die verwendeten Ariad-Vektoren pC₄-F_v1E (5371 bp) und pC₄M-F_v2E (5726 bp) (s. 2.2.1.2.9 Tab. 2.5) werden im Folgenden als pA1 bzw. pA2 bezeichnet.

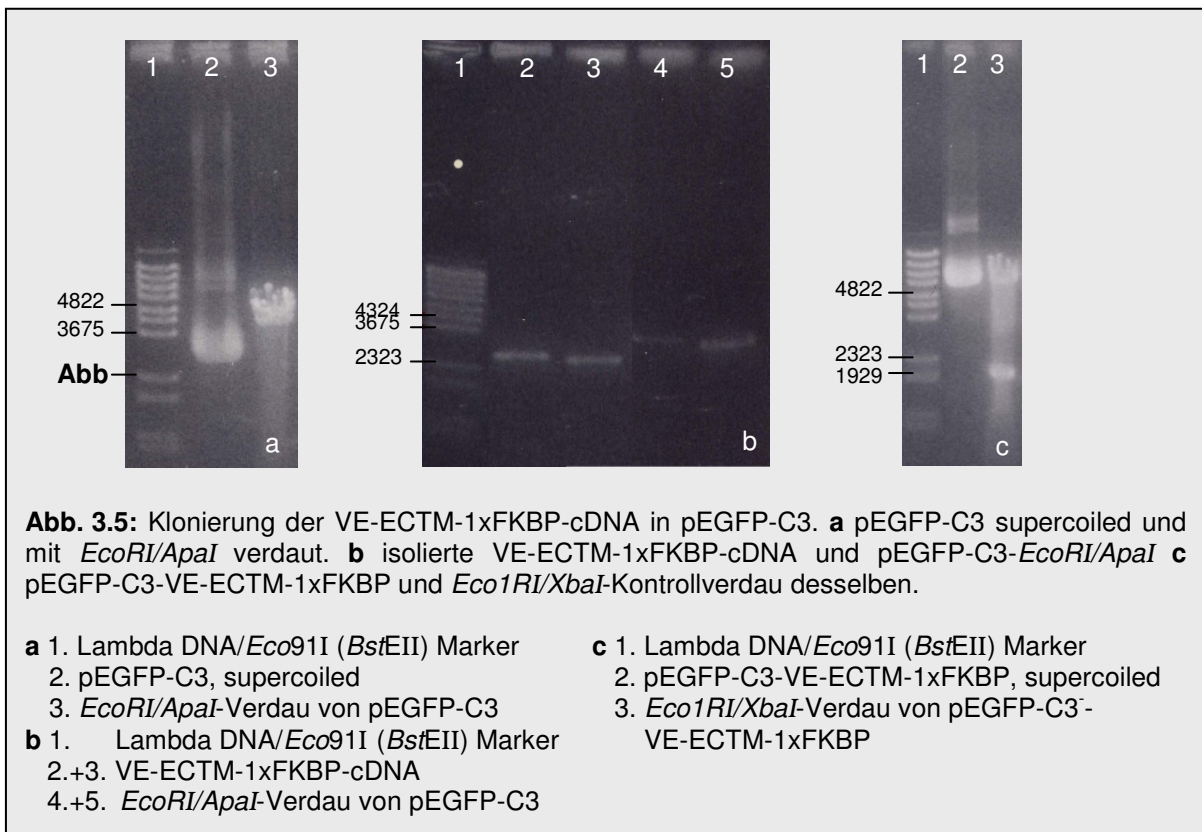
Um die VE-ECTM-cDNA in diese Vektoren 5` der 1x bzw. 2xFKBP-spezifischen cDNA zu klonieren, wurden die VE-ECTM-cDNAs in einem präparativen Verdau mit den Enzymen *EcoRI* und *XbaI* aus den positiven Plasmiden herausgeschnitten, in einem Agarosegel vom Vektor getrennt und die 1,9 kb große Bande durch Gelelektion isoliert (Abb. 3.4a). Die Ariad-Vektoren pA1 und

pA2 wurden ebenso mit den Enzymen *EcoRI* und *XbaI* verdaut und anschließend mit dem MBI-Fermentas Reaktionskit (s. 2.2.1.2.3) von den Reaktionsbestandteilen gereinigt (Abb. 3.4b+c). Die so isolierten und vorbereiteten DNA-Fragmente wurden zur Ligation eingesetzt. Die Ligationsansätze wurden zur Transformation kompetenter *E. coli* DH5 α -Zellen verwandt und diese auf LB-Amp-Platten ausplattiert. Aus so selektierten Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und diese einer analytischen Restriktion unterzogen. Plasmide mit dem korrekten Verdauungsmuster wurden als pVE-ECTM-A1 bzw. pVE-ECTM-A2 bezeichnet (Abb. 3.4d-f).

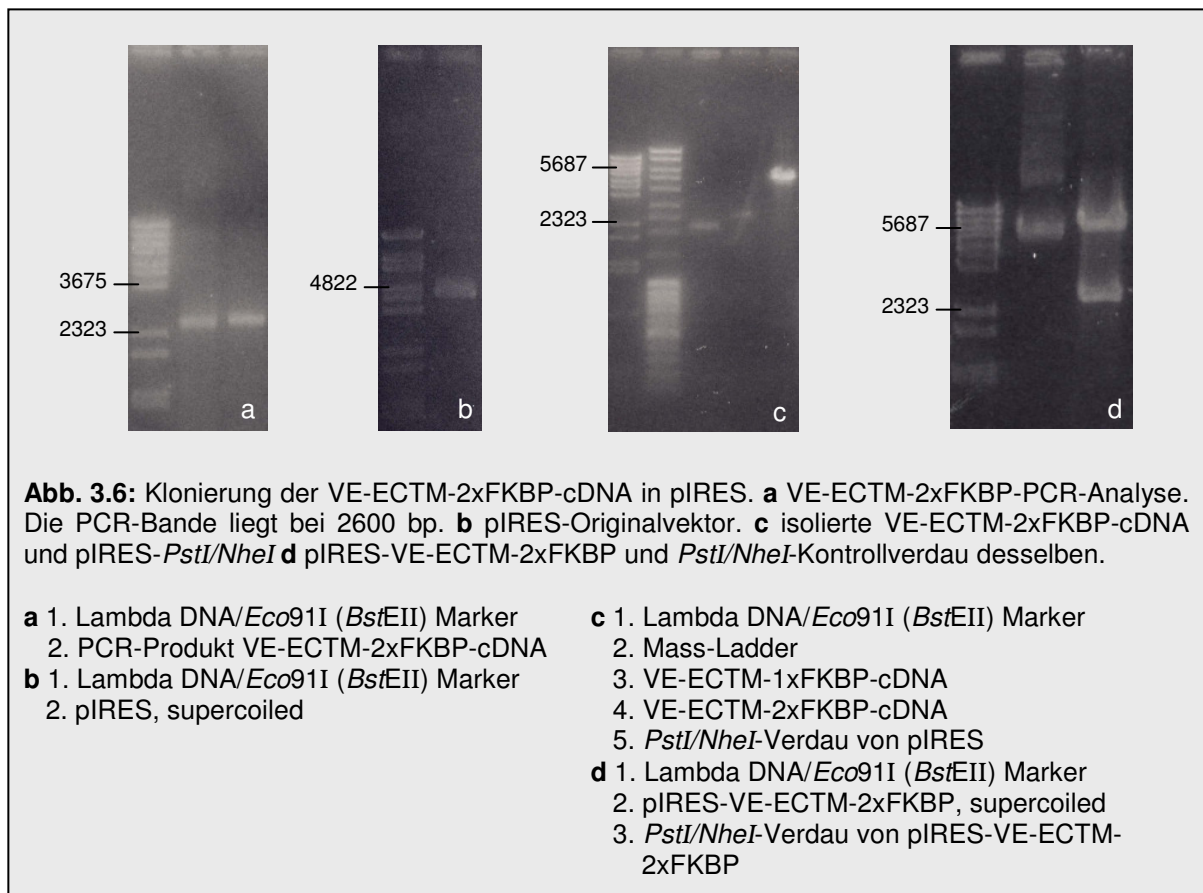


3.1.1.2 Umklonierung der VE-ECTM-1xFKBP- bzw. VE-ECTM-2xFKBP-cDNA in eukaryontische Expressionsvektoren

Die für VE-ECTM-1xFKBP und VE-ECTM-2xFKBP kodierenden cDNAs wurden in verschiedene eukaryontische Expressionsvektoren umkloniert. Die VE-ECTM-1xFKBP-cDNA wurde in einem präparativen Verdau mit den Enzymen *EcoRI* und *ApaI* aus dem Ariad-Vektor pVE-ECTM-A1 herausgeschnitten und über ein 0,8%iges Agarosegel vom Vektor getrennt. Bei diesem Verdau entstanden zwei DNA-Fragmente: ein 2834 bp großes Fragment bestehend aus der ECTM-cDNA (1890 bp) und 944 Basenpaare des Ariadvektors, die die FKBP-cDNA enthielten sowie der Ariad-Restvektor mit 4427 Basenpaaren. Das 2,8 kb große DNA-Fragment wurde aus dem Gel eluiert. Der Vektor pEGFP-C3 wurde ebenfalls mit den Enzymen *EcoRI* und *ApaI* geschnitten und geleliert (Abb. 3.5b). Anschließend wurden die VE-ECTM-1xFKBP-cDNA und der Vektor pEGFP-C3 miteinander ligiert und wiederum DH5 α -Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert. Der so hergestellte Vektor wurde pEGFP-C3⁻-VE-ECTM-1xFKBP genannt. Abb. 3.5c zeigt den Kontrollverdau eines positiven pEGFP-C3⁻-VE-ECTM-1xFKBP-Plasmids. Die Richtigkeit des Konstruktes wurde durch Sequenzierung überprüft.



Die VE-ECTM-2xFKBP-cDNA wurde dagegen in den pIRES-Vektor kloniert und musste dafür erneut durch eine PCR mit pVE-ECTM-A2 als Template amplifiziert werden. Dabei konnten durch die entsprechenden Primer (Oligonukleotidpaar 2, s. 2.2.1.2.5 Tab. 2.2) die benötigten Schnittstellen (*NheI* am 5'-Ende und *PstI* am 3'-Ende der VE-ECTM-2xFKBP-cDNA) eingefügt werden (Abb. 3.6a). Die Größe des VE-ECTM-2xFKBP-Amplifikats (2654 bp) wurde in einem analytischen Agarosegel (Abb. 3.3a) in Gegenwart eines DNA-Größenmarkers überprüft. Das PCR-Produkt sowie der Vektor pIRES wurden in einem präparativen Verdau mit den Enzymen *NheI* und *PstI* geschnitten, mit dem MBI-Fermentas Reaktionskit (s. 2.2.1.2.3) von den Reaktionsbestandteilen und kleinen DNA-Bruchstücken gereinigt und schließlich miteinander ligiert (Abb. 3.6c). Nach der Transformation von DH5 α -Zellen wurden positive Klone durch einen Kontrollverdau der zuvor isolierten Plasmid-DNA identifiziert und der endgültige als pIRES-VE-ECTM-2xFKBP bezeichnete Vektor sequenziert (Abb. 3.6d).



3.1.2 Generierung und Charakterisierung stabiler CHO-Zellklone

Die Vektoren pEGFP-C3⁻-VE-ECTM-1xFKBP und pIRES-VE-ECTM-2xFKBP wurden zur Transfektion von CHO-Zellen verwendet. Beide Vektoren enthielten ein Genitizin-Resistenz-Gen für die Selektion. Als bicistronischer Vektor kodierte pIRES sowohl für VE-ECTM-2xFKBP als auch - durch eine zusätzliche interne ribosomale Bindungsstelle an die Expression des Fusionsproteins gekoppelt - für GFP. Da sich bei pEGFP-C3⁻-VE-ECTM-1xFKBP am Ende der VE-ECTM-1xFKBP-cDNA ein Stopcodon befand, wurde in transfizierten Zellen kein GFP-Fusionsprotein exprimiert. Daher wurde dieser Vektor mit pEGFP-N3 kotransfiziert, um auch diese Zellen - wie die mit pIRES-VE-ECTM-2xFKBP transfizierten - mit Hilfe eines FACS-Gerätes über die Grünfluoreszenz selektieren und vereinzeln zu können. Einzelne so selektierte Zellklone wurden auf ihre Proteinproduktion (Abb. 3.7) und den Einbau der jeweiligen Fusionsproteine in die Zytoplasmamembran überprüft (Abb. 3.8).

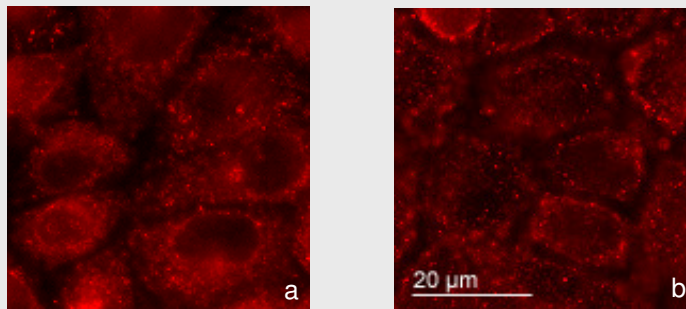
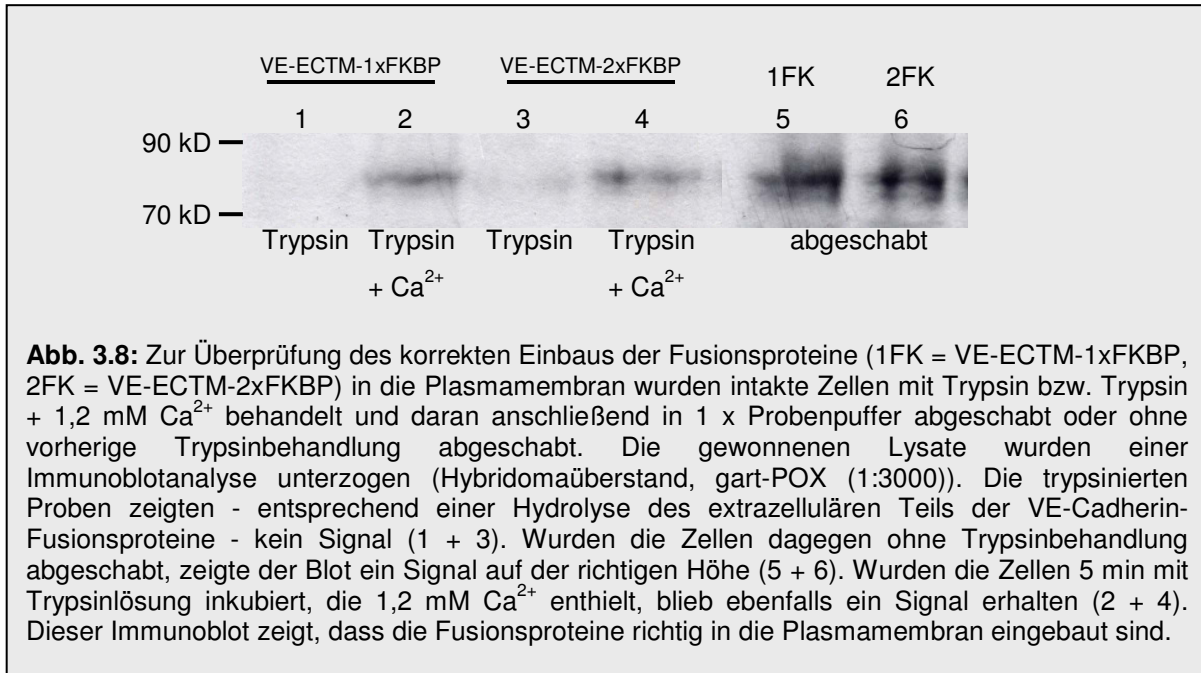


Abb. 3.7: Die Immunfärbungen mit anti-VE-Cadherin (Hybridomaüberstand, gart-Cy3 (1:600)) von **a** pEGFP-C3⁻-VE-Cadherin-1xFKBP- bzw. **b** pIRES-VE-Cadherin-2xFKBP-transfizierten und selektierten Zellen zeigen, dass alle Zellen das entsprechende Fusionsprotein bilden.

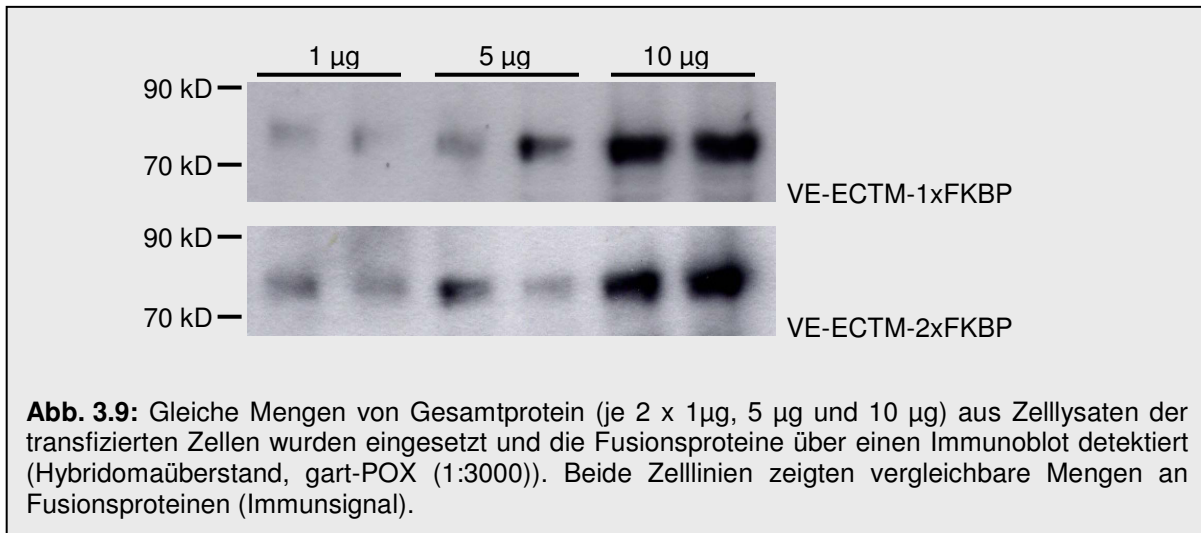
Um den richtigen Einbau der Fusionsproteine in die Zytoplasmamembran zu überprüfen, wurde an intakten Zellen eine Proteasebehandlung mit und ohne extrazelluläres Ca²⁺ durchgeführt. In Ca²⁺-freier Lösung wird die extrazelluläre Domäne von VE-Cadherin von Trypsin gespalten. In Gegenwart von extrazellulärem Ca²⁺ aber wird sie - wie für E-Cadherin (Hyafil et al., 1981; Pokutta et al., 1994) und VE-Cadherin (Baumgartner & Drenckhahn, 2002a) gezeigt - vor der Spaltung durch Trypsin geschützt. So konnte durch verschiedene Versuchsansätze gezeigt werden, dass die Fusionsproteine korrekt in die Plasmamembran eingebaut wurden (Abb. 3.8).

Anhand der Ergebnisse wurde jeweils ein Zellklon ausgewählt.



Dass die exprimierten Fusionsproteine fast ausschließlich innerhalb der Plasmamembran vorliegen, konnte ebenfalls durch die Proteasebehandlung gezeigt werden. Denn bei intakten Zellen werden durch Trypsin nur die extrazellulären Domänen der Proteine, die auf der Zelloberfläche exponiert vorliegen, hydrolysiert. Das Fehlen von immunreaktiven Banden in der Immunoblotanalyse der abgeschabten Zellen zeigt, dass intrazellulär praktisch keine Cadherinmoleküle vorhanden sind.

Da die Stärke der Zell-Zell-Adhäsion nicht nur von der Affinität, sondern auch von der Membrankonzentration der entsprechenden Cadherine abhängt, wurde die Konzentration der Fusionsproteine (VE-ECTM-1xFKBP bzw. VE-ECTM-2xFKBP) in den Zytoplasmamembranen der entsprechenden Zelllinien überprüft. Die hierzu durchgeführten Immunoblotanalysen (Abb. 3.9) zeigten, dass die VE-ECTM-1xFKBP- und VE-ECTM-2xFKBP-exprimierenden Zelllinien vergleichbare Mengen der entsprechenden Fusionsproteine herstellten. Da praktisch alle Fusionsproteine - wie oben gezeigt (Abb. 3.8) - in der Plasmamembran vorlagen, konnten die Signale der Immunoblots (Abb. 3.9) trotz Verwendung von Gesamtproteinlysaten direkt miteinander verglichen werden.



3.1.3 Untersuchung zum Einfluss der Dimerisierung bzw. Oligomerisierung von VE-Cadherin auf die Transinteraktion

Mit der Laserpinzette wurde die VE-Cadherin-vermittelte Bindung zwischen VE-ECTM-1xFKBP- bzw. -2xFKBP-exprimierenden Zellen und VE-Cadherin-Fc-beschichteten Mikroperlen untersucht. Für beide Konstrukte wurden transient transfizierte Zellen (mit den Vektoren pVE-ECTM-A1 und -A2, s. 3.1.1.1) und stabil transfizierte Zellen (s. 3.1.2) verwendet. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte CHO-Zellen. Es gab drei verschiedene Versuchsbedingungen:

1. Konfluente Zellrasen wurden vor der Messung 30 min mit VE-Cadherin-Fc-beschichteten Mikroperlen inkubiert, um die Ausbildung von Bindungen zwischen Perlen und Zelloberflächen zu ermöglichen. Damit wurde eine mögliche Transinteraktion zwischen Dimeren (Perle) und Monomeren (Zelle) untersucht.
2. Konfluente Zellrasen wurden mit dem FKBP-Dimerisierer AP20187 und den Mikroperlen gleichzeitig 30 min inkubiert. So wurde die Adhäsion der sich während der Bindung bildenden Dimere bzw. Oligomere untersucht.
3. Der Zellrasen konfluenter Zellen wurde mit dem FKBP-Dimerisierer für 30 min vorinkubiert und nach dem Zufügen der Mikroperlen weitere 30 min inkubiert. Bei diesem Versuchsansatz hatten sich die Dimere bzw. Oligomere schon gebildet, bevor die Mikroperlen binden konnten.

Nach Ablauf der 30 min wurde die Bindungsfestigkeit der Mikroperlen überprüft. Ließen sich die Perlen durch den auf sie gerichteten Laserstrahl nicht verschieben, galten sie als fest gebunden. Anschließend wurde der Ansatz mit

5 mM EGTA behandelt, um die Spezifität der Bindung zu kontrollieren. Auf nicht transfizierten CHO-Zellen (Kontrolle) hafteten durchschnittlich 38 ± 4 % der Perlen ($n=12$). Dieser Wert konnte durch EGTA-Behandlung nicht weiter verringert werden und wurde als unspezifische Hintergrundbindung mit 100 % gleichgesetzt. Alle gemessenen Bindungen wurden im Verhältnis dazu dargestellt. Die Bindung der mit den Ariad-Vektoren transient transfizierten CHO-Zellen lag ohne vorherige Inkubation mit Dimerisierer bei 86 ± 12 % (VE-ECTM-1xFKBP, $n=11$) bzw. 98 ± 9 % (VE-ECTM-2xFKBP, $n=12$) der Kontrollwerte und damit im Bereich der Hintergrundbindung (Abb. 3.10). Die Haftung der stabil transfizierten CHO-Zellen (s.3.1.2) lag dagegen schon im unbehandelten Zustand mit 131 ± 19 % (VE-ECTM-1xFKBP, $n=26$, $p=0,0059$) bzw. 120 ± 14 % (VE-ECTM-2xFKBP, $n=25$, $p=0,014$) signifikant über den Kontrollwerten (Abb. 3.10). Durch Zugabe von 5 mM EGTA zu dem Kulturmedium dieses Versuchsansatzes, konnte die Anzahl der haftenden Mikroperlen wieder reduziert werden (auf 106 ± 11 % für VE-ECTM-1xFKBP, $n=14$ und 78 ± 9 für VE-ECTM-2xFKBP, $n=16$). Dies zeigte, dass es sich hier um spezifische Cadherin-vermittelte Bindungen handelte (Abb. 3.11).

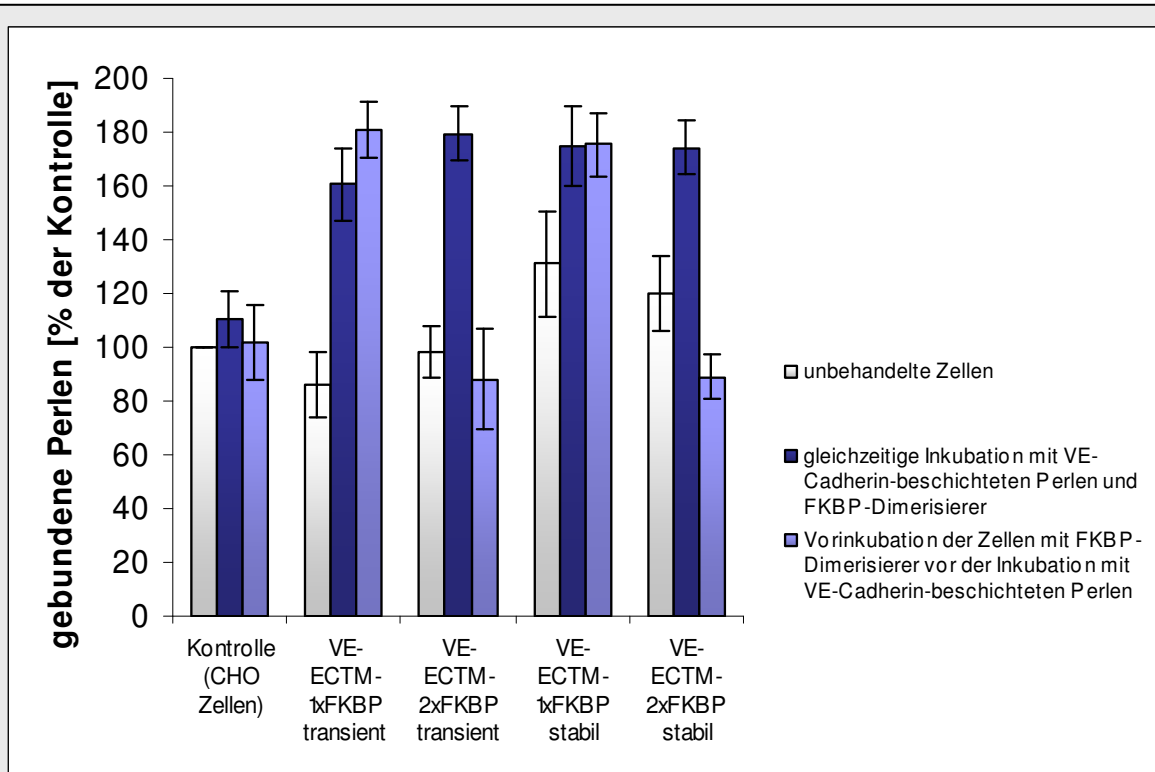


Abb. 3.10: Einfluss der Dimerisierung bzw. Oligomerisierung von VE-Cadherin auf die Transinteraktion von VE-Cadherin-Fusionsproteinen.

Kontrolle (CHO Zellen): Die Haftung lag unter allen Bedingungen bei $100 \pm 10\%$.

VE-ECTM-1xFKBP transient: Durch Dimerisierer erhöhte sich die Perlenhaftung um 74 % ($p=0,0001$), wenn die Dimerisierung gleichzeitig mit bzw. um 95 % ($p=5,4 \times 10^{-7}$), wenn die Dimerisierung vor Zugabe der Perlen geschah.

VE-ECTM-2xFKBP transient: Durch Dimerisierer erhöhte sich die Perlenhaftung bei gleichzeitiger Inkubation von Perlen und Dimerisierer um 81 % ($p=1 \times 10^{-8}$). Nach der Vorinkubation mit Dimerisierer veränderte sich die Haftung nicht.

VE-ECTM-1xFKBP stabil: Durch Dimerisierer erhöhte sich die Perlenhaftung um 75 % (gleichzeitige Inkubation: $p=1 \times 10^{-4}$, Vorinkubation: $p=7 \times 10^{-5}$) gegenüber der Kontrolle, um 44 % (gleichzeitige Inkubation: $p=0,01$, Vorinkubation: $p=0,006$) gegenüber unbehandelten Zellen desselben stabil transfizierten Klons.

VE-ECTM-2xFKBP stabil: Durch Dimerisierer erhöhte sich die Perlenhaftung bei gleichzeitiger Inkubation von Perlen und Dimerisierer um 74 % ($p=9 \times 10^{-5}$) gegenüber der Kontrolle, um 54 % ($p=0,0007$) gegenüber unbehandelten Zellen desselben stabil transfizierten Klons. Nach der Vorinkubation mit Dimerisierer sank die Haftung auf Werte entsprechend der Kontrolle.

	unbehandelt	gleichzeitig	Vorinkubation
Kontrolle (CHO Zellen)	100	110,396151	101,7524735
VE-ECTM-1xFKBP transient	86,1062916	160,571554	180,844208
VE-ECTM-2xFKBP transient	98,3608661	179,49853	88,2330927
VE-ECTM-1xFKBP stabil	130,990133	174,650434	175,439722
VE-ECTM-2xFKBP stabil	119,767763	174,335496	89,0884791

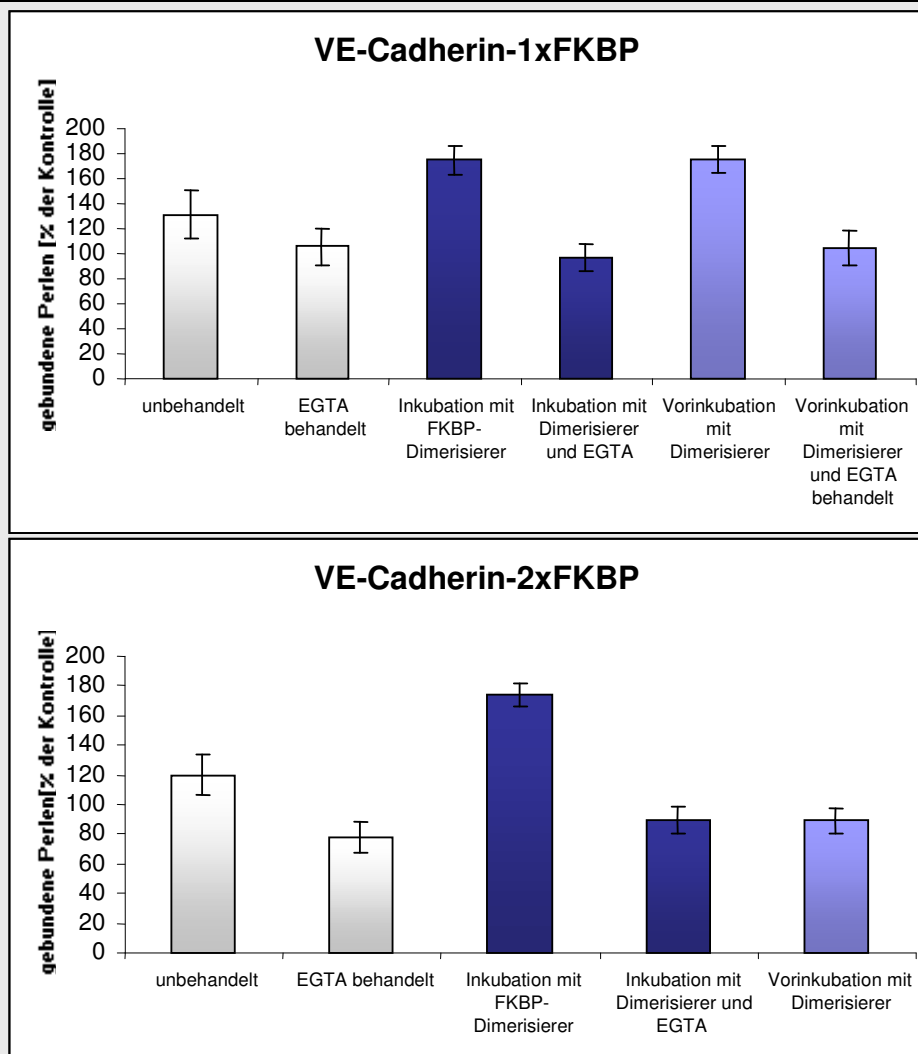


Abb. 3.11: Bindungsaktivität und Ca^{2+} -Abhängigkeit der VE-Cadherin-FKBP-Fusionsproteine in stabil transfizierten CHO-Zellen.

unbehandelt: Die Haftung lag bei 131 ± 19 % (VE-Cadherin-1xFKBP) bzw. 120 ± 14 % (VE-Cadherin-2xFKBP).

EGTA behandelt: Die Haftung sank auf 106 ± 11 % ($n=14$, $p=0,045$) bzw. 78 ± 9 % ($n=16$, $p=1,4 \times 10^{-5}$), vergleichbar der Hintergrundbindung der Kontrolle (vgl. Abb.3.10), was die Spezifität der vorher gemessenen Bindung beweist.

Inkubation mit FKBP-Dimerisierer, anschließend mit EGTA behandelt: Die durch die Dimerisierung (VE-Cadherin-1xFKBP) bzw. Oligomerisierung (VE-Cadherin-2xFKBP) erreichte Steigerung der Haftung auf 175 ± 15 % bzw. 174 ± 10 % ließ sich durch Zugabe von EGTA wieder auf die Werte der EGTA-Kontrollen senken (97 ± 11 %, $n=9$, $p=0,0005$ bzw. 90 ± 8 %, $n=10$, $p=1,7 \times 10^{-6}$).

Vorinkubation mit FKBP-Dimerisierer, anschließend mit EGTA behandelt: Bei Inkubation der Perlen mit schon dimerisierten Fusionsproteinen verstärkte sich die Haftung im gleichen Maß wie bei der gleichzeitigen Inkubation der Zellen mit Perlen und Dimerisierer auf 174 ± 10 % und ließ sich durch EGTA-Behandlung wieder aufheben (104 ± 14 , $n=7$, $p=0,0035$). Dagegen führte eine Inkubation der Perlen mit schon vorgeformten Aggregaten zu keiner Steigerung der Perlenhaftung, sondern die Perlen banden nur entsprechend der EGTA-Kontrolle (89 ± 8 %).

Sowohl eine durch Inkubation mit Dimerisierer erzwungene Dimerisierung von VE-Cadherin-1xFKBP als auch eine Oligomerisierung von VE-Cadherin-2xFKBP erhöhte die Zahl der gebundenen Perlen signifikant (Abb. 3.10, gleichzeitig): Die Bindung erhöhte sich bei transient transfizierten Zellen nach Dimerisierung (VE-ECTM-1xFKBP transient) auf 160 ± 13 % (n=11), bei stabil transfizierten Zellen (VE-ECTM-1xFKBP stabil) auf 175 ± 15 % (n=11). Hatte die Dimerisierung schon stattgefunden, bevor die Mikroperlen mit den Zellen in Kontakt kamen (Vorinkubation), so stieg die Bindung bei transient transfizierten Zellen (VE-ECTM-1xFKBP transient) auf 181 ± 11 % (n=11) (nicht signifikante Steigerung gegenüber der Bindung während der Inkubation mit Dimerisierer, s.o. 160 %, p=0,15), bei stabil transfizierten Zellen (VE-ECTM-1xFKBP stabil) auf 174 ± 10 % (n=9). Wie erwartet, wurde die Adhäsion durch Ca^{2+} -Entzug wieder auf die Kontrollwerte reduziert (in Abb. 3.11 für stabil transfizierte CHO-Zellen gezeigt). Die Oligomerisierung erhöhte die Bindungsaktivität bei transient transfizierten Zellen (VE-ECTM-2FKBP transient) auf 179 ± 10 % (n=12), bei stabil transfizierten Zellen (VE-ECTM-2FKBP stabil) auf 174 ± 10 % (n=11) (Abb. 3.10, gleichzeitig). Es war auffällig, dass eine Vorinkubation von VE-Cadherin-2xFKBP-exprimierenden Zellen mit Dimerisierer die Ausbildung einer Bindung zwischen Zellen und Mikroperlen verhinderte. Wurden die VE-ECTM-2xFKBP-exprimierenden Zellen mit Dimerisierer inkubiert, bevor die Mikroperlen hinzugefügt wurden, banden nicht mehr Perlen als in Kontrollexperimenten; bei transient transfizierten Zellen (VE-ECTM-2FKBP transient) 88 ± 18 % (n=12), bei stabil transfizierten Zellen (VE-ECTM-2FKBP stabil) 89 ± 8 % (n=6) (Abb. 3.10). Diese Werte ergeben eine Steigerung der Bindungsaktivität durch Dimerisierung der VE-Cadherin-1xFKBP-Fusionsproteine im Schnitt um 80 %. Die Steigerung der Bindungsaktivität durch Oligomerisierung der VE-Cadherin-2xFKBP-Fusionsproteine liegt im Schnitt bei 78 %. Lagen schon Oligomere vor, bevor die Mikroperlen mit den Zellen interagierten, war die Bindung nicht erhöht, sondern mit der Kontrolle vergleichbar.

3.1.3.1 Charakterisierung von Zell-Mikroperlen-Kontakten

Es ist bekannt, dass mit VE-Cadherin-Fc-beschichtete Mikroperlen, die an MyEnd-Zellen binden, unter sich endogenes VE-Cadherin, F-Aktin und β -Catenin rekrutieren (Baumgartner et al., 2003b). Auch die in dieser Arbeit verwendeten mit VE-Cadherin-Fusionsproteinen transfizierten CHO-Zellen bildeten zu VE-Cadherin-beschichteten Mikroperlen Kontakte aus. Für die Experimente wurden Latexperlen 30 min auf konfluenten Zellrasen inkubiert. Unbeschichtete Perlen dienten als Negativkontrolle. Die Immunfluoreszenzmikroskopie zeigt, dass die exprimierten Fusionsproteine in der Zellmembran unter den gebundenen VE-Cadherin-Fc-beschichteten Mikroperlen lokalisiert waren. Sie wurden mit einem Antikörper gegen FKBP sichtbar gemacht (Abb. 3.12). Ein signifikantes Rekrutieren geschah nur in Anwesenheit von Dimerisierer.

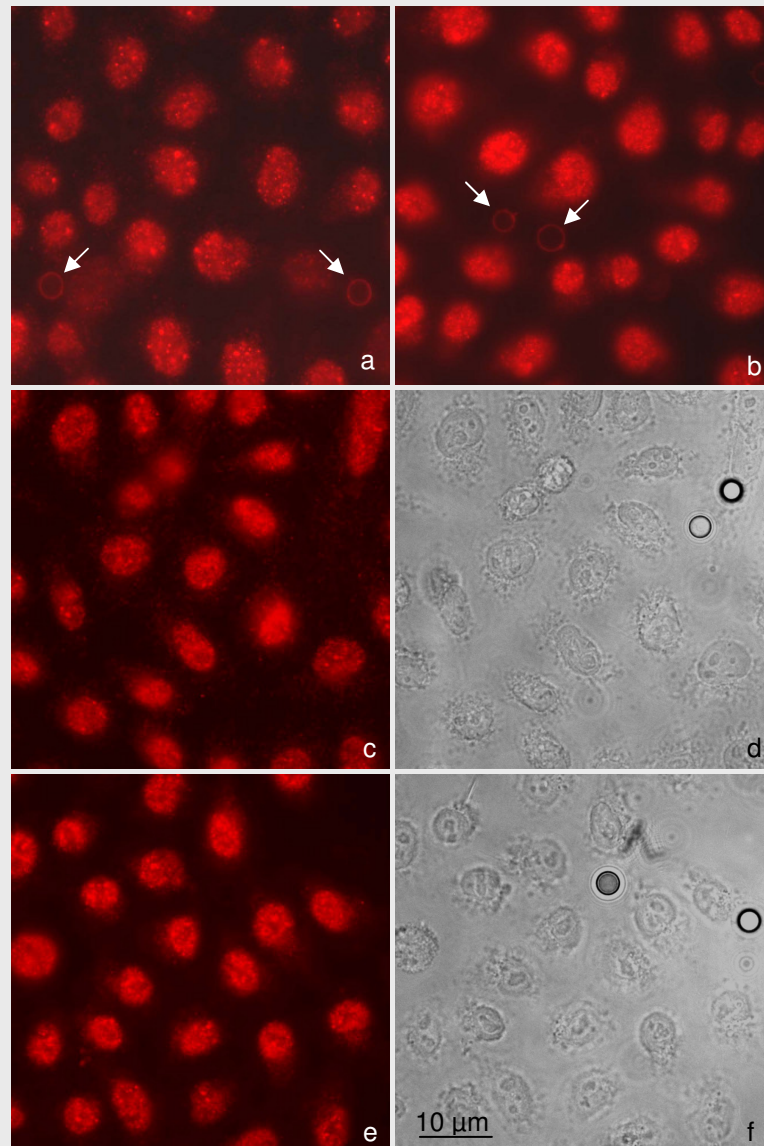


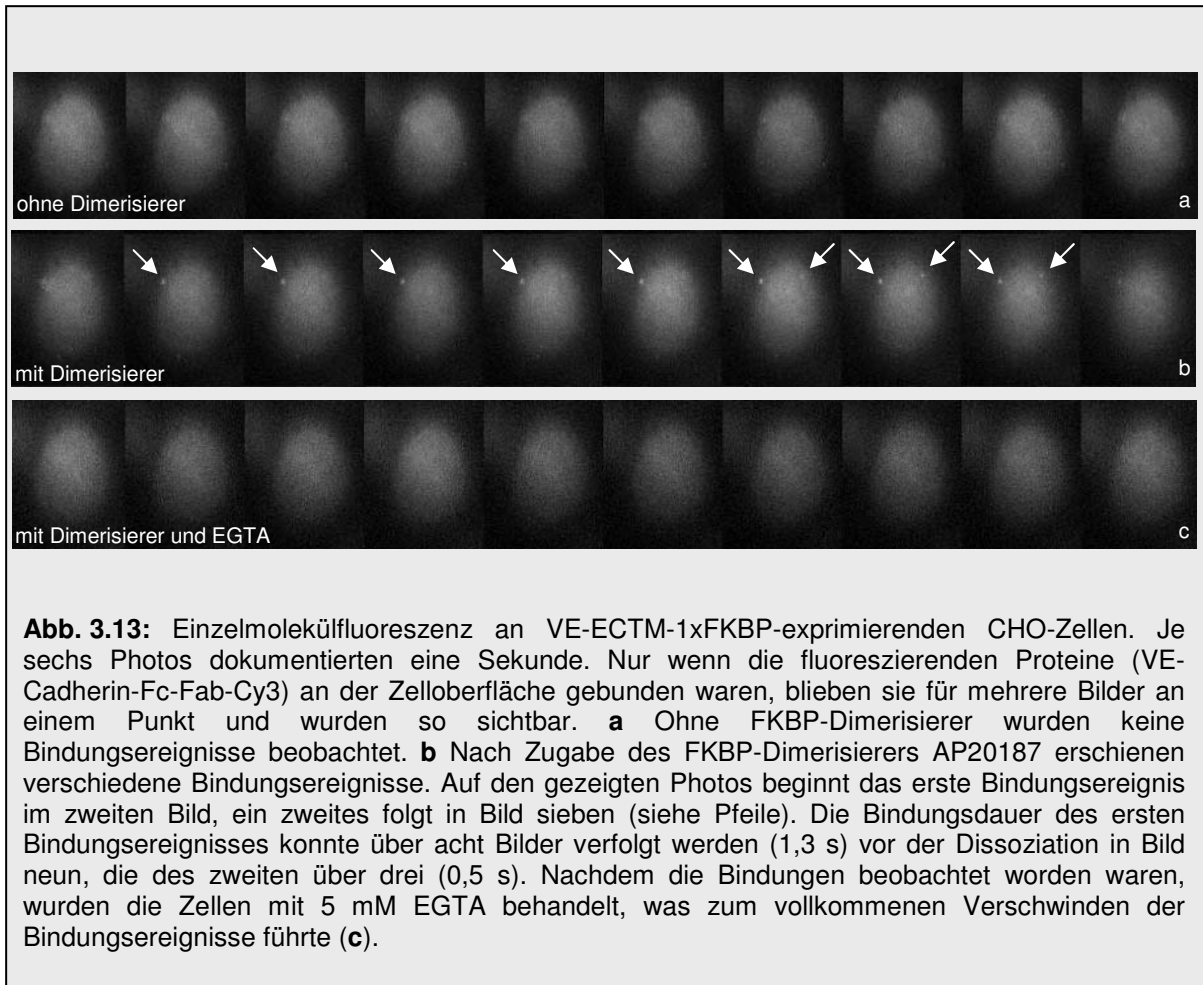
Abb. 3.12: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Bindung von VE-Cadherin-beschichteten Mikropellets an mit VE-Cadherin-Fusionsprotein-exprimierende CHO-Zellen. Der anti-FKBP (1:50) erkannte die VE-Cadherin-FKBP-Fusionsproteine, die in der Zellmembran unter den gebundenen Perlen lokalisiert waren (s. Pfeile in a und b). Als Zweitantikörper wurde garb-Cy3 (1:600) verwendet. **a** zeigt die VE-ECTM-1xFKBP-exprimierenden Zellen, **b** die VE-ECTM-2xFKBP-exprimierenden Zellen. Unter unbeschichteten Latexperlen waren keine FKBP-enthaltenden Proteine erkennbar. **d** und **f** zeigen die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen zu **c** und **e** (**c,d** VE-ECTM.1xFKBP-exprimierende Zellen; **e,f** VE-ECTM-2xFKBP-exprimierende Zellen). Die Fluoreszenz der Zellkerne repräsentiert wahrscheinlich nukleär lokalisiertes endogenes FKBP12, für das der verwendete Antikörper spezifisch ist.

3.1.4 Charakterisierung der Bindung mit Hilfe von Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie

VE-ECTM-1xFKBP- bzw. -2xFKBP-exprimierende Zellen wurden auf Deckgläschen bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend mit fluoreszenzmarkiertem VE-Cadherin-Fc-Cy3 (VE-Cadherin-EC-Dimere-Fc mit Fab-Cy3 markiert) in Zellkulturmedium inkubiert.

Fand diese Inkubation ohne FKBP-Dimerisierer statt, so zeigten die transfizierten Zellen keine nachweisbaren Bindungsereignisse mit VE-Cadherin-Fc-Cy3 (Abb. 3.13a). Dies änderte sich, wenn der Versuch in Gegenwart des FKBP-Dimerisierers durchgeführt wurde. Die Dauer der gemessenen Bindungsereignisse bewegte sich zwischen 500 ms (kürzeste Bindungsdauer) bis 1300 ms (längste Bindungsdauer), was einer Kraft von $K_{off} = 2$ bis $0,77 \text{ s}^{-1}$ entspricht. Insgesamt wurden neun (VE-ECTM-1xFKBP) bzw. vier (VE-ECTM-2xFKBP) Bindungsereignisse ausgewertet. Es ergaben sich nach der Oligomerisierung von VE-ECTM-2xFKBP keine häufigeren oder längeren Bindungsereignisse als nach der Dimerisierung von VE-ECTM-1xFKBP. Abb. 3.13b zeigt exemplarisch die detektierbare Wechselwirkung der dimerisierten VE-ECTM-1xFKBP mit VE-Cadherin-Fc-Cy3-Molekülen.

Wurde anschließend extrazelluläres Ca^{2+} durch Zugabe von 5 mM EGTA komplexiert, so war nach einer Inkubationszeit von 10 min keine Bindung des löslichen VE-Cadherin-Fc-Cy3 an die Zelloberfläche mehr zu sehen. Die Einzelmolekülfluoreszenz-Messung lässt darauf schließen, dass VE-Cadherin-FKBP-Moleküle als Monomere in die Membran eingebaut werden und dort erst zu funktionellen Dimeren assoziieren.



3.2 Herstellen eines monomeren VE-Cadherin-Fusionsproteins mit Dimerisierungsdomäne

Mit Hilfe des Atomkraftmikroskops (AFM) konnten Baumgartner et al. (2000) die Bindungsstärke der VE-Cadherin-Dimer-Dimer-Transinteraktion bestimmen (35-55 pN). In dieser Arbeit wurde die cDNA für ein Protein konstruiert, bei dem die fünf extrazellulären Domänen von VE-Cadherin an eine FKBP-Domäne und einen Hexahistidin-Terminus fusioniert waren (Abb. 3.14). CHO-Zellen wurden mit einem Expressionsvektor, der die cDNA für dieses Fusionsprotein enthielt, transfiziert und ein Zellklon selektiert, der das Protein sezernierte. Dieses wurde aus dem Kulturüberstand affinitätschromatographisch isoliert. Über die FKBP-Domäne konnte das primäre Monomer selektiv dimerisiert werden. Mit diesem monomeren VE-Cadherin-Fusionsprotein ist es künftig möglich zu klären, ob auch monomere Cadherine adhäsive Trans-Bindungen eingehen können und mit welchen biophysikalischen Eigenschaften.

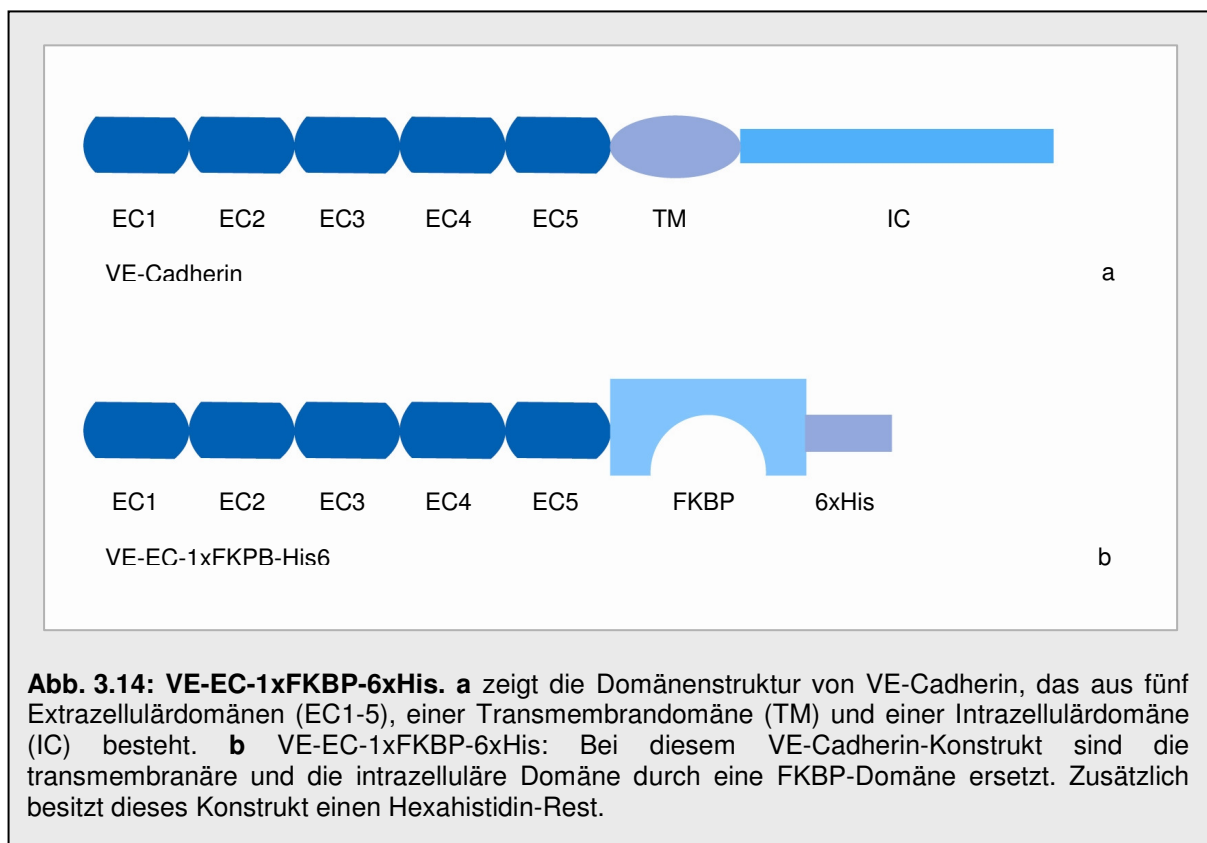


Abb. 3.14: VE-EC-1xFKBP-6xHis. **a** zeigt die Domänenstruktur von VE-Cadherin, das aus fünf Extrazellulärdomänen (EC1-5), einer Transmembrandomäne (TM) und einer Intrazellulärdomäne (IC) besteht. **b** VE-EC-1xFKBP-6xHis: Bei diesem VE-Cadherin-Konstrukt sind die transmembranäre und die intrazelluläre Domäne durch eine FKBP-Domäne ersetzt. Zusätzlich besitzt dieses Konstrukt einen Hexahistidin-Rest.

3.2.1 Herstellung eines Vektors zur Expression des sekretorischen VE-Cadherin-Monomers mit Dimerisierungsdomäne

Die den extrazellulären Teil von VE-Cadherin kodierende cDNA (VE-EC) wurde amplifiziert und in den Vektor pA1 (pC₄-F_v1E, s. 3.1.1.1) kloniert, der über eine FKBP-Domäne verfügte (VE-EC-1xFKBP). Es wurde mit Hilfe synthetisierter Oligonukleotide eine 6xHis-Gruppe eingefügt, die zunächst die Isolierung und später das Ankoppeln des gereinigten Proteins an das AFM ermöglichen sollte (VE-EC-1xFKBP-His). Anschließend wurde das so gewonnene Konstrukt zur stabilen Expression in eukaryontischen Zellen in einen Transfektionsvektor umkloniert, der eine Genitizin-Resistenz zur Selektion der transfizierten Zellen enthielt (s. auch Klonierungsstrategie im Anhang 7.1.2.2.).

3.2.1.1 Klonierung der VE-EC-cDNA in den Ariad-Vektor

Mit Hilfe der PCR wurde die VE-EC-cDNA vermehrt und durch die Wahl der Primersequenzen (Primerpaar 3, s. 2.2.1.2.5 Tab. 2.2) mit den für die Klonierung benötigten Schnittstellen (*EcoRI* am 5'-Ende und *XbaI* am 3'-Ende der VE-EC-cDNA) versehen. Als Template diente wieder der pBlueskriptSK⁻-Vektor (s. 2.2.5), der die gesamte VE-Cadherin-cDNA enthielt. Die Größe des VE-EC-Amplifikats (1794 bp) wurde in einem Agarosegel (Abb. 3.15a) in Gegenwart eines DNA-Größenmarkers überprüft. Das PCR-Produkt sowie der Vektor pA1 wurden in einem präparativen Verdau mit den Enzymen *EcoRI* und *XbaI* geschnitten, von den Reaktionskomponenten und kleinen DNA-Bruchstücken gereinigt (MBI Fermentas Reaktionskit, s. 2.2.1.2.3) und zur Ligation eingesetzt. Nach der Transfektion von DH5 α -Zellen wurden positive Klone durch einen Kontrollverdau identifiziert und der endgültige Expressionsvektor, pVE-EC-A1 genannt, sequenziert (Abb. 3.15b).

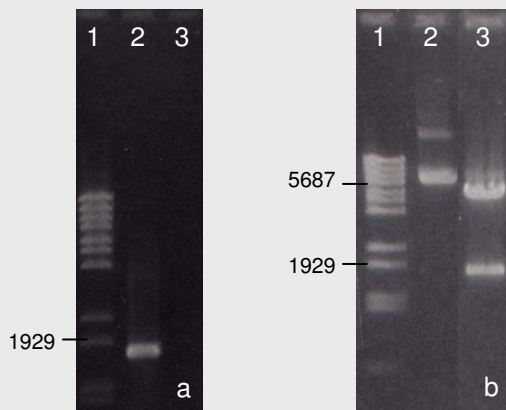


Abb. 3.15: Klonierung der VE-EC-cDNA in pA1. **a** VE-EC-PCR-Analyse. Die PCR-Bande liegt bei 1800 bp. **b** pVE-EC-A1 supercoiled und *EcoRI/XbaI*-Kontrollverdau desselben.

a 1. Lambda DNA/*Eco91I* (*BstEII*) Marker
2. PCR-Amplifikat VE-EC-cDNA
3. Mastermix

b 1. Lambda DNA/*Eco91I* (*BstEII*) Marker
2. pVE-EC-A1, supercoiled
3. *EcoRI/XbaI*-Verdau von pVE-EC-A1

3.2.1.2 Anhängen eines Hexahistidin-Terminus

Der VE-EC-1xFKBP-cDNA sollte nun C-terminal ein Hexahistidin-Terminus (6xHis-Gruppe) angehängt werden, der die Isolierung des sezernierten Proteins über eine Ni-NTA-Säule ermöglichen sollte. Direkt hinter der cDNA für FKBP befand sich in pA1 eine *SpeI*-Schnittstelle und 1213 bp danach enthielt pA1 eine *XhoI*-Schnittstelle. pA1 wurde in einem präparativen Ansatz mit *SpeI* und *XhoI* verdaut und die Vektorbande von 4158 bp aus dem Gel eluiert (Abb. 3.17a, b). Von MWG wurden zwei komplementäre Oligonukleotide (60 pb lang, s. 2.2.1.2.7 Tab. 2.3) hergestellt, die nach dem Aneinanderlagern am 5'-Terminus einen *SpeI*-spezifischen und am 3'-Terminus einen *XhoI*-spezifischen Einzelstrangüberhang besaßen. Des Weiteren kodierte die Oligonukleotidkassette für sieben aufeinanderfolgende Alanine, die als Abstandhalter dienen sollten, damit sich die 6xHis-Gruppe am Fusionsprotein nicht ins Innere faltete, sondern frei zugänglich für die Ni-NTA-Bindung war. Darauf folgten die sechs Histidine des Hexahistidin-Terminus, ein Stop-Codon (da das in pA1 enthaltene bei dem *SpeI-XhoI*-Verdau deletiert worden war), eine *SalI*- und eine *PstI*-Schnittstelle für die spätere Umklonierung in pIRES (Abb. 3.16).

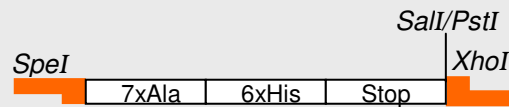


Abb. 3.16: Oligonukleotidkassette zum Anhängen einer 6xHis-Gruppe. Diese kodiert für einen *SpeI*-spezifischen Einzelstrangüberhang, sieben Alanine (7xAla), sechs Histidine (6xHis), ein Stop-Codon (Stop), eine *SalI*-, eine *PstI*-Schnittstelle und einen *XhoI*-spezifischen Einzelstrangüberhang.

Nach dem Aneinanderlagern der beiden synthetisierten Oligomere wurden sie in den *SpeI/XhoI* geschnittenen pA1 ligiert. Positive Klone wurden durch einen Kontrollverdau identifiziert (Abb. 3.18a) und zur Umklonierung der cDNA - kodierend für VE-EC-1xFKBP-His6 - weiterverwendet.

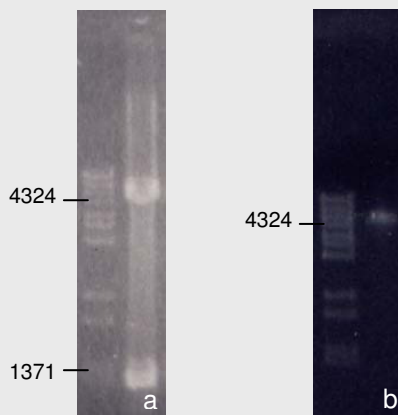


Abb. 3.17: Anhängen eines Hexahistidin-Terminus an die VE-EC-1xFKBP-cDNA. **a** *SpeI/XhoI*-Verdau von pVE-EC-A1 und **b** isolierter linearisierter Vektor pVE-EC-A1.

a 1. Lambda DNA/*Eco91I* (*BstEII*) Marker
2. *SpeI/XhoI*-Verdau von pVE-EC-A1

b 1. Lambda DNA/*Eco91I* (*BstEII*) Marker
2. pVE-EC-A1-*SpeI/XhoI*, geeluliert

3.2.1.3 Umklonierung der VE-EC-1xFKBP-His6-cDNA in einen eukaryontischen Expressionsvektor

Für die Umklonierung der VE-EC-1xFKBP-His6-cDNA wurde in einem präparativen Verdau mit *EcoRI* und *PstI* die gesamte cDNA wieder aus pA1 herausgeschnitten. Das dieser cDNA entsprechende 2086 bp große DNA-Stück wurde geeluliert und mit pIRES, der ebenfalls mit *EcoRI* und *PstI* geschnitten worden war, ligiert (Abb. 3.18). Der hierdurch entstandene Vektor wurde „pIRES-VE-EC-1xFKBP-His6“ genannt und nach der Sequenzierung zur Transfektion von CHO-Zellen verwendet.

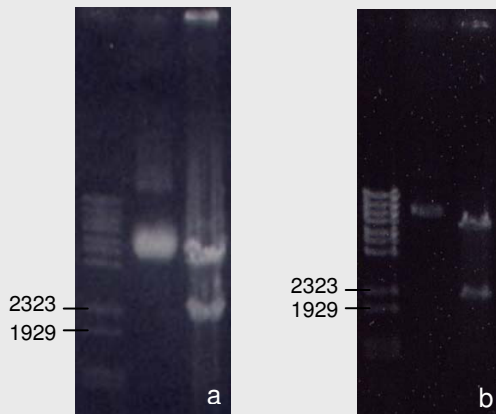


Abb. 3.18: Umklonierung der VE-EC-1xFKBP-His6-cDNA in pIRES. **a** pA1-VE-EC-1xFKBP-His6 supercoiled und *EcoRI/PstI*-Verdau des Plasmids zum Isolieren der VE-EC-1xFKBP-His6-cDNA. Die entsprechende Bande liegt bei 2100 bp. **b** pIRES-VE-EC-1xFKBP-His6 supercoiled und *EcoRI/PstI*-Kontrollverdau desselben.

a 1. Lambda DNA/*Eco91I* (*BstEII*) Marker
2. pA1-VE-EC-1xFKBP-His6, supercoiled
3. *EcoRI/PstI*-Verdau von pA1-VE-EC-1xFKBP-His6

b 1. Lambda DNA/*Eco91I* (*BstEII*) Marker
2. pIRES-VE-EC-1xFKBP-His6, supercoiled
3. *EcoRI/PstI*-Verdau von pIRES-VE-EC-1xFKBP-His6

3.2.2 Generierung und Charakterisierung eines VE-EC-1xFKBP-His6 stabil exprimierenden CHO-Zellklons

CHO-Zellen wurden mit pIRES-VE-EC-1xFKBP-His6 transfiziert und, die Grünfluoreszenz und Genitizinresistenz transfizierter Zellen nutzend, selektiert. Da das Fusionsprotein sezerniert wurde, wurde der Überstand einzelner Klone in einem Immunoblot auf das gewünschte Protein hin überprüft und der Klon mit der stärksten Expression für die anschließende Affinitätschromatographie ausgewählt. Die Transfektion wird in Abb. 3.19 durch eine Immunfluoreszenz des selektierten CHO-Zellklons und einen Immunoblot des Überstands desselben Zellklons dokumentiert.

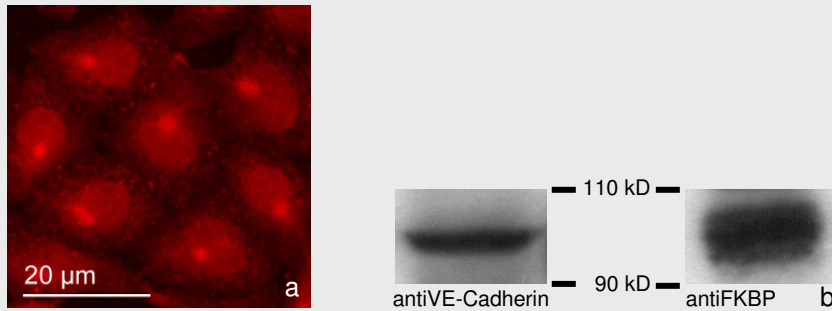


Abb. 3.19: Nachweis der Expression von VE-EC-1xFKBP-His6 durch transfizierte und selektierte CHO-Zellen. **a** Das von den CHO-Zellen produzierte Protein wurde für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit VE-Cadherin-Antikörpern (Hybridomaüberstand) und Zweitantikörpern (gart-Cy3, 1:600) sichtbar gemacht. **b** Im Immunoblot ließ sich das Fusionsprotein im Zellkulturüberstand mit Antikörpern gegen die extrazelluläre Domäne von VE-Cadherin (Hybridomaüberstand, gart-POX 1:3000) und gegen FKBP (a-FKBP 1:500, garb-POX 1:3000) nachweisen.

3.2.3 Proteingewinnung und Charakterisierung des Fusionsproteins VE-EC-1xFKBP-His6

3.2.3.1 Proteinreinigung mit Ni-NTA Affinitätschromatographie

Das von den stabil transfizierten CHO-Zellen exprimierte Fusionsprotein VE-EC-1xFKBP-His6 wurde in den Zellkulturüberstand abgegeben. Je 200 ml Überstand wurden zur affinitätschromatographischen Isolierung über eine Ni-NTA-Agarose-Säule (s. 2.2.3.6.1) gegeben. Der Erfolg der Isolierung wurde über einen Immunoblot und ein Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel aller Fraktionen überprüft (Abb. 3.20).

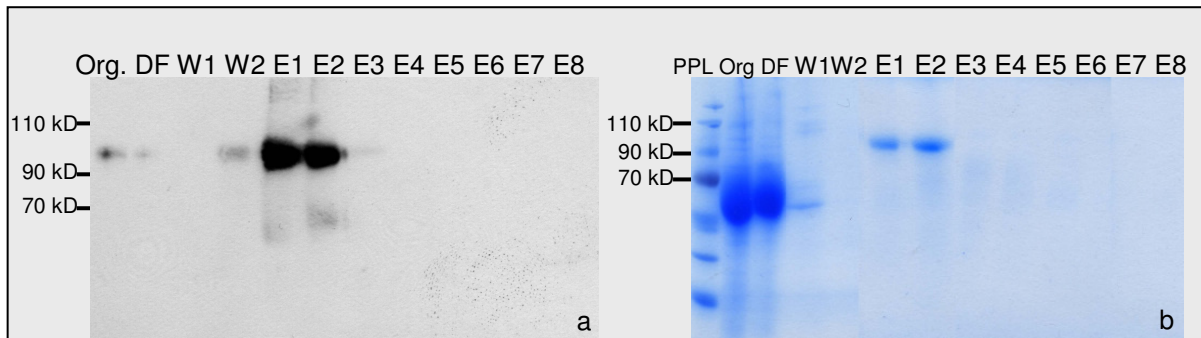


Abb. 3.20: Dokumentation der Isolierung des VE-EC-1xFKBP-His6-Fusionsproteins über eine Ni-NTA-Agarose-Säule durch Immunoblot-Analyse und Coomassie-Blau gefärbtes SDS-PAGE. Aufgetragen wurden jeweils 20 μ l des Kulturüberstandes (Org.), des Säulendurchflusses (DB), des 1. Waschschriffs (W1, 1 mM Imidazol), des 2. Waschschriffs (W2, 20 mM Imidazol) und aller Eluate (E1-E4, 200 mM Imidazol; E5-E8, 500 mM Imidazol). **a** Im Immunoblot wurde das Protein mit anti-VE-Cadherin (Hybridomaüberstand) und gart-POX (1:3000) detektiert. E1 und E2 enthielten das angereicherte Protein. **b** Das Coomassie-Blau gefärbte PAGE zeigt die Reinheit der Reinigung.

So wurden die proteinenthaltenden Fraktionen (Eluat 1 und Eluat 2) identifiziert. Diese Fraktionen enthielten 200 mM Imidazol und wurden für folgende Versuche gegen HBSS dialysiert und ihr Proteingehalt mit der Bradford-Methode bestimmt. Durchschnittliche Proteinkonzentrationen lagen bei 70 - 100 ng/ μ l.

3.2.3.2 Dimer-Beweis durch Gelfiltration

Das gereinigte Protein konnte mit dem FKBP-Dimerisierer AP20187 über die FKBP-Domänen dimerisiert werden. Um die Dimerisierung nachzuweisen, wurde das Absorptionsspektrum einer Gelfiltration des aufgereinigten Fusionsproteins mit dem einer Gelfiltration des Proteins nach Vorinkubation mit Dimerisierer verglichen. Die Gelfiltration wurde mit einer Sepharose-200-Säule (s. 2.2.3.5) durchgeführt. Abb. 3.21 zeigt repräsentative Kurven der Gelfiltrationen mit Standardproteinen Albumin (55 kD), Alkoholdehydrogenase (ADH, 150 kD) und Dextranblau (2000 kD) und je einer Gelfiltration des vermuteten Monomers (100 kD) und des vermuteten Dimers (200 kD).

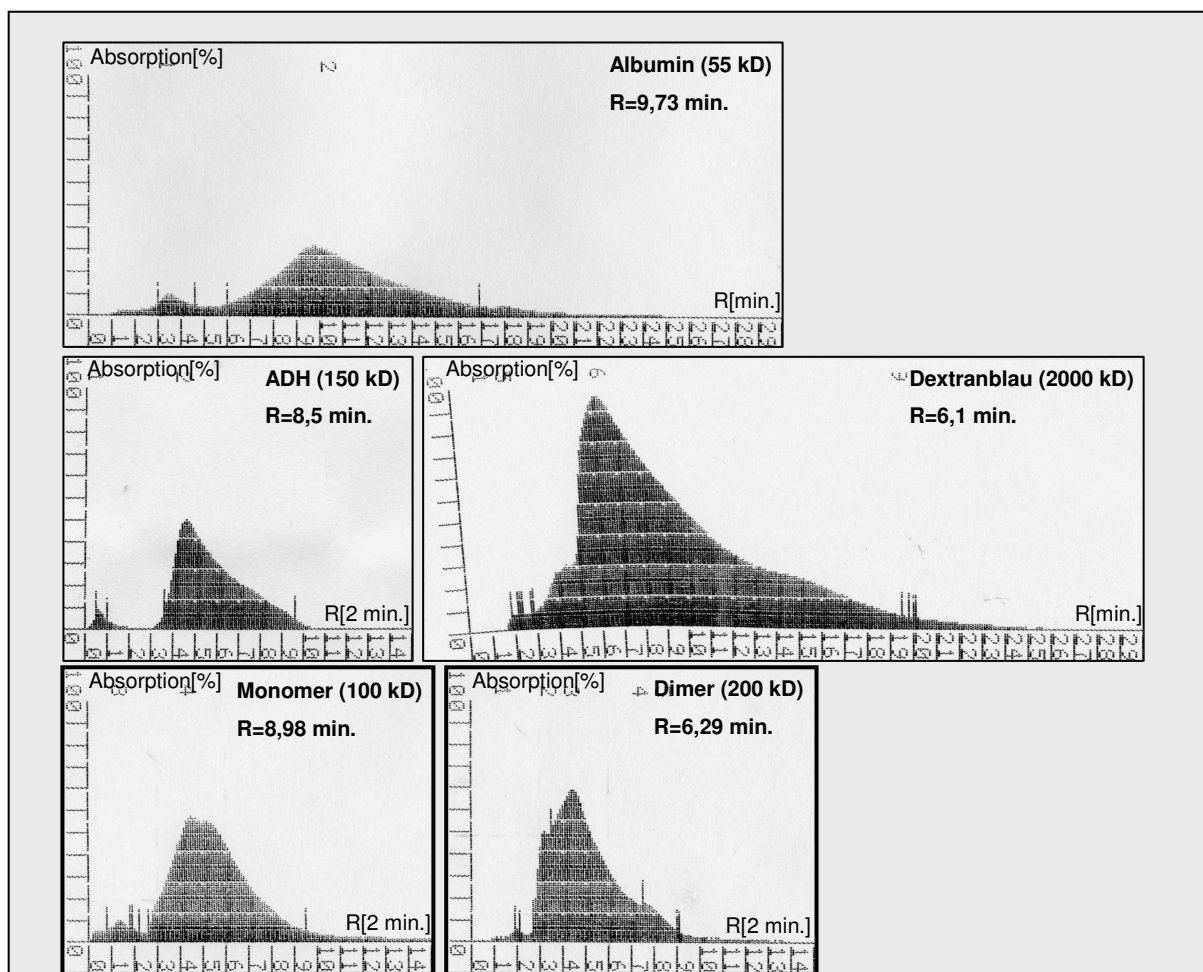
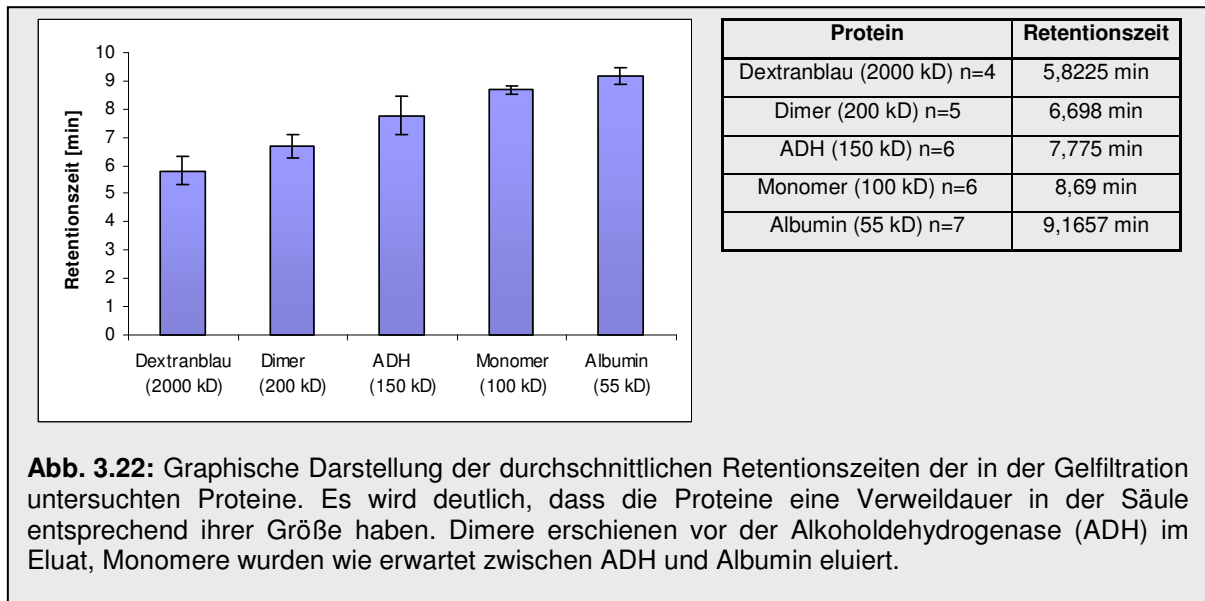


Abb. 3.21: Repräsentative Absorptionsspektren der Sepharose-200-Gelfiltrationen. Die Spektren der drei Standardproteine (Albumin, Alkoholdehydrogenase (ADH) und Dextranblau) sowie die Absorptionsspektren des Fusionsproteins VE-EC-1xFKBP-His6 (Monomer) und dieses Proteins nach 30-minütiger Vorinkubation mit 1 μ M AP20187 (Dimer). Es waren bei der Gelfiltration nicht 100 % der Moleküle dimerisiert, deshalb ist das Maximum des Dimers von nichtdimerisiertem Monomer überlagert, es wird aber durch den steilen Anstieg der Kurve deutlich: Bei einer Laufzeit von 6 min erreichten Dimere im Schnitt 46,25 % Absorption, Monomere dagegen nur 18 %.

Die Mittelwerte der Retentionszeiten der Absorptionsmaxima aller Läufe sind in Tabelle und Diagramm dokumentiert (Abb. 3.22).



Man kann eine deutliche Verschiebung der Absorption zu einer kürzeren Retentionszeit (R) nach Behandlung mit Dimerisierer (Dimer, R = 6,7 min) im Vergleich zum Monomer (R = 8,7 min) erkennen.

3.3 Kolokalisation und Assoziation von VE-Cadherin und TRPC4

Die VE-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion wird nicht nur durch die Expressionsstärke, Bindungsaffinität oder mögliche Bildung von VE-Cadherin-Aggregaten reguliert, sondern ist vor allem von der korrekten Verankerung des Adhäsionsmoleküls am Zytoskelett abhängig. Letzteres zeigt sich dadurch, dass die VE-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion sensibel auf eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration reagiert, da dies zu einer Ca^{2+} -abhängigen Depolymerisation von F-Aktin und zur Aufhebung der Bindung von VE-Cadherin am Zytoskelett führt. Entzündungsmediatoren wie Histamin induzieren über eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration - durch Entleeren der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher und Ca^{2+} -Eintritt über Plasmamembrankanäle - eine erhöhte Endothelpermeabilität.

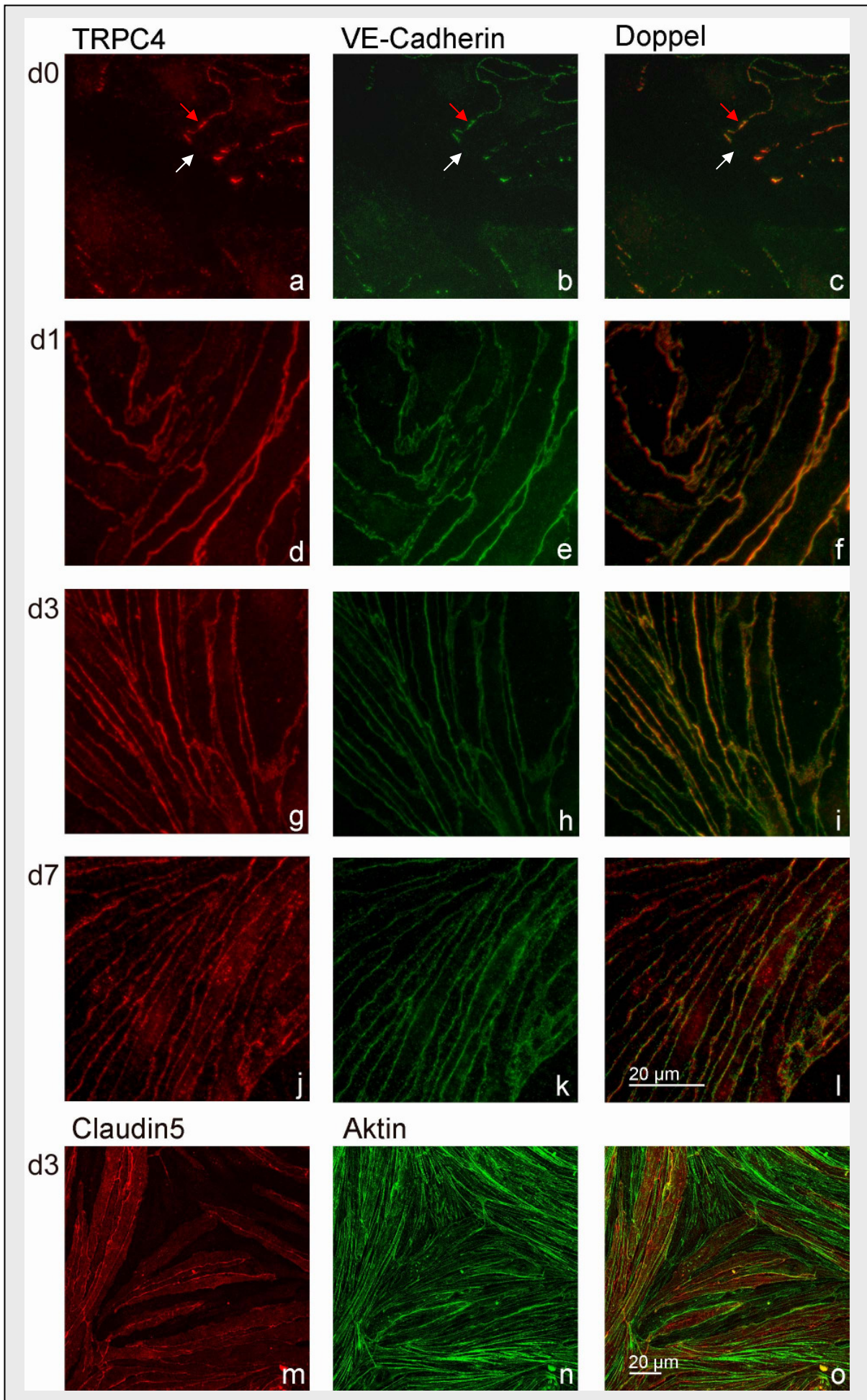
Ein bekannter speicherregulierter/kapazitätsgesteuerter Kationenkanal in Endothelzellen ist der **transient receptor potential channel 4 (TRPC4)**. Aufgrund eines möglichen funktionellen Zusammenhangs zwischen dem TRPC4-abhängigen Ca^{2+} -Einstrom und der VE-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion wurde in dieser Arbeit zunächst die Lokalisation beider Proteine in Endothelzellen untersucht.

3.3.1 Koimmunfluoreszenzen an MyEnd-Zellen

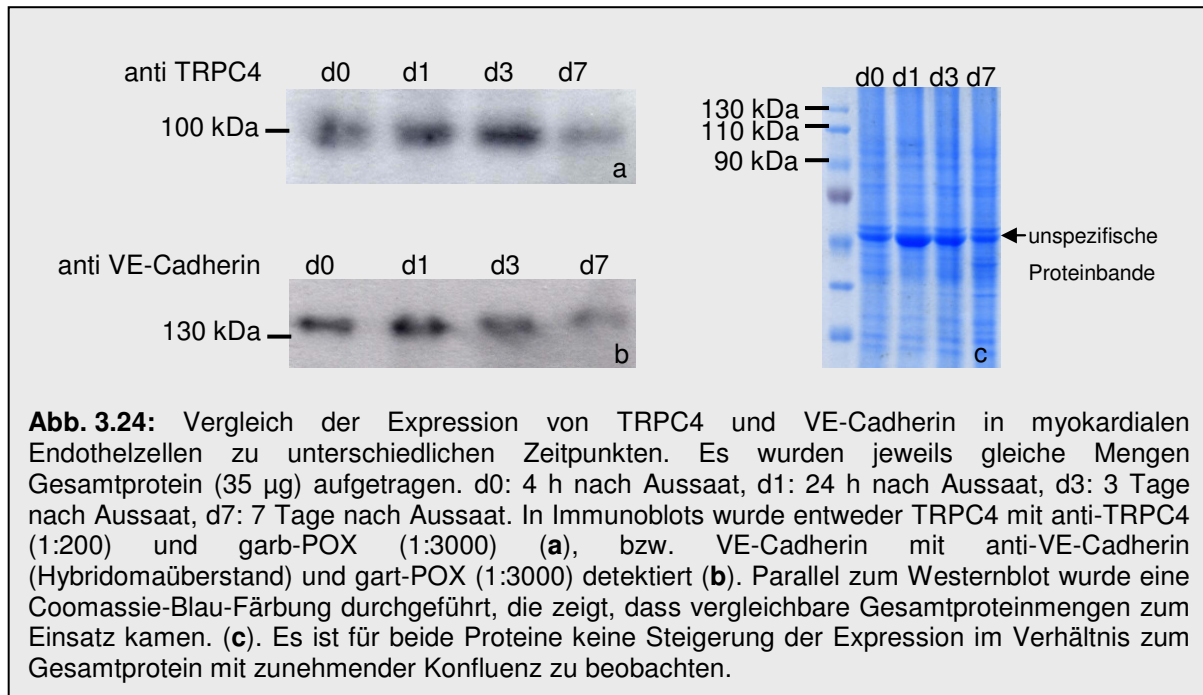
Um die zeitabhängige Expression und Lokalisation von VE-Cadherin und TRPC4 in myokardialen Endothelzellen (MyEnd) zu untersuchen, wurden diese auf Deckgläschen ausgesät und zu unterschiedlichen Zeitpunkten immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. In subkonfluenten Stadien (am Tag der Aussaat fixiert) zeigten manche Zellen kein oder nur ein sehr schwaches und diskontinuierliches Signal für beide Proteine. Ein Signal zeigte sich nur, wo Zellen direkten Kontakt zu Nachbarzellen hatten. In Immunfluoreszenz-positiven Zellen waren immer beide Proteine an den Zellgrenzen detektierbar (Abb. 3.23a-c). Bei Fluoreszenz-Mikroskopien, die von einen Tag alten Zellen gemacht wurden (Abb. 3.23d-f), wie auch bei konfluenten MyEnd-Zellen (nach drei bzw. sieben Tagen fixiert, Abb. 3.23g-l) ist die Färbung schon kontinuierlich entlang aller Zellgrenzen zu sehen. Zum Vergleich der Lokalisation und zeitlichen Expression wurde ein anderes Membranprotein, das Claudin 5 aus dem Schlussleistenkomplex, welches an

der Bildung von Occludensjunctionen beteiligt ist, herangezogen. Dieses zeigt ein anderes Verteilungsmuster als VE-Cadherin und TRPC4. Am dritten Tag nach der Aussaat exprimierten nicht alle Zellen im Verbund Claudin 5. Die Aktin-Färbung zeigte aber deutlich, dass die nicht gefärbten Bereiche auch MyEnd-Zellen enthielten (Abb. 3.23m-o). Dieses unterschiedliche Verhalten unterstützt die Annahme, dass die beobachtete TRPC4-VE-Cadherin-Assoziation spezifisch ist.

Abb. 3.23: Zeitverlauf der Expression von VE-Cadherin und TRPC4 in myokardialen Endothelzellen. Die Zellen wurden zu vier verschiedenen Zeitpunkten fixiert: d0: 4 h nach Aussaat (a-c), d1: 24 h nach Aussaat (d-f), d3: 3 Tage nach Aussaat (g-i), d7: 7 Tage nach Aussaat (j-l). TRPC4 wurde mit anti-TRPC4 (1:50) und garb-Cy3 (1:600) nachgewiesen, VE-Cadherin mit anti-VE-Cadherin aus Hybridomaüberstand und gart-Cy2 (1:600). Am Tag der Aussaat hatten die Zellen nur an einigen Seiten Kontakt zu Nachbarzellen. Es ist auffällig, dass beide untersuchten Proteine nur an Zell-Zell-Grenzen auftauchen (rote Pfeile), nicht aber an freien Zellmembranen (weiße Pfeile, a-c). Sobald die Zellen überall von Nachbarzellen begrenzt werden, ist sowohl TRPC4 als auch VE-Cadherin kontinuierlich in der Membran zu finden (d-l). In einer geringeren Vergrößerung ist die Claudin 5-Färbung dargestellt (m-o). Claudin 5 wurde mit anti-Claudin 5 (1:100) und garb-Cy3 (1:600) angefärbt. Die Fluoreszenzmikroskopie zeigt, dass manche Zellen am dritten Tag nach der Aussaat kein Claudin 5 exprimierten, obwohl VE-Cadherin und TRPC4 schon ab dem ersten Tag bei allen Zellen in der Membran detektierbar war. Die Aktin-Färbung mit Alexa-Phalloidin dient der Darstellung aller Zellen.



Zeitgleich mit den Fixierungen wurden Zellen in Probenpuffer abgeschabt. Die Gesamtproteinkonzentration der Zelllysate wurde mit der Amidoschwarz-Methode bestimmt. In einer SDS-PAGE wurden gleiche Mengen Gesamtprotein aufgetragen, um die Expressionsstärke zu den verschiedenen Zeitpunkten vergleichen zu können. Dabei zeigte sich für beide untersuchten Proteine, dass es während der untersuchten Zeit zu keiner Mengenzunahme im Verhältnis zum Gesamtprotein kam (Abb. 3.24).



3.3.2 Rekrutierung von TRPC4 zu VE-Cadherin vermittelten Kontakten durch Transfektion von TRPC4-exprimierenden HEK-Zellen mit einem VE-Cadherin-GFP enthaltenden Plasmid

Um weitere Hinweise für eine TRPC4-VE-Cadherin-Assoziation zu sammeln, wurden TRPC4-exprimierende HEK 293-Zellen (T4-60) mit einem Vektor transfiziert, der für ein VE-Cadherin-GFP-Fusionsprotein kodierte (pEGFP-C3-VE-Cadherin). TRPC4 wurde durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie dargestellt. Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie zeigte bei nicht kotransfizierten T4-60-Zellen eine diffuse Verteilung von TRPC4 in den Zytoplasmamembranen. In VE-Cadherin-GFP koexprimierenden Zellen kam es zu einer Verstärkung des TRPC4-Immunsignals an VE-Cadherin-enthaltenden Zell-Zell-Kontakten (Abb. 3.25a-c) (84 % richtig Positive, 117 von 140 gezählten Zellgrenzen),

während nur an wenigen Zellkontakten die TRPC4-Immunfluoreszenz unabhängig von der VE-Cadherin-GFP-Expression verstärkt war (16 % falsch Positive, 23 von 140 gezählten Zellgrenzen). Eine Kontrolltransfektion wurde mit einem Vektor durchgeführt, der für ein Occludensjunction-spezifisches Protein kodiert. Dieses Protein, **ZO-1** (Zonula occludens Protein 1), enthielt ebenfalls C-terminal ein GFP-Molekül. TRPC4 wurde nur zu den von VE-Cadherin-induzierten Kontakten rekrutiert, nicht aber zu Zellkontakten ZO-1-exprimierender Zellen.

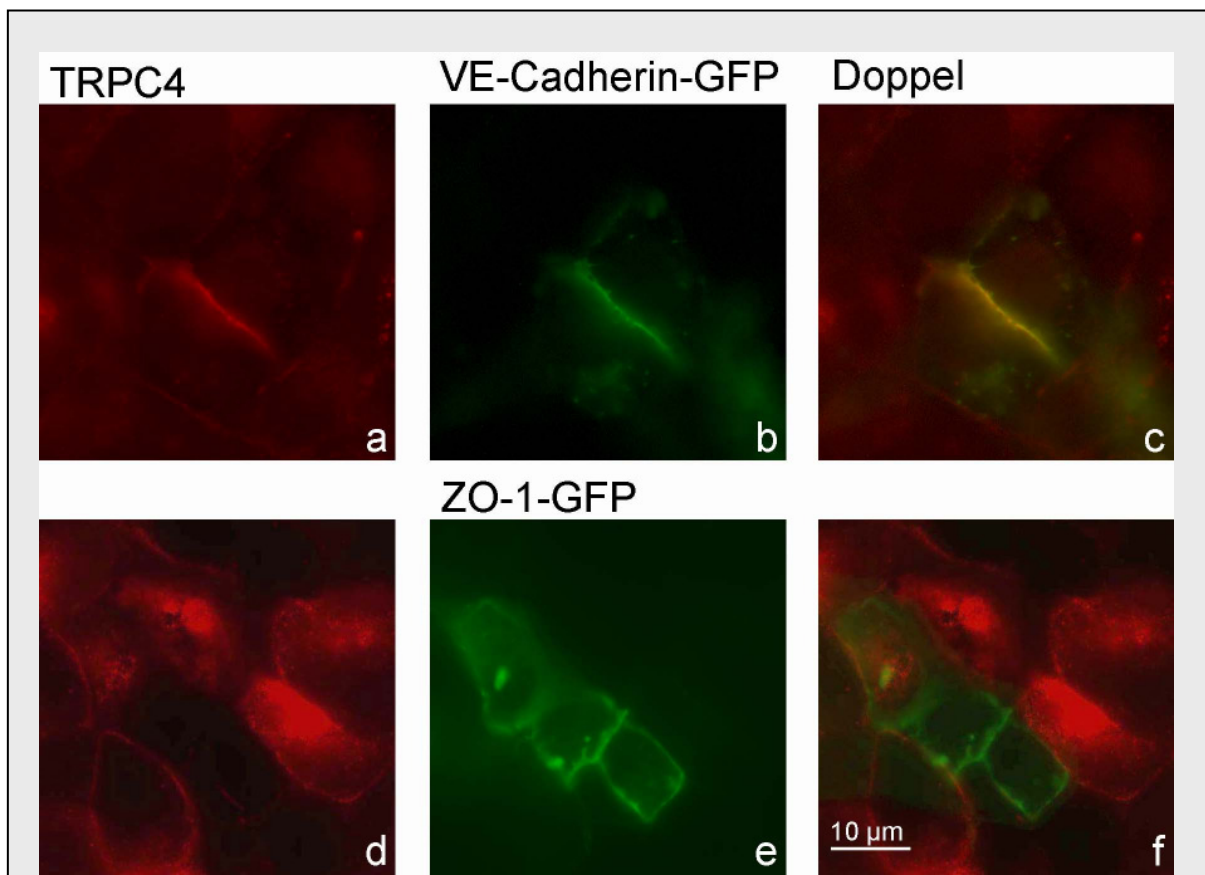


Abb. 3.25: Rekrutierung von TRPC4 zu VE-Cadherin-induzierten Zellkontakten. TRPC4-exprimierende HEK-Zellen wurden transfiziert, sodass sie entweder VE-Cadherin-GFP (a-c) oder ZO-1-GFP exprimierten (d-f). TRPC4 wurde mit anti-TRPC4 (1:50) und garb-Cy3 (1:600) sichtbar gemacht. Alle Zellen zeigen eine leichte Membranfärbung. Die Zellgrenze zweier VE-Cadherin-GFP-exprimierender Zellen tritt deutlich durch helles Aufleuchten hervor (a), die GFP-Fluoreszenz beweist das Vorhandensein von VE-Cadherin an dieser Zellgrenze (b,c). Im Gegensatz dazu zeigen die Fluoreszenzmikroskopien der ZO-1-GFP-exprimierenden Zellen keine Korrelation der TRPC4- und ZO-1-Lokalisation (d-f).

Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Kolo-kalisation von VE-Cadherin und TRPC4, die entweder durch eine direkte Bindung von TRPC4 an VE-Cadherin oder durch die Bindung von TRPC4 an andere VE-Cadherin-bindende Proteine zustande kommen kann.

4 Diskussion

4.1 Überblick

VE-Cadherin ist das Adhäsionsmolekül in Adhärensjunktionen des Endothels und spielt bei der Kontrolle der Barrierefunktion dieser Zellschicht eine wichtige Rolle. Die Bindungseigenschaften von VE-Cadherin werden wahrscheinlich durch die Dimerisierung und Oligomerisierung der VE-Cadherin-Monomere moduliert. Um den Beitrag von Dimerisierung und Oligomerisierung isoliert voneinander zu untersuchen, wurden zwei transmembranäre Fusionsproteine von VE-Cadherin (VE-Cadherin-ECTM-1xFKBP und -2xFKBP) in CHO-Zellen exprimiert, die unabhängig vom Zytoskelett selektiv durch FKBP-Dimerisierer di- bzw. oligomerisiert werden können. Das FKBP-Dimerisierungssystem erlaubt eine induzierbare Dimerisierung von Fusionsproteinen. Bei Verwendung mehrerer FKBP-Domänen ist eine Oligomerisierung von Fusionsproteinen möglich. Zusätzlich zu den transmembranen wurde auch ein lösliches Fusionsprotein (VE-Cadherin-EC-1xFKBP, ohne Transmembrandomäne) hergestellt und gezeigt, dass die FKBP-Domäne funktional ist und sich dimerisieren lässt. Die o.g. Zellklone wurden zunächst auf Expressionsstärke sowie auf die richtige Orientierung und Membranlokalisation der Proteine überprüft. Zwei Zelllinien zeigten das gleiche Expressionsniveau von VE-Cadherin-ECTM-1xFKBP und -2xFKBP und erlaubten so einen qualitativen Vergleich der in folgenden Experimenten ermittelten Bindungseigenschaften.

Bei Messungen mit der Laserpinzette führte eine Dimerisierung von VE-Cadherin-ECTM-1xFKBP ebenso wie eine Oligomerisierung von VE-Cadherin-ECTM-2xFKBP zu einer Steigerung der Perlenhaftung um etwa 75 %. Die starke Expression der Fusionsproteine in stabil transfizierten Zellen führte schon in unbehandeltem Zustand (ohne Zugabe von Dimerisierer) zu einer erhöhten Perlenhaftung. Da diese spontane Haftung die für Cadherine charakteristische Ca^{2+} -Abhängigkeit zeigte (sie konnte durch EGTA-Behandlung verhindert werden) kann von einer geringfügig gesteigerten spezifischen Bindung unter Ruhebedingungen ausgegangen werden, die wahrscheinlich durch spontan gebildete Dimere vermittelt wird. Dass die VE-Cadherin-FKBP-Fusionsproteine als Monomere in die Plasmamembran eingebaut werden und sich dort erst zu funktionellen Dimeren zusammenlagern, zeigten Ergebnisse der Einzelmolekülfluoreszenz-Mikroskopie. Hier war die

Bildung von Cis-Dimeren durch FKBP-Dimerisierung die Voraussetzung für eine Bindung der löslichen Cadherin-Dimere. Für eine effektive Bindung scheint die freie Beweglichkeit der Cadherine während der Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte wichtig zu sein. Wenn die Oligomerisierung von VE-Cadherin-2xFKBP durch Dimerisierung induziert wurde, bevor die Cadherin-Moleküle mit perlengebundenen VE-Cadherin-Fc-Dimeren inkubiert wurden, war die Bindung nicht erhöht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen also, dass für eine effektive Trans-Bindung von VE-Cadherin eine Dimerisierung notwendig ist, während eine weitere durch Dimerisierung erzwungene Oligomerisierung von VE-Cadherin-2xFKBP keine signifikante Steigerung der Bindungsstärke verursacht. Außerdem wird gezeigt, dass die Cadherin-Moleküle für die Ausbildung einer festen Bindung in der Plasmamembran als frei bewegliche Monomere/Dimere vorliegen müssen.

Da der Ca^{2+} -Einstrom durch TRPC4 während Entzündungsreizen eine Schlüsselrolle bei der Erhöhung der Durchlässigkeit endothelialer Junctionen spielt, wurde in dieser Arbeit die Lokalisation von VE-Cadherin und TRPC4 in Endothelzellen untersucht. TRPC4 erscheint in MyEnd-Zellen gleichzeitig mit dem Entstehen von VE-Cadherin-positiven Adhärensjunctionen an den Zell-Zell-Kontakten. Dort ist TRPC4 schon in subkonfluenten Zellen mit VE-Cadherin kolokalisiert. Die Expression von VE-Cadherin-GFP in TRPC4-exprimierenden HEK-Zellen führte zu einer Rekrutierung von TRPC4 zu VE-Cadherin-enthaltenden Zell-Zell-Junctionen. Dies ist ein Hinweis auf eine direkte oder indirekte funktionelle Assoziation von TRPC4 und VE-Cadherin in Endothelzellen.

4.2 Die Cis-Dimerisierung von VE-Cadherin ist notwendig und ausreichend für eine effektive Transinteraktion

4.2.1 Die Fusionsproteine VE-ECTM-1xFKBP und -2xFKBP werden korrekt in die Plasmamembran eingebaut

Für die Untersuchung der Adhäsionsstärke von VE-Cadherin-Dimeren und – Oligomeren, unabhängig von deren Verankerung am Zytoskelett, war es wichtig, dass die Fusionsproteine VE-ECTM-1xFKBP und -2xFKBP korrekt in die Plasmamembran eingebaut wurden. Dies wurde mit Hilfe eines Trypsin-Verdau an kultivierten CHO-Zellen überprüft. Für VE-Cadherin (Baumgartner und Drenckhahn, 2002a) sowie für E-Cadherin (Hyafil et al., 1981; Pokutta et

al., 1994) wurde bereits gezeigt, dass sie in Ca^{2+} -freiem Medium von Trypsin gespalten, durch 1 mM Ca^{2+} aber vor dieser Spaltung geschützt werden (Ozawa et al., 1990a). An unbehandelten Zelllysaten ließ sich VE-Cadherin im Immunoblot nachweisen. Wurden die vitalen Zellen in Ca^{2+} -freiem Medium vor der Lyse mit Trypsin behandelt, verschwand das Signal entsprechend einem Verdau der extrazellulären VE-Cadherin-Domäne. Dies konnte teilweise durch Zugabe von 1,2 mM Ca^{2+} verhindert werden (s. 3.1.2). Dieser durch Ca^{2+} bedingte Schutz vor einem Trypsinverdau war nicht von der Dimerisierung der Fusionsproteine abhängig, konsistent mit Versuchen an trunkiertem VE-Cadherin (Ozawa, 2002). Somit war vor Beginn der Versuche sichergestellt, dass die beiden verwendeten Zellklone Fusionsproteine exprimierten, die in der Plasmamembran in richtiger Konformation vorlagen. Nach Trypsin-Behandlung der Zelllysate verschwand die gesamte Immunreaktivität im Immunoblot. Befänden sich größere Mengen Protein nicht in der Plasmamembran, sondern im Inneren der Zellen (z.B. Zytoplasmavesikel), so würde man erwarten, dass nach der Trypsin-Behandlung in Ca^{2+} -freiem Medium ein Teil des Immunoblot-Signals erhalten bliebe, denn bei intakten Zellen in Kultur kann Trypsin nur die extrazelluläre Domäne erreichen. Damit zeigt dieser Versuch auch, dass das gesamte gebildete Protein in die Plasmamembran eingebaut wurde.

4.2.2 Die zwei in dieser Arbeit hergestellten Zelllinien enthalten vergleichbare Mengen der jeweiligen Fusionsproteine in ihrer Plasmamembran

Es ist bekannt, dass die Adhäsionsstärke von Zellen nicht nur von der Affinität, sondern auch von der Plasmamembrankonzentration der entsprechenden Adhäsionsproteine abhängt (Steinberg & Takeichi, 1994). Um also die Adhäsionsstärke von Monomeren, Dimeren und Oligomeren vergleichen zu können, mussten die zu vergleichenden Zelllinien die gleiche Membrankonzentration ihrer Fusionsproteine aufweisen. Durch Immunoblot wurden die Konzentrationen von VE-ECTM-1xFKBP bzw. -2xFKBP in Zelllysaten verglichen. In weiteren Versuchen wurde gezeigt, dass das gesamte Protein in die Zellmembran eingebaut wurde (s.o.), also die im Immunoblot detektierten Mengen mit den auf der Zelloberfläche erscheinenden Proteinen übereinstimmten. Dies wurde früher schon für natives VE-Cadherin in MyEnd-

Zellen gezeigt (Baumgartner & Drenckhahn, 2002a). So ließen sich die im Immunoblot ermittelten Mengen direkt vergleichen. Die für die Versuche ausgewählten Zellklone enthielten die gleichen Mengen der betreffenden Fusionsproteine in ihrer Plasmamembran (s. 3.1.2), sodass unterschiedliche Bindungsstärken nicht auf eine abweichende Plasmamembrankonzentration zurückzuführen sind, sondern direkt mit der Adhäsion der Cadherin-Fusionsproteine zusammenhängen.

4.2.3 Die VE-Cadherin-FKBP-Moleküle werden als Monomere in die Plasmamembran eingebaut und können dort durch FKBP dimerisiert werden

Es sollte mit Hilfe der VE-Cadherin-FKBP-Fusionsproteine der Unterschied der Bindungsaktivität von Monomeren versus Di- bzw. Oligomeren untersucht werden. Deshalb musste auch geklärt werden, ob diese Proteine als Monomere in die Zytoplasmamembran eingebaut werden oder sich eventuell auf dem Weg dorthin schon zu Dimeren zusammenlagern. Bei Einzelmolekülfluoreszenz-Messungen konnten in Abwesenheit von FKBP-Dimerisierer keine Bindungsereignisse der Moleküle von VE-Cadherin-ECTM-1xFKBP-exprimierenden Zellen mit VE-Cadherin-Fc-Dimeren aus dem Überstand beobachtet werden. Wurden die Zellen vor einer weiteren Messung mit Dimerisierer inkubiert, so wurden Bindungsereignisse auf derselben beobachteten Zelle sichtbar (s. 3.1.4). Dies lässt darauf schließen, dass VE-Cadherin-FKBP-Moleküle als Monomere in die Membran eingebaut werden können und dort erst zu funktionellen Dimeren assoziieren. Inwieweit natives VE-Cadherin schon während des Transports zur Zellmembran dimerisiert kann durch die Experimente nicht geklärt werden.

Das FKBP-Dimerisierungssystem (Spencer et al., 1993) wurde in der experimentellen Zellbiologie schon häufiger zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt (z.B. Spencer et al., 1996; Yap et al., 1997; Schultz & Clardy, 1998; Otto et al., 2001; Grinberg et al., 2002). Um die Dimerisierung der von CHO-Zellen exprimierten Transmembran-Fusionsproteine VE-Cadherin-ECTM-1xFKBP und -2xFKBP über die FKBP-Domäne durch den FKBP-Dimerisierer AP20187 zu beweisen, wurde das sezernierte und gereinigte Fusionsprotein VE-Cadherin-EC-1xFKBP als Modell

verwendet. Es wurde mit und ohne FKBP-Dimerisierer durch Gelfiltrations-Chromatographie analysiert. Dabei ergab sich nach Behandlung mit Dimerisierer eine deutlich kürzere Retentionszeit als ohne Dimerisierer ($R_{\text{Monomer}} = 8,69$ min gegen $R_{\text{Dimer}} = 6,698$ min s. 3.2.3.2.). Auf der gezeigten repräsentativen Kurve eines Absorptionsspektrums des vermuteten Dimers ist das Dimermaximum ($R = 6,29$ min) von einem Maximum mit $R = 8,5$ min teilweise überlagert. Diese Absorption stammt wahrscheinlich von nichtdimerisiertem Monomer. Dies lässt darauf schließen, dass bei der Gelfiltration nicht 100 % der Moleküle dimerisiert waren. Entweder lösten sich Dimere während der Filtration, oder es war im Verhältnis zu wenig bzw. zu viel Dimerisierer vorhanden, sodass nicht alle FKBP-Domänen dimerisiert werden konnten (u.a. weil ein Teil der FKBP-Domänen den Dimerisierer gebunden hat ohne mit einem noch vorhandenen FKBP dimerisieren zu können). Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Konzentration des Fusionsproteins für die Dimerisierung zu gering war. Vergleicht man die Absorption bei einer Laufzeit von 6 min, so erreichten Dimere im Schnitt 46,25 % Absorption, Monomere dagegen nur 18 %. So lässt sich das Absorptionsmaximum der Dimere eindeutig bestimmen. Dies beweist die Dimerisierung von FKBP-tragenden VE-Cadherin-Konstrukten durch den hier verwendeten FKBP-Dimerisierer.

4.2.4 Die Bedeutung von Dimerisierung und lateraler Beweglichkeit der VE-Cadherin-Moleküle in der Plasmamembran bei der Transinteraktion

4.2.4.1 Die Bildung von VE-Cadherin-Dimeren ist für eine Transinteraktion notwendig

Die laterale Dimerisierung zwischen Cadherin-Molekülen (Cis-Dimerisierung) ist für verschiedene klassische Cadherine gezeigt worden (Shapiro et al., 1995; Nagar et al., 1996; Koch et al., 1999; Shan et al., 2000), und diese Cis-Dimerisierung scheint auch für darauf folgende homophile Transinteraktionen von Bedeutung zu sein (Takeda et al., 1999). Transinteraktionen zwischen VE-Cadherin-Cis-Dimeren *in vitro* wurden von Baumgartner et al. (2000) charakterisiert.

In Übereinstimmung mit den Angaben in der Literatur ergaben die Untersuchungen dieser Arbeit auf zellulärer Ebene erstmals eindeutig, dass die

Bildung von VE-Cadherin-Cis-Dimeren für eine effektive Transinteraktion notwendig ist. Dies wurde an VE-Cadherin-ECTM-1xFKBP-exprimierenden Zellen sowohl für lösliche (Einzelmolekülfluoreszenz-Messungen) als auch perlengebundene (mit Hilfe der Laserpinzetten-Technik) VE-Cadherin-Fc-Dimere gezeigt. Die induzierbare Cis-Dimerisierung exprimierter VE-Cadherin-Fusionsproteine (VE-Cadherin-ECTM-1xFKBP) erfolgte in den Experimenten über eine zytoplasmatische FKBP-Domäne (s. 3.1.3. und 3.1.4). So stieg in Versuchen mit der Laserpinzette die Bindungsaktivität infolge der Dimerisierung um circa 75 % gegenüber der Kontrolle (untransfizierte CHO-Zellen oder EGTA-behandelte transfizierte Zellen).

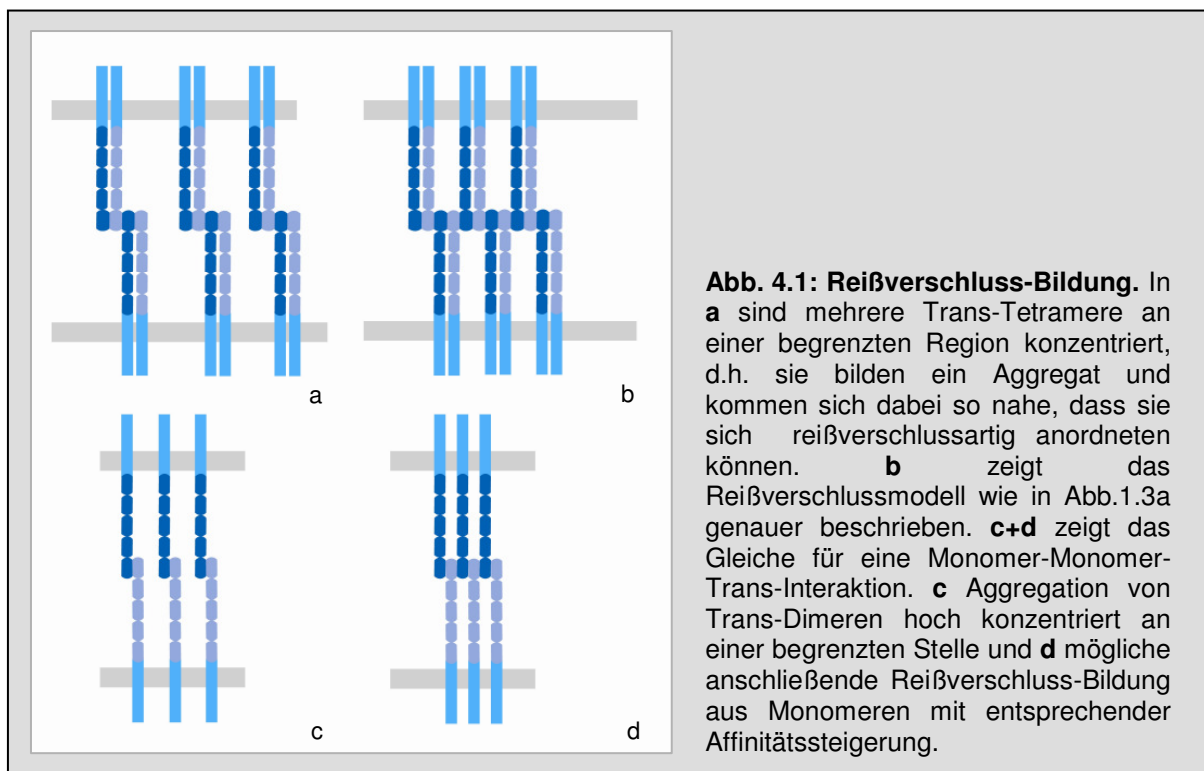
Interessanterweise konnte man bei VE-ECTM-1xFKBP und -2xFKBP konstitutiv exprimierenden Zellen schon vor der Di- bzw. Oligomerisierung der VE-Cadherin-Fusionsproteine eine um 20 bzw. 30 % erhöhte Bindungsaktivität gegenüber der Kontrolle beobachten (s. 3.1.3, Abb. 3.10). Da diese durch Ca^{2+} -Entzug verhindert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um spezifische Interaktionen handelt, die durch die Extrazellulärdomänen der Cadherine vermittelt werden. Dies lässt sich dadurch erklären, dass infolge der starken Expression und damit hohen Konzentration membranärer VE-Cadherin-Fusionsproteine ein Teil der Monomere spontan Dimere bildet, der schließlich für die erhöhte Bindung verantwortlich ist. Eine solche spontane Dimerisierung extrazellulärer Cadherin-Domänen wurde auch in der Literatur bereits beschrieben (Alattia et al., 1997; Koch et al., 1997; Chitaev & Troyanovsky, 1998; Huber et al., 1999; Shan et al., 2004; Lambert et al., 2005). Ebenso wäre es vorstellbar, dass auch Monomere Transinteraktionen eingehen könnten und somit die erhöhte Bindung verursachen. Im Gegensatz dazu zeigten transient transfizierte Zellen in Abwesenheit des Dimerisierers keine erhöhte Bindungsaktivität. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, diese Diskrepanz zu erklären: erstens durch eine geringere Membrankonzentration der Fusionsproteine pro Zelle (Konzentrationsabhängigkeit der spontanen Dimerisierung bzw. monomeren Transinteraktion); zweitens bleibt bei den transient transfizierten Zellen eine Erhöhung der Transinteraktion aus statistischen Gründen möglicherweise unberücksichtigt, da nur eine Subpopulation (die exprimierenden Zellen) für Transinteraktionen zur Verfügung steht.

Aufgrund des Auftretens spontaner Cis-Dimerisierungen ist es notwendig auszuschließen, dass die nach Dimerisierung an VE-ECTM-1xFKBP-exprimierenden Zellen gemessene Bindungsaktivität durch eine Oligomerisierung spontan entstandener Dimere entsteht, sodass die so entstandenen Oligomere die gesteigerte Bindungsaktivität hervorrufen. Dann müsste allerdings das Bindungsverhalten der VE-ECTM-1xFKBP-exprimierenden Zellen bei allen Versuchsansätzen dem der VE-ECTM-2xFKBP-exprimierenden Zellen entsprechen. Eine Vorinkubation mit Dimerisierer verhinderte aber bei VE-ECTM-2xFKBP-exprimierenden Zellen die Bindung (s. 3.1.3, Diskussion dazu s. 4.1.4.3), wohingegen die VE-ECTM-1xFKBP-exprimierenden Zellen die gleiche Steigerung der Bindungsaktivität zeigten wie bei gleichzeitiger Inkubation von Dimerisierer und Perlen mit den Zellen. Außerdem konnte bei unbehandelten Zellen (ohne Dimerisierer) mit Hilfe der Einzelmolekülfluoreszenz-Technik keine Interaktion zwischen löslichen VE-Cadherin-Fc-Dimeren und möglichen spontan gebildeten VE-Cadherin-Dimeren auf der Zelloberfläche gemessen werden (s.u.). Dies wäre aber bei einer stabilen Cis-Dimer-Bildung membrangebundener VE-Cadherin-Fusionsproteine zu erwarten (Baumgartner et al., 2003b).

Stabil transfizierte Zellen wurden auch für Einzelmolekülfluoreszenz-Messungen verwendet. Hier war eine spontane Cis-Dimerisierung oder eine hohe Konzentration von Monomeren für eine detektierbare Bindung löslicher VE-Cadherin-Fc-Dimere nicht ausreichend. Dass im Gegensatz dazu eine Bindung der perlengebundenen VE-Cadherin-Fc-Moleküle erfolgte (s.o.) lässt sich durch die Bindung der VE-Cadherin-Fc-Dimere an die Perlen und die Immobilisierung der Perlen auf der Oberfläche der Zellen erklären, wohingegen die VE-Cadherin-Fc-Dimere bei Einzelmolekülfluoreszenz-Experimenten gelöst im Medium vorlagen. Sobald die membranären Fusionsproteine jedoch dimerisiert wurden, konnte eine Transinteraktion mit den frei in Lösung vorliegenden VE-Cadherin-Fc-Dimeren stattfinden.

Die Notwendigkeit von Cis-Dimeren für die Ausbildung effektiver Trans-Interaktionen liegt wahrscheinlich darin begründet, dass die Trans-Bindungsstellen erst durch eine von der Dimerisierung induzierten Konformationsänderung entstehen. Die darauf folgende Transinteraktion wird von Cis-Dimeren vermittelt (Shapiro et al., 1995; Briher et al., 1996; Tamura,

1998; Pertz et al., 1999; Takeda et al., 1999; Shan et al., 2000). Ebenfalls diskutiert wird das Lösen der Cis-Dimere durch eine Trans-Dimerisierung, sodass die folgende Transinteraktion durch Monomer-Wechselwirkungen entsteht („trans-Trp-Dimerisierungsmodell“, s. 1.5, Boggon et al., 2002). Infolge einer Verankerung am Zytoskelett kann es in beiden Fällen anschließend zur Aggregation der transinteragierenden Cadherin-Monomere bzw. -Dimere kommen (Shapiro et al. 1995). Eine mögliche Multivalenz und Kooperativität kann dann zu zusätzlichen Interaktionen benachbarter Trans-Dimere bzw. Trans-Tetramere führen (Reißverschlussmodell, s. Abb.1.3a) und somit zu einer weiteren Affinitätssteigerung.



Die Versuche können nicht ausschließen, dass der bindende Komplex ein Hexamer darstellt (gemäß dem Hexamerisierungs-Modell, siehe 1.5, Legrand et al., 2001). Allerdings zeigen sie eindeutig, dass die einzige Vorbedingung für eine Transinteraktion eine Cis-Dimerisierung der VE-Cadherin-Moleküle ist.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die Cis-Dimerisierung der VE-Cadherin-Moleküle die Voraussetzung für eine Transinteraktion darstellt. Die adhäsive Aktivität der Cadherine könnte demnach durch die Zahl der lateralen Dimere kontrolliert werden und somit von einer geringen (vermittelt

durch die intrinsische Aktivität der Extrazellulärdomänen) zu einer starken Bindung (durch eine Verankerung am Zytoskelett) reichen (s.u. 4.1.4.3).

4.2.4.2 Eine forcierte Oligomerisierung der VE-Cadherin-2xFKBP-Fusionsproteine führt zu keiner Steigerung der Bindungsaktivität

Die Aggregation von Cadherin-Molekülen, z.B. durch reißverschlussartige Trans-Oligomerisierung (Shapiro et al. 1995), wurde schon häufig als allgemeiner Mechanismus bei der Modulation der Adhäsion genannt (Lotz et al., 1989; Adams et al., 1996; Angres et al., 1996). Um dies experimentell zu beweisen, arbeiteten Yap et al. (1997) mit dem FKBP/FK1012-Oligomerisierungssystem. Sie exprimierten in CHO-Zellen ein Fusionsprotein bestehend aus der extrazellulären und transmembranären Domäne von C-Cadherin sowie einer aus drei FKBP-Domänen bestehenden zytoplasmatischen Domäne. Durch intrazelluläre Oligomerisierung wurde auch eine Aggregation der Extrazellulärdomänen bewirkt, die zu einer signifikanten Steigerung der zellulären Adhäsionsstärke führte. Daraus schlossen Yap et al. (1997), dass die extrazelluläre Domäne alleine nicht ausreicht, eine Aggregation anzutreiben, sondern dass dies zusätzlich die zytoplasmatische Domäne erfordert.

Dieser Versuchsansatz betrachtete die Adhäsion von Monomeren und verglich diese mit der Adhäsion von Oligomeren. Ein wichtiger Schritt bei der Ausbildung der Cadherin-Bindung scheint aber die Dimerisierung zu sein (s.o.), die in der Arbeit von Yap et al. (1997) nicht berücksichtigt wurde, sodass die Autoren nicht zwischen dem Einfluss der Dimerisierung und Oligomerisierung auf die Bindungsstärke unterscheiden konnten.

Diese Lücke versucht die vorliegende Arbeit zu schließen. Hierzu wurden zwei verschiedene Fusionsproteine eingesetzt, die eine kontrollierte Dimerisierung (VE-ECTM-1xFKBP) bzw. Oligomerisierung (VE-ECTM-2xFKBP) erlaubten. Die Versuche zeigten, dass die Cis-Dimerisierung eine signifikante Steigerung der Adhäsion um 75 % bewirkte. Die durch Oligomerisierung hervorgerufene Adhäsion stieg ebenfalls um 75 %. Interessanterweise ergab somit die Oligomerisierung gegenüber der forcierten Dimerisierung keine weitere Steigerung der Adhäsion. Auch bei Messungen der Bindungsereignisse mit Hilfe der Einzelmolekülfluoreszenz-Mikroskopie kam es nach Oligomerisierung

von VE-ECTM-2xFKBP weder zu häufigeren noch zu längeren Bindungsereignissen als nach Dimerisierung von VE-ECTM-1xFKBP. Allerdings ist es möglich, dass eine Oligomerisierung der VE-ECTM-2xFKBP-Dimere nach Ausbildung von Transinteraktionskomplexen nicht stattfinden kann, da die Distanz zwischen den perlengebundenen Dimeren zu groß sein könnte (Die VE-Cadherin-Fc-Dichte auf Perlen beträgt wahrscheinlich nur 100-1000 Moleküle/ μm^2 , Baumgartner et al., 2003b). Der mögliche Einwand, dass sich VE-ECTM-1xFKBP-Cis-Dimere spontan bilden und diese durch anschließende Behandlung mit Dimerisierer oligomerisiert werden, sodass auch hier Oligomere für die Steigerung der Bindungsaktivität verantwortlich wären, wurde bereits in Abschnitt 4.1.4.1 entkräftet, sodass noch einmal betont werden kann: Durch forcierte Oligomerisierung wird keine höhere Bindungsaktivität erreicht als durch forcierte Dimerisierung. Allerdings sind die gebildeten Dimere mobil in der Plasmamembran und können sich durch Interaktion mit ihren Bindungspartnern auf der gegenüberliegenden Seite, ob Perle oder Zelle, zu Aggregaten zusammenfinden. Das bedeutet, dass entweder eine Cis-Dimerisierung genügt, um eine effektive Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Bindung auszubilden, oder dass extrazelluläre Cis-Dimere ausreichen, um ein Aggregieren zu bewirken. Dass es bisher noch nicht möglich war, Cadherin-Aggregate biochemisch nachzuweisen, wird mit der Sensitivität dieser Strukturen gegenüber Detergentien begründet (Ozawa, 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Cis-Dimerisierung den entscheidenden Schritt bei Zell-Zell-Wechselwirkungen darstellt. Diese in der Plasmamembran beweglichen Dimere aggregieren möglicherweise während der Ausbildung von Adhäsionskontakten durch die Wechselwirkung mit gegenüberliegenden Dimeren, sodass eine forcierte Oligomerisierung keine weitere Steigerung der Bindungsaktivität bewirken kann.

4.2.4.3 Effektive Cadherin-Interaktionen sind nur möglich, wenn die Cadherine in der Membran beweglich sind

Untersuchungen zur Oligomerisierung zeigten interessanterweise ein unterschiedliches Bindungsverhalten zwischen VE-ECTM-2xFKBP-exprimierenden Zellen und VE-Cadherin-beschichteten Perlen in Abhängigkeit davon, ob die Zellen gleichzeitig mit Dimerisierer und Perlen inkubiert wurden

oder ob sie schon vor Zugabe der Perlen mit dem Dimerisierer behandelt wurden. Bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit Dimerisierer und Perlen werden während der Ausbildung der Bindungen durch den Dimerisierer Oligomere induziert, was zur Bindung der Perlen an die Zellen führt. Die Vorinkubation VE-ECTM-2xFKBP-exprimierender Zellen mit Dimerisierer vor Zugabe VE-Cadherin-beschichteter Perlen führte allerdings dazu, dass Interaktionen zwischen Zellen und Perlen nicht stärker waren als bei der Kontrolle (untransfizierte Zellen, s. 3.1.3). Im Gegensatz zur gleichzeitigen Inkubation waren die VE-Cadherin-2xFKBP-Fusionsproteine bei der Vorinkubation schon oligomerisiert (zu größeren Aggregaten zusammengelagert), bevor diese mit den VE-Cadherin-Fc-Dimeren der Perlen in Kontakt kamen. Das Aggregieren führte wahrscheinlich zu einer Immobilisierung der Cadherin-Fusionsproteine, sodass den einzelnen VE-Cadherin-2xFKBP-Proteinen die nötige laterale Mobilität fehlte, um eine Transinteraktion mit perlengebundenen Dimeren einzugehen. Demnach war eine feste Bindung nur möglich, wenn Cadherine während der Ausbildung der Bindung in der Membran beweglich waren, sich also den VE-Cadherin-Fc-Dimeren auf den Mikroperlen anpassen konnten.

Dieses Verhalten steht im Einklang mit Resultaten von Baumgartner et al. (2003b), bei denen ein dynamisches Aktinfilamentsystem, an welches Cadherine intrazellulär gebunden sind, für die Ausbildung von VE-Cadherin-Bindungen notwendig ist. So sind auch hier für die Ausbildung der Bindung in der Plasmamembran lateral bewegliche Cadherine Voraussetzung. Dies zeigt sich darin, dass an kultivierten Endothelzellen ein Stabilisieren bzw. Fixieren des Aktinfilamentsystems durch das Toxin Jasplakinolid die Cadherin-vermittelte Adhäsion verhindert (Baumgartner et al. 2003b). Ein Stabilisieren des Aktinfilamentsystems, nachdem die Bindung stattgefunden hatte, erhöhte dagegen die Bindung, vergleichbar mit den sich während der Bindung ausbildenden VE-ECTM-2xFKBP-Aggregaten. Dieser Effekt lässt sich durch die erhöhte Konzentration und die geringe Diffusionsmöglichkeit der Cadherin-Fusionsproteine nach der Bindung erklären und unterstützt die Theorie, dass die Cadherin-Adhäsion vor allem durch die Regulation der lateralen Mobilität der Cadherin-Moleküle in der Plasmamembran kontrolliert wird (Baumgartner & Drenckhahn, 2002c). Dabei wird davon ausgegangen, dass eine gewisse

Immobilisierung der Cadherine - im Normalfall durch eine Verankerung am Zytoskelett - benötigt wird, weil die einzelne Cadherinbindung eine sehr geringe Affinität aufweist ($k_{\text{off}} = 1,4 \text{ s}^{-1}$). Mit einer Immobilisierung und lokalen Konzentrationserhöhung nach der Ausbildung einer Adhärensjunktion wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass einzelne Cadherin-Moleküle nach der Dissoziation schnell den alten oder einen benachbarten neuen Bindungspartner finden (Baumgartner et al., 2003b). Damit konform geht auch die Beobachtung, dass durch eine Reduktion der Membranfluidität bei niedrigen Temperaturen das Cadherin-vermittelte Zusammenlagern von Zellen, wahrscheinlich durch die verlangsamte Aggregat-Bildung, vermindert ist (Takeichi, 1977; Angres et al., 1996).

Die Immobilisierung der transinteragierenden Cadherine zur Stabilisierung der Bindung geschieht bei VE-ECTM-2xFKBP durch Oligomerisieren über die intrazellulären Dimerisierungsdomänen und im Falle von VE-ECTM-1xFKBP eventuell über ein Aggregieren infolge Wechselwirkungen mit perlengebundenen Dimeren (s.o., 4.1.4.2). Während der Ausbildung der Bindung müssen die Cadherin-Moleküle allerdings lateral in der Membran frei beweglich sein, um zu den Cadherin-Dimeren der interagierenden Oberflächen (Zelle-Zelle, Zelle-Perle) gelangen zu können und mit ihnen eine Bindung einzugehen.

4.3 VE-Cadherin und TRPC4 liegen an endothelialen Zell-Zell-Kontakten in einem Komplex vor

Aus der Familie der TRP-Kanäle scheinen TRPC1, 4, 6 und TRPV1 an der regulierten Kontrolle der Gefäßpermeabilität beteiligt zu sein (TRPC4, TRPV1 und 4 bei der Regulation des Gefäßtonus; TRPC4 bei dem durch Hypoxie verursachten Gefäßumbau und TRPC3, 4 und TRPM2 in durch oxidativen Stress verursachten Antworten) (Yao & Garland, 2005). Wichtige Faktoren bei der Erhöhung der Gefäßpermeabilität sind die Neuorganisation des Zytoskeletts und der Abbau VE-Cadherin-enthaltender Junctionen. Das Ca^{2+} -Signal spielt beim Vermitteln dieser Prozesse eine bedeutende Rolle (Tiruppathi et al., 2002). Ein Zusammenwirken eines Ca^{2+} -Kanals und VE-Cadherin liegt daher nahe. Bei *in vivo*-Färbungen des Endothels aus der Aorta und Vena cava der Maus zeigte die TRPC4-Immunreaktivität den plasmalemalen Ca^{2+} -Kanal, wie

die bekannte VE-Cadherin-Verteilung, kontinuierlich entlang der Zellgrenzen lokalisiert (Baumgartner et al., unveröffentlicht).

Endothelzellen unterschiedlichen Ursprungs und verschiedener Spezies exprimieren verschiedene TRPs. Beispielsweise exprimieren Endothelzellen aus der Rinderaorta TRPC1 und 3-6 (Garcia & Schilling, 1997), wohingegen TRPC3 in bovinen Endothelzellen aus der A. pulmonalis anscheinend nicht vorhanden ist (Kamouchi et al., 1999). Primäre Endothelzellen in Kultur exprimieren je nach Typ TRPC1-6 (Tiruppathi et al., 2002). Die in dieser Arbeit verwendeten myokardialen Endothelzellen (MyEnd-Zellen) zeigten eine Immunreaktivität für TRPC1, 3, 4 und 6 (Baumgartner et al., unveröffentlicht).

Für eine Assoziation von VE-Cadherin und TRPC4 in MyEnd-Zellen gibt diese Arbeit verschiedene Anhaltspunkte. Durch Doppelimmunfluoreszenz-Mikroskopie wurde gezeigt, dass VE-Cadherin und TRPC4 in MyEnd-Zellen *in vitro* an interzellulären Junctionen kolokalisieren. Dies wurde auch in subkonfluenten Zellen beobachtet. Das bedeutet, dass TRPC4 sofort an den Zell-Zell-Grenzen erscheint, sobald VE-Cadherin-positive Zellkontakte ausgebildet werden (s. 3.4.1). Im Gegensatz dazu zeigten alle anderen von MyEnd-Zellen exprimierten TRPC-Isoformen (TRPC 1, 3 und 6) eine diffuse Immunfärbung (Baumgartner et al., unveröffentlicht). Claudin 5-Immunfärbungen am Tag 3 ergaben, dass dieses Occludensjunction-spezifische Protein an manchen Zellgrenzen noch nicht vorlag, die aber schon für VE-Cadherin und TRPC4 positiv waren. Dies lässt vermuten, dass VE-Cadherin und TRPC4 an den Zellgrenzen in einem gemeinsamen Komplex vorliegen, der keine der anderen TRPC-Isoformen enthält und nicht mit dem Occludensjunction-Protein Claudin 5 assoziiert. Weiter wird die Vermutung einer Assoziation von VE-Cadherin und TRPC4 durch die ektopische Expression von VE-Cadherin-GFP in TRPC4-bildenden HEK 293-Zellen unterstützt. Nach der Transfektion der Zellen, die zuvor eine nur schwache membranäre TRPC4-Immunfärbung zeigten, kam es zu einer deutlichen Anreicherung von TRPC4 an Zell-Zell-Kontakten benachbarter VE-Cadherin-GFP-exprimierender Zellen. Dagegen zeigten einzeln liegende transfizierte Zellen eine ebenso schwache TRPC4-Immunfärbung wie nicht transfizierte Zellen (s. 3.4.2). Eine ähnliche Anreicherung von TRPC4 zu artifiziellen VE-Cadherin-vermittelten Kontakten wurde durch die Inkubation von VE-Cadherin-

Fc-beschichteten Mikroperlen auf MyEnd-Zellen erreicht. Es ist bekannt, dass mit VE-Cadherin-Fc-beschichtete Mikroperlen, die an MyEnd-Zellen binden, an der Kontaktstelle mit den Zellen endogenes VE-Cadherin, F-Aktin und β -Catenin rekrutieren (Baumgartner et al., 2003b). Zusätzlich akkumulierte hier TRPC4 und konnte durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen werden (Baumgartner et al., unveröffentlicht). Des Weiteren konnte aus MyEnd-Zelllysaten VE-Cadherin mit TRPC4-Antikörpern koimmunpräzipitiert werden (Baumgartner et al., unveröffentlicht).

Diese Versuche lassen darauf schließen, dass VE-Cadherin und TRPC4 nicht nur im gleichen Komplex an Zell-Zell-Kontakten vorliegen, sondern direkte oder indirekte Bindungen eingehen. Eine indirekte Bindung könnte z.B. über Protein 4.1 vermittelt werden, da es intrazellulär TRPC4 bindet (s. 1.8.4, Cioffi et al., 2003) und VE-Cadherin innerhalb seiner intrazellulären Domäne ein Protein 4.1-bindendes Motiv enthält (Drenckhahn & Ness, 1997). Belegt wird Letzteres durch immunelektronenmikroskopisch dargestellte Kolo-kalisation von E-Cadherin und Protein 4.1 (Terada et al., 2005), das auch in Endothelzellen nachgewiesen wurde (Drenckhahn & Ness, 1997).

Weitere Experimente deuten sogar auf eine funktionelle Verbindung zwischen TRPC4 und VE-Cadherin in Endothelzellen hin. Baumgartner et al. (unveröffentlicht) beobachteten, dass ein Rekrutieren von TRPC4 zu VE-Cadherin-vermittelten Zellkontakten mit einer Erhöhung des durch Carbachol-Behandlung ausgelösten Phospholipase-C-abhängigen Ca^{2+} -Einstroms einhergeht. Die Assoziation von VE-Cadherin und TRPC4 könnte somit auch für die funktionelle Aktivität von TRPC4 von Bedeutung sein. Die Wichtigkeit der richtigen Lokalisation der Ca^{2+} -Kanäle zum Endoplasmatischen Retikulum - vermittelt über verschiedene Zytoskelettbestandteile (Spectrin, Protein 4.1, F-Aktin) - für die funktionelle Aktivität der Kanäle wurde auch von Cioffi et al. (2003) betont. So könnte in diesem Fall VE-Cadherin einen Beitrag zur Verbindung von TRPC4 zum Zytoskelett und somit auch zu anderen Zellkompartimenten leisten. Auf der anderen Seite wäre TRPC4 in der Nähe von VE-Cadherin an einer strategisch wichtigen Stelle um durch lokalen Ca^{2+} -Einstrom ($[\text{Ca}^{2+}]_i \uparrow$) und extrazelluläre Ca^{2+} -Depletion ($[\text{Ca}^{2+}]_e \downarrow$) selektiv die Cadherin-Adhäsion zu regulieren, ohne die übrigen Teile der Zelle zu beeinflussen. Auch andere Gruppen vermuten, dass SOCs (store operated

channels) in Endothelzellen einen membranbegrenzten $[Ca^{2+}]_i$ -Pool erzeugen, ohne die Ionenkonzentrationen des gesamten Zytoplasmas zu verändern (Wu et al., 2005). So scheint die membranassoziierte Ca^{2+} -Konzentration konstitutiv höher zu sein als die im übrigen Zytoplasma (Marsault et al., 1997; Isshiki et al., 2002 und 2004). Es ist möglich, dass die TRPC4-abhängige Erhöhung der Endothelpermeabilität als Antwort auf die Stimulation Phospholipase-C-gekoppelter Rezeptoren infolge von sowohl intrazellulären als auch extrazellulären Ca^{2+} -Effekten bewirkt wird. Eine intrazelluläre Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration führt zu einer lokalen Depolymerisation von F-Aktin und zum Lösen der Cadherine von ihrer Zytoskelettverankerung, verbunden mit einer Reduktion der Endothelbarriere (Baumgartner et al., 2003b; Waschke et al., 2004). Extrazellulär kann der Ca^{2+} -Strom in den schmalen interzellulären Spalten zu einem lokalen Sinken der Ca^{2+} -Konzentration führen. Da die VE-Cadherin-Adhäsion stark abhängig von physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen ist ($K_D=1,1 \text{ mM } Ca^{2+}$), könnte dadurch die Bindung zusätzlich zum intrazellulären Aspekt extrazellulär geschwächt werden (Baumgartner et al., 2000; Baumgartner et al., 2003b). Eine ähnliche Kombination von intra- und extrazellulären Ca^{2+} -Effekten wurde schon 2003 von Baumgartner et al. für die N-Cadherin-vermittelte Adhäsion in neuronalen Synapsen in Verbindung mit synaptischer Plastizität vorgeschlagen (Baumgartner et al., 2003a).

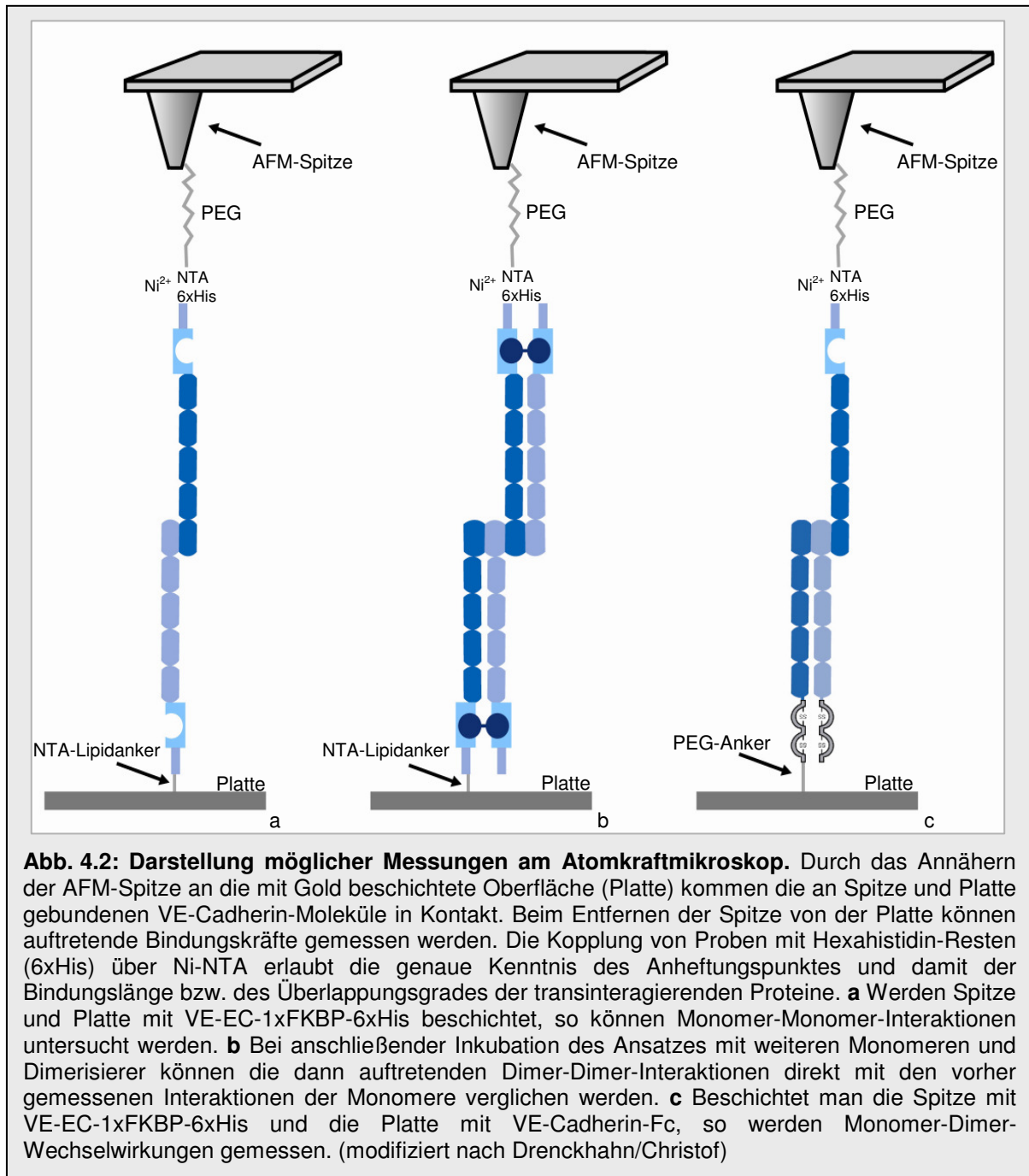
4.4 **Ausblick**

Es gilt als erwiesen, dass klassische Cadherine von einer monomeren, nicht aktiven Konformation zu einer dimeren, aktiven Konformation wechseln (Cis-Dimerisierung) und dass nur Cis-Dimere in der Lage sind, mit Cadherinen benachbarter Zellen effektive Transinteraktionen (adhäsive Bindungen) einzugehen (Takeda et al., 1999). Allerdings gibt es Anhaltspunkte dafür, dass auch Monomere Transinteraktionen eingehen können (Chitaev & Troyanovsky, 1998). Bindungsstudien mit rekombinanten C-Cadherin-Domänen ergaben, dass diese als Dimere eine größere homophile Bindungsaktivität als Monomere besitzen, die allerdings auch - mit geringerer Affinität - Bindungen eingehen konnten (Brieher et al., 1996).

In dieser Arbeit wurde ein VE-Cadherin-Fusionsprotein, bestehend aus der extrazellulären VE-Cadherin-Domäne, einer Dimerisierungsdomäne und einem Hexahistidin-Rest, hergestellt, gereinigt und die selektive Dimerisierung gezeigt. Mit Hilfe dieses Fusionsproteins ist es nun möglich, durch Atomkraftmikroskopie (AFM) und Kraftspektroskopie Monomer-Monomer-Interaktionen zu untersuchen. Es können die auftretenden Kräfte von Monomer-Monomer-Wechselwirkungen bestimmt und mit Monomer-Dimer- und Dimer-Dimer-Wechselwirkungen direkt verglichen werden (Abb. 4.2a+b).

Des Weiteren gibt es Daten, die darauf hinweisen, dass Cadherine nicht nur mit ihrer äußersten extrazellulären Subdomäne (EC1) binden, sondern sich auch mit den anderen vier Extrazellulärdomänen (EC2-5) überlappen können, wodurch die Adhäsionskraft möglicherweise gesteigert werden könnte (s. Abb. 1.3d) (Sivasankar et al., 1999; Sivasankar et al., 2001; Chappuis-Flament et al., 2001). Mit Hilfe des Hexahistidin-Restes des o.g. VE-Cadherin-Fusionsproteins besteht nun die Möglichkeit, das Fusionsprotein über Ni-NTA an AFM-Spitze und Platte zu koppeln, um so die Bindungslängen und damit den Grad der Überlappung der transinteragierenden Extrazellulärdomänen zu untersuchen.

Um weitere Erkenntnisse in der Frage nach einer direkten Assoziation von VE-Cadherin und TRPC4 zu erlangen, sollen Energietransfer-Studien (FRET, **f**luorescence **r**esonance **e**nergy **t**ransfer) durchgeführt werden, womit eine Interaktion direkt nachgewiesen werden könnte.



5 Zusammenfassung

Blutgefäße sind innen mit einem einschichtigen Verband aus Endothelzellen ausgekleidet, die die Barriere zwischen Blut und Interstitium bilden. Die parazelluläre Endothelbarriere besteht aus Occludens- und Adhärenskontakten. Occludenskontakte kontrollieren über ein Versiegeln der Interzellularräume den Austausch von Flüssigkeiten und Makromolekülen, Adhärenskontakte sorgen für die nötige Adhäsionsstärke, damit Occludenskontakte gebildet und aufrechterhalten werden können. Die starke Adhäsion der Endothelzellen in Adhärenskontakten wird durch das Endothel-spezifische Cadherin (VE-Cadherin) vermittelt, das mit der Extrazellulärdomäne eine adhäsive Bindung (Transinteraktion) eingeht und intrazellulär über Adaptermoleküle (Catenine) am Aktinzytoskelett verankert ist. Diese intrazelluläre Immobilisierung verstärkt die extrazelluläre Bindung (Transinteraktion). Die Regulation der VE-Cadherin-Adhäsion wirkt sich direkt auf die Endothelpermeabilität aus. Über den Mechanismus der Regulation ist allerdings noch wenig bekannt. Neben der Abhängigkeit von der durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration beeinflussten Verankerung des VE-Cadherins am Zytoskelett wird diskutiert, dass die Stärke der Adhäsion durch Dimerisierung oder Aggregat-Bildung der Cadherin-Moleküle beeinflusst wird.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Di- bzw. Oligomerisierung von Cadherinen unabhängig von deren Verbindung zum Zytoskelett auf die Stärke der Zelladhäsion untersucht. Dazu wurden zwei permanente CHO-Zelllinien hergestellt, die VE-Cadherin-Fusionsproteine exprimierten, bei denen die zytoplasmatische Domäne durch eine bzw. zwei FK506 bindende Domänen (FKBP) ersetzt worden war. Diese intrazellulären Domänen bewirkten nach Zugabe von FKBP-Dimerisierer eine Dimerisierung bzw. Oligomerisierung der VE-Cadherin-Fusionsproteine. Die Ergebnisse der anschließenden Bindungsstudien deuten darauf hin, dass die extrazelluläre Cadherindomäne unabhängig von der zytoplasmatischen Domäne eine intrinsische homophile Bindungsaktivität besitzt. Diese scheint von einer Cis-Dimerisierung abhängig zu sein, denn die Bildung von VE-Cadherin-Cis-Dimeren war für eine Transinteraktion sowohl mit löslichen als auch mit perlengebundenen VE-Cadherin-Fc-Dimeren notwendig. Allerdings führte eine gezielte Bildung von Aggregaten der VE-Cadherin-Moleküle zu keiner weiteren Verstärkung der

Bindungsaktivität. Eine feste Bindung war nur möglich, wenn Cadherine in der Plasmamembran primär beweglich waren, sich also den unbeweglichen VE-Cadherin-Proteinen der Perlen anlagern und mit diesen verzahnen konnten. Eine spontane Cis-Dimerisierung ist in Zellen mit hoher VE-Cadherin-Fusionsprotein-Expression wahrscheinlich und würde erklären, dass es zu einer geringfügig erhöhten Bindung der VE-Cadherin-Fc-beschichteten Perlen auf VE-Cadherin-FKBP-Monomer-exprimierenden Zellen kam. Allerdings reichte die vermutliche spontane Cis-Dimerisierung nicht für eine durch Einzelmolekülfluoreszenz-Mikroskopie nachweisbare Bindung an lösliche VE-Cadherin-Fc-Dimere aus. Die Einzelmolekülfluoreszenz-Messungen lassen darauf schließen, dass VE-Cadherin-Fusionsproteine als Monomere in die Membran eingebaut wurden und erst dort durch den FKBP-Dimerisierer Dimere bildeten.

Demnach könnte es bei der adhäsiven Aktivität von VE-Cadherin von einer durch die Extrazellulärdomänen vermittelten mäßig starken Bindung zu einer wesentlich stärkeren Bindung durch eine feste Verankerung am Zytoskelett kommen. Das Bindungspotential der Cadherine könnte also sowohl durch die Membrankonzentration und die Zahl der funktionell aktiven Dimere als auch durch die Verankerung der Cadherine am Zytoskelett kontrolliert werden.

Um die Kräfte, die VE-Cadherin-Monomere im Vergleich zu Dimeren bei Transinteraktionen aufeinander ausüben, direkt messen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit die cDNA für ein sekretorisches monomeres VE-Cadherin-Fusionsprotein, bestehend aus der extrazellulären VE-Cadherin-Domäne, einer Dimerisierungsdomäne und einem Hexahistidin-Rest, hergestellt. Nach stabiler Expression in CHO-Zellen wurde das Fusionsprotein aus dem Kulturmedium über eine Ni-NTA-Agarose-Säule gereinigt. Mit Gelfiltration ließ sich die Dimerisierung dieses VE-Cadherin-Monomers durch den in der Arbeit verwendeten Dimerisierer nachweisen.

Da die durch VE-Cadherin vermittelte Adhäsion auch von der intrazellulären und extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängt, an der bei der entzündungsbedingten Kontaktlösung der Plasmamembran- Ca^{2+} -Kanal TRPC4 beteiligt zu sein scheint, wurde weiterhin eine mögliche Assoziation von VE-Cadherin und TRPC4 untersucht. Immunfluoreszenz-Untersuchungen ergaben, dass beide Proteine in Endothelzellen zu verschiedenen Konfluenzstadien

kontinuierlich in der Plasmamembran an Zell-Zell-Kontakten kolokalisieren. Außerdem führte eine Kotransfektion von TRPC4-exprimierenden HEK 293-Zellen mit einem VE-Cadherin-GFP-kodierenden Plasmid zu einer Rekrutierung von TRPC4 an VE-Cadherin-enthaltende Zell-Zell-Kontakte. Eine Assoziation beider Moleküle gäbe der Zelle die Möglichkeit, durch TRPC4 die Ca^{2+} -Konzentration in direkter Nachbarschaft der VE-Cadherin-Moleküle zu regulieren, ohne andere Kompartimente der Zelle zu beeinflussen.

Stichworte: Endothelzellen, Zelladhäsion, Adhärensjunktion, VE-Cadherin, Dimerisierung, Oligomerisierung, Aggregat-Bildung, TRPC4, Ca^{2+} -Einstrom

Abstract

Endothelial cells form the inner surface of blood vessels and are responsible for maintenance of endothelial barrier function. These cells are connected by tight and adherens junctions. While tight junctions play a fundamental role in regulating transcellular permeability, adherens junctions contribute to the mechanical strength of intercellular adhesions. Strong adhesion in adherens junctions is mediated by the vascular endothelial-specific cadherin (VE-cadherin), which is a cytoskeleton-anchored membrane protein mediating Ca^{2+} -dependent adhesion of endothelial cells by homophilic trans-interaction between cadherins of neighbouring cells. Therefore endothelial permeability is directly dependent on the regulation of VE-cadherin adhesion. Because cadherin trans-interaction is a low-affinity reaction (K_D in the millimolar range), adhesive strength might be altered not only by Ca^{2+} -dependent changes in cadherin-cytoskeletal linkage but also by dimerization or clustering of cadherins. In order to analyse the role of dimerization and oligomerization on cadherin-mediated cytoskeletal-independent adhesion, CHO cells were transfected with constructs encoding VE-cadherin fusion proteins, in which the cytoplasmic domain of VE-cadherin was substituted by a FK506 binding domain which allowed dimerization or oligomerization by a membrane-permeable FKBP crosslinker. The results of subsequent binding-assays indicate that the extracellular domain of VE-cadherin has - independent of its cytosolic domain - intrinsic binding activity, which appears to be dependent on cis-dimerization. This was supported by the observation that cis-dimerization was necessary for both, significant trans-interaction with soluble and microsphere-bound VE-

cadherin-Fc-dimers. However, additional oligomerisation of VE-cadherin-molecules did not further increase homophilic binding activity. Tight binding occurred only if cadherins were primarily mobile in the plane of the lipid bilayer thereby allowing them to accommodate to VE-cadherin molecules of the opposing side. In transfected cells with high VE-cadherin-FKBP expression cis-dimerization might also occur spontaneously to a certain degree and allow slightly enhanced binding of VE-cadherin-Fc-coated microspheres. In contrast, spontaneous cis-dimerization - if it occurs at all - was not sufficient for significant binding of soluble VE-cadherin dimers analysed by single molecule fluorescence. These data also suggest that VE-cadherin-fusion proteins become inserted into the plasma membrane as monomers followed by subsequent association into functional dimers by addition of the membrane permeable dimerizer.

Based on these findings it can be concluded that, VE-cadherin adhesive activity could reach from weak binding mediated by the intrinsic binding activity of its extracellular domain to strong binding caused by strong anchorage of the intracellular domain to the cytoskeleton. This further implies that, this adhesive activity could be regulated by controlling (i) the surface concentration, (ii) the formation of cis-dimers and (iii) the degree of cadherin-linkage to the cytoskeleton.

In order to investigate binding forces between VE-cadherin monomers and directly compare them to forces between VE-cadherin dimers another VE-cadherin fusion protein was produced and purified by affinity chromatography. This protein was composed of the extracellular VE-cadherin domain fused to a dimerizing domain and a Histidin-tag. Gelfiltration analysis confirmed dimerization in the presence of dimerizer.

Increased permeability is caused by opening of endothelial junctions during inflammation. This process requires an increase of the intracellular Ca^{2+} -concentration $[Ca^{2+}]_i$ due to influx of Ca^{2+} from the extracellular space. TRPC4, the predominate store-operated Ca^{2+} -channel of endothelial cells, appears to be crucially involved in this process. As VE-cadherin-mediated adhesion is controlled by both $[Ca^{2+}]_i$ and $[Ca^{2+}]_e$, we looked for a possible association of TRPC4 and VE-cadherin. Applying immunofluorescence using endothelial cells of different confluencies both proteins were found to co-localise continuously

along cell borders. In addition, cotransfection of TRPC4-expressing HEK 293-cells with a VE-Cadherin-GFP-coding plasmid led to increased recruitment of diffusely distributed TRPC4 in control cells to VE-cadherin-containing cell-cell-contacts in transfected cells. These observations suggest a functional association between both proteins and opens up the interesting possibility that Ca^{2+} -concentration regulated by TRPC4 in immediate vicinity of VE-cadherin might selectively control endothelial barrier properties without affecting the remaining cellular compartments.

Keywords: vascular endothelial cells, cell adhesion, adherens junctions, VE-cadherin, dimerisation, oligomerisation, TRPC4, Ca^{2+} -influx

6 Literatur

- Adams CL, Nelson WJ, Smith SJ. 1996.** Quantitative analysis of cadherin-catenin-actin reorganization during development of cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 135(6 Pt 2):1899-1911.
- Aghdasi B, Ye K, Resnick A, Huang A, Ha HC, Guo X, Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. 2001.** FKBP12, the 12-kDa FK506-binding protein, is a physiologic regulator of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5):2425-2430.
- Alattia JR, Ames JB, Porumb T, Tong KI, Heng YM, Ottensmeyer P, Kay CM, Ikura M. 1997.** Lateral self-assembly of E-cadherin directed by cooperative calcium binding. *FEBS Lett* 417(3):405-408.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Watson JD, 1997.** *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc., New York & London, 3rd edn.; 1131-1136
- Angres B, Barth A, Nelson WJ. 1996.** Mechanism for transition from initial to stable cell-cell adhesion: kinetic analysis of E-cadherin-mediated adhesion using a quantitative adhesion assay. *J Cell Biol* 134(2):549-557.
- Angst BD, Marcozzi C, Magee AI. 2001.** The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci* 114(Pt 4):629-641.
- Aono S, Nakagawa S, Reynolds AB, Takeichi M. 1999.** p120(ctn) acts as an inhibitory regulator of cadherin function in colon carcinoma cells. *J Cell Biol* 145(3):551-562.
- Ashkin A, Dziedzic JM. 1985.** Observation of radiation-pressure trapping of particles by alternating light beams. *Physical Review Letters* 54(12):1245-1248.
- Ashkin A, Dziedzic JM, Yamane T. 1987.** Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature* 330(6150):769-771.
- Aurrand-Lions M, Johnson-Leger C, Wong C, Du Pasquier L, Imhof BA. 2001.** Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. *Blood* 98(13):3699-3707.
- Barakat AI, Uthoff PA, Colton CK. 1992.** Topographical mapping of sites of enhanced HRP permeability in the normal rabbit aorta. *J Biomech Eng* 114(3):283-292.
- Baumgartner W, Hinterdorfer P, Ness W, Raab A, Vestweber D, Schindler H, Drenckhahn D. 2000.** Cadherin interaction probed by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(8):4005-4010.
- Baumgartner W, Drenckhahn D. 2002a.** Plasmalemmal concentration and affinity of mouse vascular endothelial cadherin, VE-cadherin. *Eur Biophys J* 31(7):532-538.
- Baumgartner W, Drenckhahn D. 2002b.** Transmembrane cooperative linkage in cellular adhesion. *Eur J Cell Biol* 81(3):161-168.
- Baumgartner W, Drenckhahn D. 2002c.** An expectation-maximisation algorithm for the deconvolution of the intrinsic distribution of single molecule's parameters. *Comput Chem* 26(4):321-326.
- Baumgartner W, Golenhofen N, Grundhofer N, Wiegand J, Drenckhahn D. 2003a.** Ca²⁺ dependency of N-cadherin function probed by laser tweezer and atomic force microscopy. *J Neurosci* 23(35):11008-11014.
- Baumgartner W, Schutz GJ, Wiegand J, Golenhofen N, Drenckhahn D. 2003b.** Cadherin function probed by laser tweezer and single molecule fluorescence in vascular endothelial cells. *J Cell Sci* 116(Pt 6):1001-1011.
- Ben-Ze'ev A, Geiger B. 1998.** Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 10(5):629-639.
- Berx G, Nollet F, van Roy F. 1998.** Dysregulation of the E-cadherin/catenin complex by irreversible mutations in human carcinomas. *Cell Adhes Commun* 6(2-3):171-184.
- Birnbaumer L, Zhu X, Jiang M, Boulay G, Peyton M, Vannier B, Brown D, Platano D, Sadeghi H, Stefani E, Birnbaumer M. 1996.** On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(26):15195-15202.
- Bixby JL, Zhang R. 1990.** Purified N-cadherin is a potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth. *J Cell Biol* 110(4):1253-1260.
- Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner BM, Shapiro L. 2002.** C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* 296(5571):1308-1313.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Braga VM. 2002.** Cell-cell adhesion and signalling. *Curr Opin Cell Biol* 14(5):546-556.

- Bretscher A, Reczek D, Berryman M. 1997.** Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures. *J Cell Sci* 110 (Pt 24):3011-3018.
- Brieher WM, Gumbiner BM. 1994.** Regulation of C-cadherin function during activin induced morphogenesis of *Xenopus* animal caps. *J Cell Biol* 126(2):519-527.
- Brieher WM, Yap AS, Gumbiner BM. 1996.** Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-cadherin. *J Cell Biol* 135(2):487-496.
- Brillantes AB, Ondrias K, Scott A, Kobrinsky E, Ondriasova E, Moschella MC, Jayaraman T, Landers M, Ehrlich BE, Marks AR. 1994.** Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* 77(4):513-523.
- Brough GH, Wu S, Cioffi D, Moore TM, Li M, Dean N, Stevens T. 2001.** Contribution of endogenously expressed Trp1 to a Ca²⁺-selective, store-operated Ca²⁺ entry pathway. *Faseb J* 15(10):1727-1738.
- Burridge K, Chrzanoska-Wodnicka M. 1996.** Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:463-518.
- Cameron AM, Steiner JP, Sabatini DM, Kaplin AI, Walensky LD, Snyder SH. 1995.** Immunophilin FK506 binding protein associated with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates calcium flux. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(5):1784-1788.
- Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. 2000.** The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2(2):76-83.
- Carmeliet P, Jain RK. 2000.** Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407(6801):249-257.
- Chappuis-Flament S, Wong E, Hicks LD, Kay CM, Gumbiner BM. 2001.** Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *J Cell Biol* 154(1):231-243.
- Chelu MG, Danila CI, Gilman CP, Hamilton SL. 2004.** Regulation of ryanodine receptors by FK506 binding proteins. *Trends Cardiovasc Med* 14(6):227-234.
- Chen YG, Liu F, Massague J. 1997.** Mechanism of TGF β receptor inhibition by FKBP12. *Embo J* 16(13):3866-3876.
- Chitaev NA, Troyanovsky SM. 1998.** Adhesive but not lateral E-cadherin complexes require calcium and catenins for their formation. *J Cell Biol* 142(3):837-846.
- Cioffi DL, Wu S, Stevens T. 2003.** On the endothelial cell I(SOC). *Cell Calcium* 33(5-6):323-336.
- Clackson T, Yang W, Rozamus LW, Hatada M, Amara JF, Rollins CT, Stevenson LF, Magari SR, Wood SA, Courage NL, Lu X, Cerasoli F, Jr., Gilman M, Holt DA. 1998.** Redesigning an FKBP-ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18):10437-10442.
- Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, Lampugnani MG, Martin-Padura I, Stoppacciaro A, Ruco L, McDonald DM, Ward PA, Dejana E. 1999.** Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(17):9815-9820.
- Corada M, Liao F, Lindgren M, Lampugnani MG, Breviario F, Frank R, Muller WA, Hicklin DJ, Bohlen P, Dejana E. 2001.** Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability. *Blood* 97(6):1679-1684.
- Dejana E, Bazzoni G, Lampugnani MG. 1999.** Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Exp Cell Res* 252(1):13-19.
- Dejana E. 2004.** Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(4):261-270.
- Devarajan P, Stabach PR, De Matteis MA, Morrow JS. 1997.** Na,K-ATPase transport from endoplasmic reticulum to Golgi requires the Golgi spectrin-ankyrin G119 skeleton in *Madin Darby* canine kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20):10711-10716.
- Drenckhahn D, 2003a.** Zellenlehre. In Benninghoff-Drenckhahn Anatomie Band 1, Urban & Fischer, München/Jena, 16. Auflage:26
- Drenckhahn D, 2003b.** Zellenlehre. In Benninghoff-Drenckhahn Anatomie Band 1, Urban & Fischer, München/Jena, 91. Auflage:26
- Drenckhahn D, Ness W. 1997.** The endothelial contractile cytoskeleton. In *Vascular Endothelium: Physiology, Pathology, and Therapeutic Opportunities*, G.V.R. Born/C.J. Schwarz, Eds., Schattauer, Stuttgart, New Horizon Series 3:1-25
- Dudek SM, Garcia JG. 2001.** Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol* 91(4):1487-1500.

- Dumont FJ. 2000.** FK506, an immunosuppressant targeting calcineurin function. *Curr Med Chem* 7(7):731-748.
- Dunon D, Imhof BA. 1996.** T cell migration during ontogeny and T cell repertoire generation. *Curr Top Microbiol Immunol* 212:79-93.
- Dvorak AM, Kohn S, Morgan ES, Fox P, Nagy JA, Dvorak HF. 1996.** The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasation. *J Leukoc Biol* 59(1):100-115.
- Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM. 1999.** Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 237:97-132.
- Essner R, Kuo CT, Wang H, Wen DR, Turner RR, Nguyen T, Hoon DS. 1998.** Prognostic implications of p53 overexpression in cutaneous melanoma from sun-exposed and nonexposed sites. *Cancer* 82(2):309-316.
- Fagotto F, Gumbiner BM. 1996.** Cell contact-dependent signaling. *Dev Biol* 180(2):445-454.
- Freichel M, Schweig U, Stauffenberger S, Freise D, Schorb W, Flockerzi V. 1999.** Store-operated cation channels in the heart and cells of the cardiovascular system. *Cell Physiol Biochem* 9(4-5):270-283.
- Freichel M, Suh SH, Pfeifer A, Schweig U, Trost C, Weissgerber P, Biel M, Philipp S, Freise D, Droogmans G, Hofmann F, Flockerzi V, Nilius B. 2001.** Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. *Nat Cell Biol* 3(2):121-127.
- Garcia RL, Schilling WP. 1997.** Differential expression of mammalian TRP homologues across tissues and cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 239(1):279-283.
- Geisbrecht ER, Montell DJ. 2002.** Myosin VI is required for E-cadherin-mediated border cell migration. *Nat Cell Biol* 4(8):616-620.
- Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. 1998.** Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 273(46):30336-30343.
- Glagov S, Zarins C, Giddens DP, Ku DN. 1988.** Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med* 112(10):1018-1031.
- Goel M, Sinkins WG, Schilling WP. 2002.** Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem* 277(50):48303-48310.
- Golenhofen N, Htun P, Ness W, Koob R, Schaper W, Drenckhahn D. 1999.** Binding of the stress protein alpha B-crystallin to cardiac myofibrils correlates with the degree of myocardial damage during ischemia/reperfusion in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 31(3):569-580.
- Gotsch U, Borges E, Bosse R, Boggemeyer E, Simon M, Mossmann H, Vestweber D. 1997.** VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci* 110 (Pt 5):583-588.
- Grinberg M, Sarig R, Zaltsman Y, Frumkin D, Grammatikakis N, Reuveny E, Gross A. 2002.** tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. *J Biol Chem* 277(14):12237-12245.
- Gulino D, Delachanal E, Concord E, Genoux Y, Morand B, Valiron MO, Sulpice E, Scaife R, Alemany M, Vernet T. 1998.** Alteration of endothelial cell monolayer integrity triggers resynthesis of vascular endothelium cadherin. *J Biol Chem* 273(45):29786-29793.
- Gumbiner BM. 1996.** Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84(3):345-357.
- Gumbiner BM. 2000.** Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol* 148(3):399-404.
- Hagel L, Lundstrom H, Andersson T, Lindblom H. 1989.** Properties, in theory and practice, of novel gel filtration media for standard liquid chromatography. *J Chromatogr* 476:329-344.
- Hanahan D. 1983.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166(4):557-580.
- Hay ED, Zuk A. 1995.** Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. *Am J Kidney Dis* 26(4):678-690.
- Hemenway CS, Heitman J. 1996.** Immunosuppressant target protein FKBP12 is required for P-glycoprotein function in yeast. *J Biol Chem* 271(31):18527-18534.

- Hermiston ML, Wong MH, Gordon JI. 1996.** Forced expression of E-cadherin in the mouse intestinal epithelium slows cell migration and provides evidence for nonautonomous regulation of cell fate in a self-renewing system. *Genes Dev* 10(8):985-996.
- Higuchi R, Krummel B, Saiki RK. 1988.** A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 16(15):7351-7367.
- Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T. 2000.** Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. *J Mol Med* 78(1):14-25.
- Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T. 2002.** Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(11):7461-7466.
- Holda JR, Blatter LA. 1997.** Capacitative calcium entry is inhibited in vascular endothelial cells by disruption of cytoskeletal microfilaments. *FEBS Lett* 403(2):191-196.
- Huber O, Kemler R, Langosch D. 1999.** Mutations affecting transmembrane segment interactions impair adhesiveness of E-cadherin. *J Cell Sci* 112 (Pt 23):4415-4423.
- Hyafil F, Babinet C, Jacob F. 1981.** Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell* 26(3 Pt 1):447-454.
- Ilan N, Madri JA. 2003.** PECAM-1: old friend, new partners. *Curr Opin Cell Biol* 15(5):515-524.
- Isshiki M, Ying YS, Fujita T, Anderson RG. 2002.** A molecular sensor detects signal transduction from caveolae in living cells. *J Biol Chem* 277(45):43389-43398.
- Isshiki M, Mutoh A, Fujita T. 2004.** Subcortical Ca²⁺ waves sneaking under the plasma membrane in endothelial cells. *Circ Res* 95(3):e11-21.
- Jaffe SH, Friedlander DR, Matsuzaki F, Crossin KL, Cunningham BA, Edelman GM. 1990.** Differential effects of the cytoplasmic domains of cell adhesion molecules on cell aggregation and sorting-out. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(9):3589-3593.
- Johnson PH, Grossman LI. 1977.** Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double- and single-stranded DNAs. *Biochemistry* 16(19):4217-4225.
- Jones JC, Hopkinson SB, Goldfinger LE. 1998.** Structure and assembly of hemidesmosomes. *Bioessays* 20(6):488-494.
- Kagedal B, Kallberg M, Arstrand K, Hansson C. 1989.** Automated high-performance liquid chromatographic determination of 5-S-cysteinyl-3,4-dihydroxyphenylalanine in urine. *J Chromatogr* 473(2):359-370.
- Kamei T, Matozaki T, Sakisaka T, Kodama A, Yokoyama S, Peng YF, Nakano K, Takaishi K, Takai Y. 1999.** Coendocytosis of cadherin and c-Met coupled to disruption of cell-cell adhesion in MDCK cells--regulation by Rho, Rac and Rab small G proteins. *Oncogene* 18(48):6776-6784.
- Kamouchi M, Philipp S, Flockerzi V, Wissenbach U, Mamin A, Raeymaekers L, Eggermont J, Droogmans G, Nilius B. 1999.** Properties of heterologously expressed hTRP3 channels in bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Physiol* 518 Pt 2:345-358.
- Kemler R. 1993.** From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* 9(9):317-321.
- Kim SH, Jen WC, De Robertis EM, Kintner C. 2000.** The protocadherin PAPC establishes segmental boundaries during somitogenesis in xenopus embryos. *Curr Biol* 10(14):821-830.
- Kitagawa M, Natori M, Murase S, Hirano S, Taketani S, Suzuki ST. 2000.** Mutation analysis of cadherin-4 reveals amino acid residues of EC1 important for the structure and function. *Biochem Biophys Res Commun* 271(2):358-363.
- Klingelhofer J, Laur OY, Troyanovsky RB, Troyanovsky SM. 2002.** Dynamic interplay between adhesive and lateral E-cadherin dimers. *Mol Cell Biol* 22(21):7449-7458.
- Koch AW, Pokutta S, Lustig A, Engel J. 1997.** Calcium binding and homoassociation of E-cadherin domains. *Biochemistry* 36(25):7697-7705.
- Koch AW, Bozic D, Pertz O, Engel J. 1999.** Homophilic adhesion by cadherins. *Curr Opin Struct Biol* 9(2):275-281.
- Kowalczyk AP, Navarro P, Dejana E, Bornslaeger EA, Green KJ, Kopp DS, Borgwardt JE. 1998.** VE-cadherin and desmoplakin are assembled into dermal microvascular endothelial intercellular junctions: a pivotal role for plakoglobin in the recruitment of desmoplakin to intercellular junctions. *J Cell Sci* 111 (Pt 20):3045-3057.
- Kreft B, Berndorff D, Bottinger A, Finnemann S, Wedlich D, Hortsch M, Tauber R, Gessner R. 1997.** LI-cadherin-mediated cell-cell adhesion does not require cytoplasmic interactions. *J Cell Biol* 136(5):1109-1121.

- Kusumi A, Suzuki K, Koyasako K. 1999.** Mobility and cytoskeletal interactions of cell adhesion receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11(5):582-590.
- Kyhse-Andersen J. 1984.** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10(3-4):203-209.
- Laemmli UK. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.
- Lambert O, Taveau JC, Him JL, Al Kurdi R, Gulino-Debrac D, Brisson A. 2005.** The basic framework of VE-cadherin junctions revealed by cryo-EM. *J Mol Biol* 346(5):1193-1196.
- Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, Ruco LP, Dejana E. 1992.** A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol* 118(6):1511-1522.
- Le TL, Yap AS, Stow JL. 1999.** Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *J Cell Biol* 146(1):219-232.
- Leckband D, Sivasankar S. 2000.** Mechanism of homophilic cadherin adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 12(5):587-592.
- Legrand P, Bibert S, Jaquinod M, Ebel C, Hewat E, Vincent F, Vanbelle C, Concord E, Vernet T, Gulino D. 2001.** Self-assembly of the vascular endothelial cadherin ectodomain in a Ca²⁺-dependent hexameric structure. *J Biol Chem* 276(5):3581-3588.
- Lotz MM, Burdsal CA, Erickson HP, McClay DR. 1989.** Cell adhesion to fibronectin and tenascin: quantitative measurements of initial binding and subsequent strengthening response. *J Cell Biol* 109(4 Pt 1):1795-1805.
- Lum H, Malik AB. 1994.** Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am J Physiol* 267(3 Pt 1):L223-241.
- MacMillan D, Currie S, Bradley KN, Muir TC, McCarron JG. 2005.** In smooth muscle, FK506-binding protein modulates IP3 receptor-evoked Ca²⁺ release by mTOR and calcineurin. *J Cell Sci* 118(Pt 23):5443-5451.
- Marsault R, Murgia M, Pozzan T, Rizzuto R. 1997.** Domains of high Ca²⁺ beneath the plasma membrane of living A7r5 cells. *Embo J* 16(7):1575-1581.
- Marsden M, DeSimone DW. 2003.** Integrin-ECM interactions regulate cadherin-dependent cell adhesion and are required for convergent extension in *Xenopus*. *Curr Biol* 13(14):1182-1191.
- Matsunaga M, Hatta K, Nagafuchi A, Takeichi M. 1988.** Guidance of optic nerve fibres by N-cadherin adhesion molecules. *Nature* 334(6177):62-64.
- McDonald DM, Baluk P. 2002.** Significance of blood vessel leakiness in cancer. *Cancer Res* 62(18):5381-5385.
- Mery L, Magnino F, Schmidt K, Krause KH, Dufour JF. 2001.** Alternative splice variants of hTrp4 differentially interact with the C-terminal portion of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *FEBS Lett* 487(3):377-383.
- Mery L, Strauss B, Dufour JF, Krause KH, Hoth M. 2002.** The PDZ-interacting domain of TRPC4 controls its localization and surface expression in HEK293 cells. *J Cell Sci* 115(Pt 17):3497-3508.
- Miao H, Hu YL, Shiu YT, Yuan S, Zhao Y, Kaunas R, Wang Y, Jin G, Usami S, Chien S. 2005.** Effects of flow patterns on the localization and expression of VE-cadherin at vascular endothelial cell junctions: in vivo and in vitro investigations. *J Vasc Res* 42(1):77-89.
- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V. 2002.** The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 108(5):595-598.
- Montell C. 2005.** The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2005(272):re3.
- Mullis KB, Faloona FA. 1987.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.
- Murase S, Schuman EM. 1999.** The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Cell Biol* 11(5):549-553.
- Nagafuchi A, Takeichi M. 1988.** Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *Embo J* 7(12):3679-3684.
- Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM. 1996.** Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 380(6572):360-364.
- Navarro P, Caveda L, Breviaro F, Mandoteanu I, Lampugnani MG, Dejana E. 1995.** Catenin-dependent and -independent functions of vascular endothelial cadherin. *J Biol Chem* 270(52):30965-30972.

- Navarro P, Ruco L, 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.
- Nielsen LB, Nordestgaard BG, Stender S, Kjeldsen K. 1992.** Aortic permeability to LDL as a predictor of aortic cholesterol accumulation in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb* 12(12):1402-1409.
- Nielsen LB. 1996.** Transfer of low density lipoprotein into the arterial wall and risk of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 123(1-2):1-15.
- Nilius B, Droogmans G. 2001.** Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev* 81(4):1415-1459.
- Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S. 2003.** Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 161(3):653-660.
- Nollet F, Kools P, van Roy F. 2000.** Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol* 299(3):551-572.
- Nose A, Tsuji K, Takeichi M. 1990.** Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell* 61(1):147-155.
- Nusrat A, Turner JR, Madara JL. 2000.** Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279(5):G851-857.
- Okada T, Shimizu S, Wakamori M, Maeda A, Kurosaki T, Takada N, Imoto K, Mori Y. 1998.** Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP Ca²⁺ channel from mouse brain. *J Biol Chem* 273(17):10279-10287.
- Otto KG, Jin L, Spencer DM, Blau CA. 2001.** Cell proliferation through forced engagement of c-Kit and Flt-3. *Blood* 97(11):3662-3664.
- Ozawa M, Engel J, Kemler R. 1990a.** Single amino acid substitutions in one Ca²⁺ binding site of uvomorulin abolish the adhesive function. *Cell* 63(5):1033-1038.
- Ozawa M, Ringwald M, Kemler R. 1990b.** Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(11):4246-4250.
- Ozawa M, Kemler R. 1998.** The membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain prevents dimerization and negatively regulates adhesion activity. *J Cell Biol* 142(6):1605-1613.
- Ozawa M. 2002.** Lateral dimerization of the E-cadherin extracellular domain is necessary but not sufficient for adhesive activity. *J Biol Chem* 277(22):19600-19608.
- Ozawa M. 2003.** p120-independent modulation of E-cadherin adhesion activity by the membrane-proximal region of the cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 278(46):46014-46020.
- Payne HR, Lemmon V. 1993.** Glial cells of the O-2A lineage bind preferentially to N-cadherin and develop distinct morphologies. *Dev Biol* 159(2):595-607.
- Pece S, Gutkind JS. 2000.** Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. *J Biol Chem* 275(52):41227-41233.
- Peifer M, Wieschaus E. 1990.** The segment polarity gene armadillo encodes a functionally modular protein that is the Drosophila homolog of human plakoglobin. *Cell* 63(6):1167-1176.
- Peifer M, McCrea PD, Green KJ, Wieschaus E, Gumbiner BM. 1992.** The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *J Cell Biol* 118(3):681-691.
- Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E. 2003.** Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* 112(4):535-548.
- Pertz O, Bozic D, Koch AW, Fauser C, Brancaccio A, Engel J. 1999.** A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *Embo J* 18(7):1738-1747.
- Peyrieras N, Hyafil F, Louvard D, Ploegh HL, Jacob F. 1983.** Uvomorulin: a nonintegral membrane protein of early mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(20):6274-6277.
- Philipp S, Cavalié A, Freichel M, Wissenbach U, Zimmer S, Trost C, Marquart A, Murakami M, Flockerzi V. 1996.** A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to Drosophila TRP and TRPL. *Embo J* 15(22):6166-6171.

- Philipp S, Hambrecht J, Braslavski L, Schroth G, Freichel M, Murakami M, Cavalie A, Flockerzi V. 1998.** A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *Embo J* 17(15):4274-4282.
- Philipp S, Trost C, Warnat J, Rautmann J, Himmerkus N, Schroth G, Kretz O, Nastainczyk W, Cavalie A, Hoth M, Flockerzi V. 2000.** TRP4 (CCE1) protein is part of native calcium release-activated Ca²⁺-like channels in adrenal cells. *J Biol Chem* 275(31):23965-23972.
- Pokutta S, Herrenknecht K, Kemler R, Engel J. 1994.** Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur J Biochem* 223(3):1019-1026.
- Puck TT, Cieciora SJ, Robinson A. 1958.** Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* 108(6):945-956.
- Putney JW, Jr. 1999.** TRP, inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, and capacitative calcium entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(26):14669-14671.
- Rabiet MJ, Plantier JL, Rival Y, Genoux Y, Lampugnani MG, Dejana E. 1996.** Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16(3):488-496.
- Ranheim TS, Edelman GM, Cunningham BA. 1996.** Homophilic adhesion mediated by the neural cell adhesion molecule involves multiple immunoglobulin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(9):4071-4075.
- Renaud-Young M, Gallin WJ. 2002.** In the first extracellular domain of E-cadherin, heterophilic interactions, but not the conserved His-Ala-Val motif, are required for adhesion. *J Biol Chem* 277(42):39609-39616.
- Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD, Wheelock MJ, Wu J, Zhang Z. 1994.** Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol* 14(12):8333-8342.
- Rhee J, Mahfooz NS, Arregui C, Lilien J, Balsamo J, VanBerkum MF. 2002.** Activation of the repulsive receptor Roundabout inhibits N-cadherin-mediated cell adhesion. *Nat Cell Biol* 4(10):798-805.
- Roh JY, Stanley JR. 1995.** Intracellular domain of desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen) confers adhesive function on the extracellular domain of E-cadherin without binding catenins. *J Cell Biol* 128(5):939-947.
- Roura S, Miravet S, Piedra J, Garcia de Herreros A, Dunach M. 1999.** Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 274(51):36734-36740.
- Schaefer M, Plant TD, Obukhov AG, Hofmann T, Gudermann T, Schultz G. 2000.** Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. *J Biol Chem* 275(23):17517-17526.
- Schaefer M, Plant TD, Stresow N, Albrecht N, Schultz G. 2002.** Functional differences between TRPC4 splice variants. *J Biol Chem* 277(5):3752-3759.
- Schmelz M, Franke WW. 1993.** Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: the syndesmos connecting retothelial cells of lymph nodes. *Eur J Cell Biol* 61(2):274-289.
- Schnittler H, Franke RP, Drenckhahn D. 1989.** Role of the endothelial actin filament cytoskeleton in rheology and permeability. *Z Kardiol* 78 Suppl 6:1-4.
- Schultz LW, Clardy J. 1998.** Chemical inducers of dimerization: the atomic structure of FKBP12-FK1012A-FKBP12. *Bioorg Med Chem Lett* 8(1):1-6.
- Shan W, Yagita Y, Wang Z, Koch A, Svenningsen AF, Gruzglin E, Pedraza L, Colman DR. 2004.** The minimal essential unit for cadherin-mediated intercellular adhesion comprises extracellular domains 1 and 2. *J Biol Chem* 279(53):55914-55923.
- Shan WS, Tanaka H, Phillips GR, Arndt K, Yoshida M, Colman DR, Shapiro L. 2000.** Functional cis-heterodimers of N- and R-cadherins. *J Cell Biol* 148(3):579-590.
- Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grubel G, Legrand JF, Als-Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA. 1995.** Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 374(6520):327-337.
- Sheetz MP. 1998.** Laser tweezers in cell biology. Introduction. *Methods Cell Biol* 55:xi-xii.
- Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Oku N, Miyazawa K, Kitamura N, Takeichi M, Ito F. 1994.** Tyrosine phosphorylation of beta-catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells. *Cell Adhes Commun* 1(4):295-305.

- Shimoyama Y, Tsujimoto G, Kitajima M, Natori M. 2000.** Identification of three human type-II classic cadherins and frequent heterophilic interactions between different subclasses of type-II classic cadherins. *Biochem J* 349(Pt 1):159-167.
- Simcha I, Shtutman M, Salomon D, Zhurinsky J, Sadot E, Geiger B, Ben-Ze'ev A. 1998.** Differential nuclear translocation and transactivation potential of beta-catenin and plakoglobin. *J Cell Biol* 141(6):1433-1448.
- Simionescu M. 1977.** The morphologic basis for normal endothelial permeability; intercellular pathways. *Adv Exp Med Biol.* 82:965-8.
- Sivasankar S, Briehner W, Lavrik N, Gumbiner B, Leckband D. 1999.** Direct molecular force measurements of multiple adhesive interactions between cadherin ectodomains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(21):11820-11824.
- Sivasankar S, Gumbiner B, Leckband D. 2001.** Direct measurements of multiple adhesive alignments and unbinding trajectories between cadherin extracellular domains. *Biophys J* 80(4):1758-1768.
- Spencer DM, Wandless TJ, Schreiber SL, Crabtree GR. 1993.** Controlling signal transduction with synthetic ligands. *Science* 262(5136):1019-1024.
- Spencer DM, Belshaw PJ, Chen L, Ho SN, Randazzo F, Crabtree GR, Schreiber SL. 1996.** Functional analysis of Fas signaling in vivo using synthetic inducers of dimerization. *Curr Biol* 6(7):839-847.
- Steinberg MS, Takeichi M. 1994.** Experimental specification of cell sorting, tissue spreading, and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(1):206-209.
- Stellwagen E. 1990.** Gel filtration. *Methods Enzymol* 182:317-328.
- Stevens T, Garcia JG, Shasby DM, Bhattacharya J, Malik AB. 2000.** Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279(3):L419-422.
- Strubing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. 2001.** TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* 29(3):645-655.
- Suggs SV, Wallace RB, Hirose T, Kawashima EH, Itakura K. 1981.** Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(11):6613-6617.
- Suyama K, Shapiro I, Guttman M, Hazan RB. 2002.** A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell* 2(4):301-314.
- Suzuki S, Sano K, Tanihara H. 1991.** Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue. *Cell Regul* 2(4):261-270.
- Suzuki-Inoue K, Tulasne D, Shen Y, Bori-Sanz T, Inoue O, Jung SM, Moroi M, Andrews RK, Berndt MC, Watson SP. 2002.** Association of Fyn and Lyn with the proline-rich domain of glycoprotein VI regulates intracellular signaling. *J Biol Chem* 277(24):21561-21566.
- Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. 2001.** A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *Embo J* 20(11):2768-2778.
- Takeda H, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Behrens J, Birchmeier W, Tsukita S. 1995.** V-src kinase shifts the cadherin-based cell adhesion from the strong to the weak state and beta catenin is not required for the shift. *J Cell Biol* 131(6 Pt 2):1839-1847.
- Takeda H, Shimoyama Y, Nagafuchi A, Hirohashi S. 1999.** E-cadherin functions as a cis-dimer at the cell-cell adhesive interface in vivo. *Nat Struct Biol* 6(4):310-312.
- Takeichi M. 1977.** Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol* 75(2 Pt 1):464-474.
- Takeichi M. 1993.** Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 5(5):806-811.
- Takeichi H. 1995.** The effect of curvature on visual interpolation. *Perception* 24(9):1011-1020.
- Tamura K, Shan WS, Hendrickson WA, Colman DR, Shapiro L. 1998.** Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. *Neuron* 20(6):1153-1163.
- Tang J, Lin Y, Zhang Z, Tikunova S, Birnbaumer L, Zhu MX. 2001.** Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels. *J Biol Chem* 276(24):21303-21310.
- Tang Y, Tang J, Chen Z, Trost C, Flockerzi V, Li M, Ramesh V, Zhu MX. 2000.** Association of mammalian trp4 and phospholipase C isozymes with a PDZ domain-containing protein, NHERF. *J Biol Chem* 275(48):37559-37564.

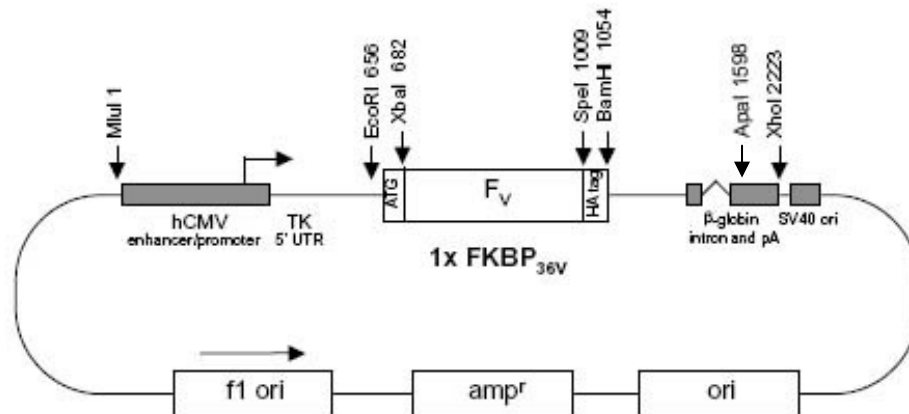
- Tanihara H, Sano K, Heimark RL, St John T, Suzuki S. 1994.** Cloning of five human cadherins clarifies characteristic features of cadherin extracellular domain and provides further evidence for two structurally different types of cadherin. *Cell Adhes Commun* 2(1):15-26.
- Taylor JL. 1993.** A simple, sensitive, and rapid method for detecting seed contaminated with highly virulent *Leptosphaeria maculans*. *Appl Environ Microbiol*. 59:3681-3685.
- Tepass U, Godt D, Winklbauer R. 2002.** Cell sorting in animal development: signalling and adhesive mechanisms in the formation of tissue boundaries. *Curr Opin Genet Dev* 12(5):572-582.
- Terada N, Ohno N, Ymakawa H, Ohara O, Liao X, Baba T, Ohno S. 2005.** Immunohistochemical study of a membrane skeletal molecule, protein 4.1G, in mouse seminiferous tubules. *Histochem Cell Biol* 124:303-311.
- Tinkle CL, Lechler T, Pasolli HA, Fuchs E. 2004.** Conditional targeting of E-cadherin in skin: insights into hyperproliferative and degenerative responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(2):552-557.
- Tiruppathi C, Minshall RD, Paria BC, Vogel SM, Malik AB. 2002.** Role of Ca²⁺ signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol* 39(4-5):173-185.
- Togashi H, Abe K, Mizoguchi A, Takaoka K, Chisaka O, Takeichi M. 2002.** Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron* 35(1):77-89.
- Trost C, Bergs C, Himmerkus N, Flockerzi V. 2001.** The transient receptor potential, TRP4, cation channel is a novel member of the family of calmodulin binding proteins. *Biochem J* 355(Pt 3):663-670.
- Uchida N, Honjo Y, Johnson KR, Wheelock MJ, Takeichi M. 1996.** The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J Cell Biol* 135(3):767-779.
- Valiron O, Chevrier V, Usson Y, Breviaro F, Job D, Dejana E. 1996.** Desmoplakin expression and organization at human umbilical vein endothelial cell-to-cell junctions. *J Cell Sci* 109 (Pt 8):2141-2149.
- Vannier B, Peyton M, Boulay G, Brown D, Qin N, Jiang M, Zhu X, Birnbaumer L. 1999.** Mouse *trp2*, the homologue of the human *trpc2* pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca²⁺ entry channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5):2060-2064.
- Venkateswaran K, Xiao K, Summers S, Calkins CC, Vincent PA, Pumiglia K, Kowalczyk AP. 2002.** Regulation of endothelial barrier function and growth by VE-cadherin, plakoglobin, and beta-catenin. *Am J Physiol Cell Physiol* 283(3):C811-821.
- Vestal DJ, Ranscht B. 1992.** Glycosyl phosphatidylinositol--anchored T-cadherin mediates calcium-dependent, homophilic cell adhesion. *J Cell Biol* 119(2):451-461.
- Vestweber D. 2002.** Regulation of endothelial cell contacts during leukocyte extravasation. *Curr Opin Cell Biol* 14(5):587-593.
- Volberg T, Geiger B, Kartenbeck J, Franke WW. 1986.** Changes in membrane-microfilament interaction in intercellular adherens junctions upon removal of extracellular Ca²⁺ ions. *J Cell Biol* 102(5):1832-1842.
- Volk T, Geiger B. 1986.** A-CAM: a 135-kD receptor of intercellular adherens junctions. II. Antibody-mediated modulation of junction formation. *J Cell Biol* 103(4):1451-1464.
- Wang T, Donahoe PK, Zervos AS. 1994.** Specific interaction of type I receptors of the TGF-beta family with the immunophilin FKBP-12. *Science* 265(5172):674-676.
- Wang T, Li BY, Danielson PD, Shah PC, Rockwell S, Lechleider RJ, Martin J, Manganaro T, Donahoe PK. 1996.** The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I receptors. *Cell* 86(3):435-444.
- Warnat J, Philipp S, Zimmer S, Flockerzi V, Cavalie A. 1999.** Phenotype of a recombinant store-operated channel: highly selective permeation of Ca²⁺. *J Physiol* 518 (Pt 3):631-638.
- Waschke J, Baumgartner W, Adamson RH, Zeng M, Aktories K, Barth H, Wilde C, Curry FE, Drenckhahn D. 2004.** Requirement of Rac activity for maintenance of capillary endothelial barrier properties. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(1):H394-401.
- Watanabe H, Takahashi R, Zhang XX, Kakizawa H, Hayashi H, Ohno R. 1996.** Inhibition of agonist-induced Ca²⁺ entry in endothelial cells by myosin light-chain kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 225(3):777-784.
- Wheelock MJ, Buck CA, Bechtol KB, Damsky CH. 1987.** Soluble 80-kd fragment of cell-CAM 120/80 disrupts cell-cell adhesion. *J Cell Biochem* 34(3):187-202.
- Wheelock MJ, Johnson KR. 2003.** Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol* 15(5):509-514.

- Winter MC, Kamath AM, Ries DR, Shasby SS, Chen YT, Shasby DM. 1999.** Histamine alters cadherin-mediated sites of endothelial adhesion. *Am J Physiol* 277(5 Pt 1):L988-995.
- Wolburg H, Lippoldt A. 2002.** Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol* 38(6):323-337.
- Woodfield RJ, Hodgkin MN, Akhtar N, Morse MA, Fuller KJ, Saqib K, Thompson NT, Wakelam MJ. 2001.** The p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase is associated with beta-catenin in the cadherin-based adhesion complex. *Biochem J* 360(Pt 2):335-344.
- Wrobel CN, Debnath J, Lin E, Beausoleil S, Roussel MF, Brugge JS. 2004.** Autocrine CSF-1R activation promotes Src-dependent disruption of mammary epithelial architecture. *J Cell Biol* 165(2):263-273.
- Wu S, Cioffi EA, Alvarez D, Sayner SL, Chen H, Cioffi DL, King J, Creighton JR, Townsley M, Goodman SR, Stevens T. 2005.** Essential role of a Ca²⁺-selective, store-operated current (ISOC) in endothelial cell permeability: determinants of the vascular leak site. *Circ Res* 96(8):856-863.
- Xie Q, Zhang Y, Cai Sun X, Zhai C, Bonanno JA. 2005.** Expression and functional evaluation of transient receptor potential channel 4 in bovine corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 81(1):5-14.
- Yao X, Garland CJ. 2005.** Recent developments in vascular endothelial cell transient receptor potential channels. *Circ Res* 97(9):853-863.
- Yap AS, Brieher WM, Pruschy M, Gumbiner BM. 1997.** Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Curr Biol* 7(5):308-315.
- Yap AS, Niessen CM, Gumbiner BM. 1998.** The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol* 141(3):779-789.
- Yip TT, Hutchens TW. 1996.** Immobilized metal ion affinity chromatography. *Methods Mol Biol* 59:197-210.
- Yudowski GA, Efendiev R, Pedemonte CH, Katz AI, Berggren PO, Bertorello AM. 2000.** Phosphoinositide-3 kinase binds to a proline-rich motif in the Na⁺, K⁺-ATPase alpha subunit and regulates its trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12):6556-6561.
- Zhang Z, Tang Y, Zhu MX. 2001.** Increased inwardly rectifying potassium currents in HEK-293 cells expressing murine transient receptor potential 4. *Biochem J* 354(Pt 3):717-725.
- Zhong Y, Brieher WM, Gumbiner BM. 1999.** Analysis of C-cadherin regulation during tissue morphogenesis with an activating antibody. *J Cell Biol* 144(2):351-359.
- Zhu B, Chappuis-Flament S, Wong E, Jensen IE, Gumbiner BM, Leckband D. 2003.** Functional analysis of the structural basis of homophilic cadherin adhesion. *Biophys J* 84(6):4033-4042.
- Zlatanova J, Paneva E, Yaneva J. 1994.** A spot test for protein detection and semiquantitative estimation in small samples. *Cytobios* 78(314):135-138.

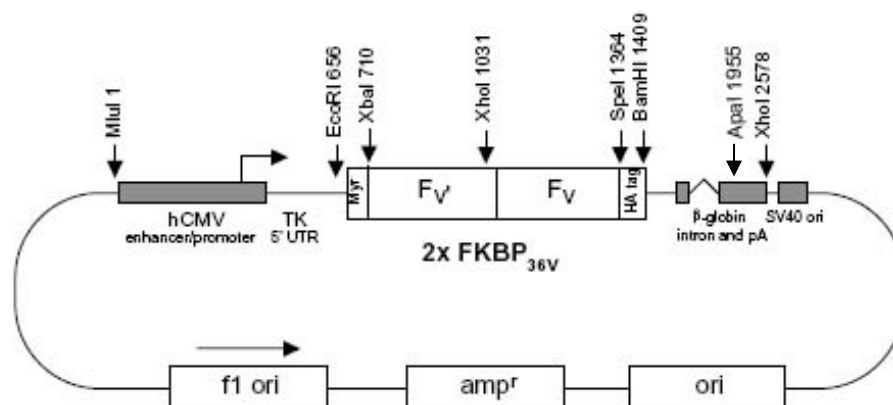
7 Anhang

7.1 Datenergänzungen

7.1.1 Vektorkarten der Ariad-Vektoren

pC₄-F_V1E (5371 bp)

pC₄-F_V1E enthält die cDNA kodierend für eine (1) **FKBP**-Domäne mit einem Aminosäureaustausch (Phe36**V**al) (F_V), gefolgt von einem carboxyterminalen Epitope-tag (E, des Influenza Hemagglutinin [HA] Gens) unter der Kontrolle des humanen CMV Promotors (C).

pC₄M-F_V2E (5726 bp)

pC₄M-F_V2E enthält nach einem aminoterminalen **Myristoylierungssignal** (M) die cDNA kodierend für zwei (2) **FKBP**-Domänen mit einem Aminosäureaustausch (Phe36**V**al) (F_V), gefolgt von einem carboxyterminalen Epitope-tag (E, des Influenza Hemagglutinin [HA] Gens) unter der Kontrolle des humanen CMV Promotors (C).

7.1.2 Klonierungsstrategien

7.1.2.1 Klonierungsstrategie zur Herstellung der Expressionsvektoren pEGFP-C3⁻-VE-ECTM-1xFKBP und pIRES-VE-ECTM-2xFKBP

7.1.2.1.1 Herstellung der Vektoren pVE-ECTM-A1 und pVE-ECTM-A2

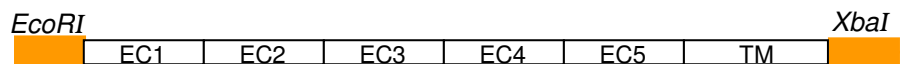
1. Amplifizierung der VE-Cadherin-ECTM-cDNA

PCR-Template:

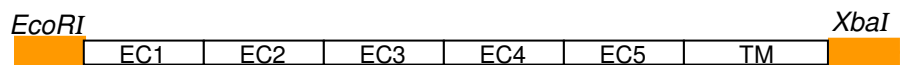
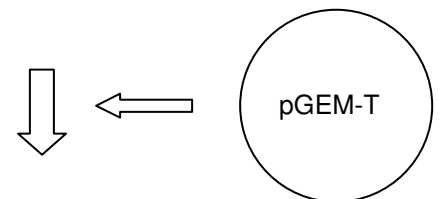
Volllängen-VE-Cadherin-cDNA

im pBlueskriptSK⁻-Vektor (s. Tab.2.1)

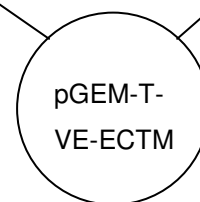
Oligonukleotide 1 (s.Tab.2.2)



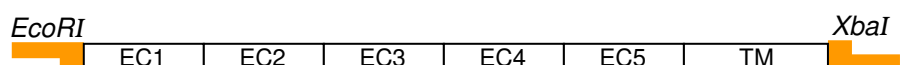
2. Zwischenklonierung der cDNA ECTM in den pGEM-T Vektor



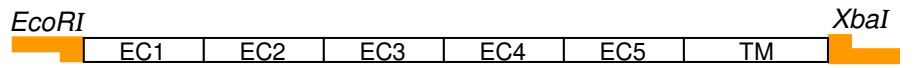
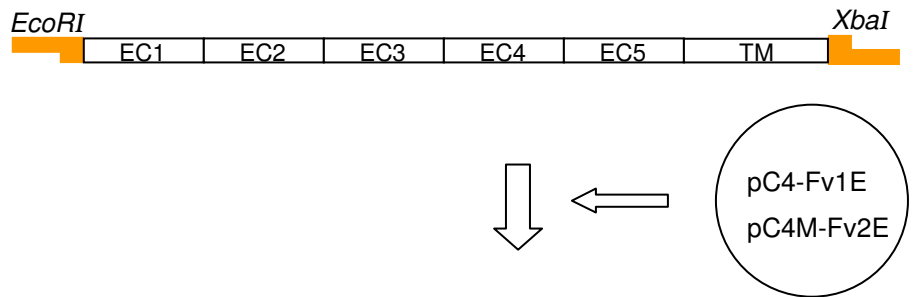
pGEM-T-VE-ECTM



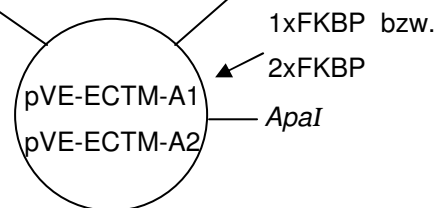
3. *EcoRI/XbaI*-Restriktion des pGEM-T Vektors, Isolierung der cDNA *EcoRI*-VE-ECTM-*XbaI*



4. Klonierung der cDNA *EcoRI*-VE-ECTM-*XbaI* zwischen die *EcoRI*- und *XbaI*-Schnittstellen der Ariad-Vektoren pC4-Fv1E und pC4M-Fv2E (s. Appendix A)



pVE-ECTM-A1 (pC4-Fv1E+VE-ECTM-cDNA) enthält die cDNA für VE-ECTM-1xFKBP
pVE-ECTM-A2 (pC4M-Fv2E+VE-ECTM-cDNA) enthält die cDNA für VE-ECTM-2xFKBP

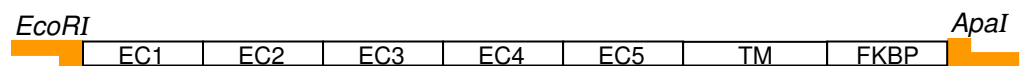
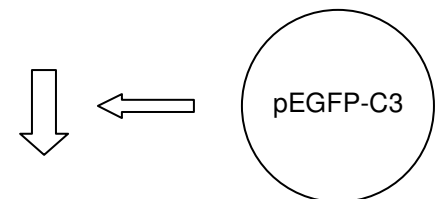


7.1.2.1.2 Herstellung des Expressionsvektors pEGFP-C3'-VE-ECTM-1xFKBP

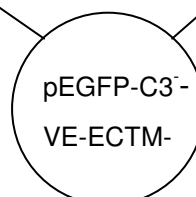
1. *EcoRI*/*ApaI*-Restriktion des pVE-ECTM-A1 Vektors, Gelelektion der cDNA *EcoRI*-VE-ECTM-1xFKBP-*ApaI*



2. Klonierung der cDNA *EcoRI*-VE-ECTM-1xFKBP-*ApaI* zwischen die *EcoRI*- und *ApaI*-Schnittstellen des pEGFP-C3 Vektors



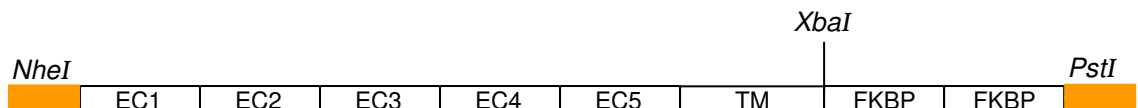
pEGFP-C3'-VE-ECTM-1xFKBP



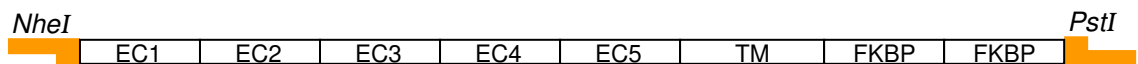
7.1.2.1.3 Herstellung des Expressionsvektors pIRES-VE-ECTM-2xFKBP

1. Amplifizierung der VE-ECTM-2xFKBP-cDNA

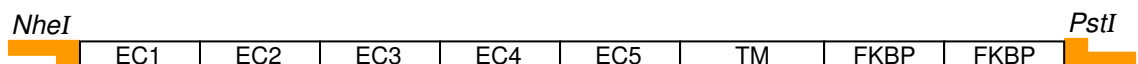
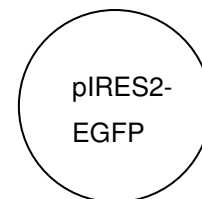
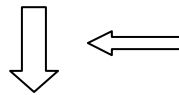
PCR-Template: pVE-ECTM-A2, Oligonukleotide 2 (s.Tab.2.2)



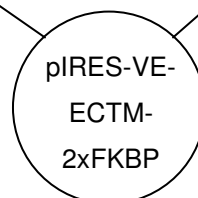
2. *NheI/PstI*-Restriktion und Reinigung der *NheI*-VE-ECTM-2xFKBP-*PstI*-cDNA



3. Klonierung der cDNA *NheI*-VE-ECTM-2xFKBP-*PstI* zwischen die *NheI*- und *PstI*-Schnittstellen des pIRES2-EGFP Vektors



pIRES-VE-ECTM-2xFKBP



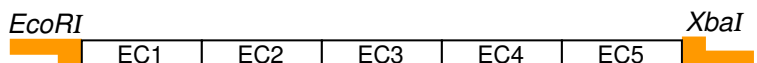
7.1.2.2 Klonierungsstrategie zur Herstellung des Expressionsvektors pIRES-VE-EC-1xFKBP-His6

7.1.2.2.1 Herstellung des Vektors pVE-EC-A1

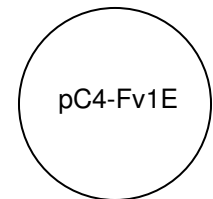
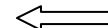
1. Amplifizierung der VE-Cadherin-EC-cDNA
 PCR-Template:
 Vollängen-VE-Cadherin-cDNA
 im pBlueskriptSK-Vektor
 Oligonukleotide 3: s.Tab.2.2



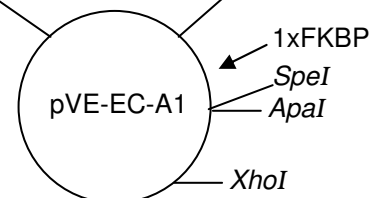
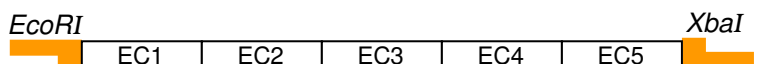
2. *EcoRI/XbaI*-Restriktion und Reinigung der cDNA *EcoRI-VE-EC-XbaI*



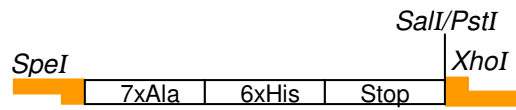
3. Klonierung der cDNA *EcoRI-VE-EC-XbaI* zwischen die *EcoRI*- und *XbaI*-Schnittstellen des Ariad-Vektors pC4-Fv1E



pVE-EC-A1

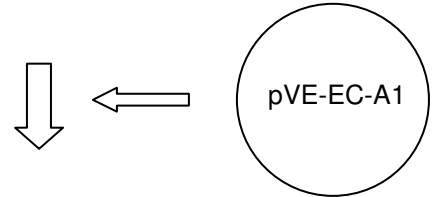


7.1.2.2 Einfügen eines His6-tags

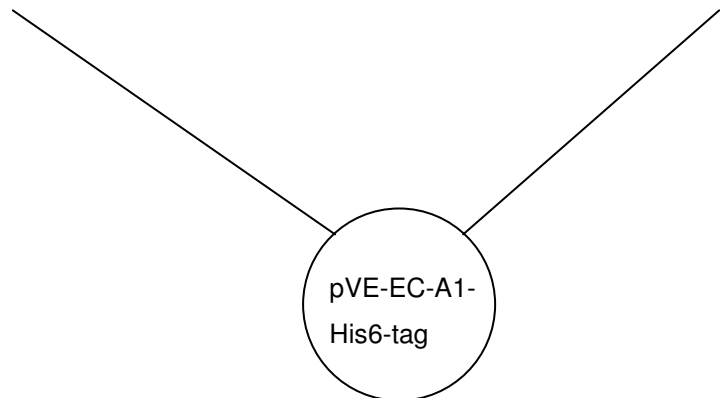


60 bp Fragment (His6-tag)

1. Ligation der DNA-Kassette (s. Tab.2.3) zwischen die *SpeI*- und *XhoI*-Schnittstellen des pVE-EC-A1-Vektors

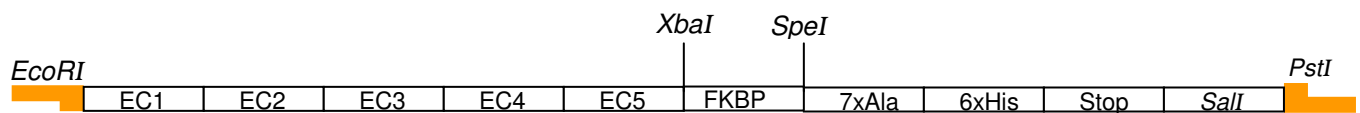


pVE-EC-A1-His6-tag

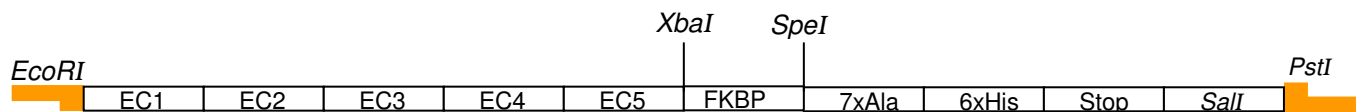
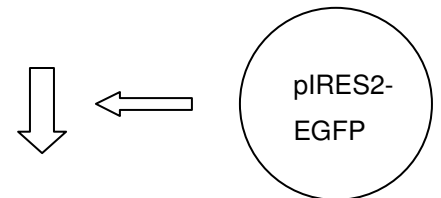


7.1.3 Herstellung des Expressionsvektors pIRES-VE-EC-1xFKBP-His6

1. *EcoRI/PstI*-Restriktion des pVE-EC-A1-His6-tag Vektors, Gelelektion der cDNA *EcoRI-VE-EC-1xFKBP-His6-PstI*



2. Klonierung der cDNA *EcoRI-VE-EC-1xFKBP-His6-PstI* zwischen die *EcoRI*- und *PstI*-Schnittstellen des pIRES2-EGFP Vektors



pIRES-VE-EC-1xFKBP-His6

pIRES-VE-EC-1xFKBP-His6

7.2 Abkürzungen

αMEM	α Modified Eagle Medium
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AFM	atomic force microscopy (Atomkraftmikroskopie)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
Ca²⁺	Calcium
[Ca²⁺]_i	intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration
[Ca²⁺]_e	extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration
CAM	cell adhesion molecule
CCE	capacitative Ca²⁺ entry
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CHO	Chinese Hamster Ovary
Da	Dalton
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMP	Dimethyl-Pimelimidat-Dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EC	extrazelluläre Cadherindomäne
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamtetraacetat
EMT	epitheliale-mesenchymale-Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenz activated cell sorter
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	Fetal Calf Serum (fetales Kälberserum)
FKBP	FK506 bindendes Protein
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography

g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
garb	Goat anti-rabbit
gart	Goat anti-rat
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI	Glycosyl-phosphatidyl-inositol
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H₂O	Wasser
HAV	Histidin-Alanin-Valin
HBSS	Hanks Buffered Salt Solution
HEK	Human Embryonic Kidney
IMAC	immobilied metal ion affinity chromatography
IRES	internal ribosomal entry side (interne ribosomale Bindungsstelle)
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Luria Bertani
μ	mikro
m	milli
M	molar
MCS	multiple cloning side
MES	2-Morpholinoethan-Sulfonsäure
min	Minute
MyEnd	myokardiale Endothelzellen
NGS	Normal Goat Serum (normales Ziegenserum)
Ni	Nickel
NPG	N-propyl-galat
NTA	Nitrilo-tri-acetic-acid (Nitriolotriessigsäure)
o.g.	oben genannt
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered-Saline (Phosphat-gepufferte-Kochsalzlösung)

PCR	P olymerase c hain r eaction (Polymerase Kettenreaktion)
PEG	P olyethylenglycol
PFA	P araformaldehyd
pH	pH -Wert
RT	R aumtemperatur
s.	siehe
s.o.	siehe o ben
s.u.	siehe u nten
SDS	S odium D odecyl S ulfat
sek	S ekunden
SOC	s tore- o perated c hannels
Tab.	T abelle
TEMED	N,N,N,N '- T etramethylendiamin
TM	t ransmembranär
Tris	T ris-hydroxymethyl-aminomethan
TRP	t ransient r eceptor p otential
TRPC	c anonical T RP
U	U nit (Enzymeinheit)
UV	U ntraviolett
V	V olt
VIV	V alin- I soleucin- V alin
WT	W ildtyp
z.B.	zum B eispiel
ZO-1	Z onula o ccludens-1

7.3 Lebenslauf

Name: Judith Katharina Gutberlet, geborene Eifler

Adresse: Hasenhof, 36160 Dipperz

Geburtsdatum: 18. Juli 1977

Geburtsort: Frankfurt am Main

Familienstand: verheiratet

Schulausbildung:

1984 - 1988: Grund- und Hauptschule, Oberbrechen

1988 - 1997: Gymnasium Marienschule, Limburg an der Lahn

Schulabschluss: Abitur

Studium:

10/97 - 08/02: Studium der Humanbiologie am Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

10/00 - 03/01: Laborpraktikum am Royal Melbourne Institute of Technology in Melbourne, Australien

11/01 - 08/02: Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Reproduktionsbiologie am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Aumüller

Titel: Untersuchungen zur Expression der Plasma Membran Ca^{2+} -ATPase (PMCA) Isoformen 1 und 4 in den männlichen akzessorischen Geschlechtsdrüsen der Ratte und Identifizierung der PMCA1

Splicevariante in der Koagulationsdrüse der Ratte

Berufliche Tätigkeit:

10/02 - 03/06: Doktorarbeit am Lehrstuhl II des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. Drenckhahn

Titel: Untersuchungen zu Wechselwirkungen von VE-

Cadherin-Molekülen untereinander und mit TRPC4

seit 04/06: wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl II des

Instituts für Anatomie und Zellbiologie in Würzburg

7.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Herren und Damen:

in Marburg: Aumüller, Berndt, Besedowsky, Bestgen, Daut, Dressler, Elsässer, Frenking, Geus, Heeg, Heldmaier, Jungclas, Kaiser, Kirchner, Konrad, Koolman, Lammel, Lill, Löffler, von Löw, Meinhardt, McGregor, Moll, Niessing, Röhm, Schäfer, Schulz, Schwaeble, K.-A. Seitz, J. Seitz, Suske, Tampé, Yates

in Melbourne: Hill

in Würzburg: Asan, Baumgartner, Benavente, Drenckhahn, Hübner, Koob, Waschke

7.5 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Drenckhahn für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung der Arbeit mit vielfältigen Anregungen. Außerdem danke ich ihm für die Einführung in das universitäre Lehren, und dass er die Fortführung meiner Arbeit mit Kind ermöglichte. Herrn Prof. Dr. Aumüller möchte ich für die Übernahme des Referates und die Vertretung der Arbeit vor der Medizinischen Fakultät der Philipps-Universität Marburg danken.

Herrn Dr. Koob, der leider 2005 verstorben ist, danke ich für die Einführung in jegliche Säulentchnik und die geduldige und kompetente Beantwortung aller Fragen.

Ich danke Prof. Dr. Baumgartner für seine konstruktiven Anregungen und die Unterstützung vor allem bei der Einzelmolekülfluoreszenz-Mikroskopie.

Dr. Waschke danke ich für tiefgehende Diskussionen, die Beantwortung meiner Fragen montags morgens kurz vor dem Seminar, für seinen Rat und ein offenes Ohr bei vielen Angelegenheiten.

Bei Dr. habil. Stefan Hübner möchte ich mich für die Beratung, das Korrekturlesen und die Hilfe bei den letzten Formulierungen und natürlich für die Bereitstellung des Vektors „pEGFP-C3-VE-Cadherin“ bedanken.

Für die gemeinsam durchlebte Doktorandenzeit als Sparingspartner, für Anregungen und Hilfe, für die vielen netten Tage und Abende, die Übernachtungsmöglichkeit und für das Korrekturlesen meiner Arbeit möchte ich Dr. Paola Bruggeman herzlich danken.

Für die Einführung und Anleitung im Labor danke ich Angela Meyer-Rachner. Mit ihrer Erfahrung und ihrem Wissen stand mir Agnes Weth mit Rat und Tat zur Seite.

Allen Kolleginnen, Doktoranden und Doktorandinnen aus der Biochemie und Molekularbiologie danke ich für die gute Zusammenarbeit und vor allem für ihre Hilfe und Unterstützung während der Schwangerschaft und der „mit-Kind-Phase“, besonders Nadja Niedermeier, Stefanie Imhof, Eva-Maria Klute, Yvonne Stöcker und Sabine Katzschmann.

Danken möchte ich allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe, bei denen immer ein nettes Arbeitsklima herrschte.

M. Linden aus dem Institut für Virologie in Würzburg danke ich für das Sortieren der transfizierten Zellen mit Hilfe des FACS. Prof. Harms aus dem Rudolf-Virchow-Zentrum in Würzburg danke ich für die Erlaubnis, das Einzelmolekülfluoreszenz-Mikroskop seiner Arbeitsgruppe zu benutzen. Prof. Vestweber aus dem Institut für Zellbiologie in Münster danke ich für die Bereitstellung der VE-Cadherin-cDNA, M. Zhu (Ohio State University, Columbus, OH, USA) danke ich für das Überlassen der TRPC4 exprimierenden HEK 293-Zellen (T4-60) und Ariad Pharmaceuticals (Cambridge, USA) für die Bereitstellung des FKBP-Dimerisierungssystems. Diese Arbeit wurde mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt (SFB 487 - Regulatorische Membranproteine).

Bei Ricarda Flicker-Aut möchte ich mich für das Korrigieren meiner Arbeit nach der neuen deutschen Rechtschreibung, wie sie ab 1. August 2006 gilt, bedanken.

Vielen Dank meinen Eltern Ursula und Hubert Eifler, die mich auch nach Beendigung meines Studiums weiter auf meinem Weg unterstützen. Meiner Mutter und meiner Schwiegermutter Ingeborg Gutberlet möchte ich außerdem für ihr Engagement bei der Betreuung unseres Kindes Fabian danken, was mir das Fortführen meiner Arbeit um ein Vielfaches erleichterte.

Ein ganz großes Dankeschön möchte ich meinem Mann Thomas dafür sagen, dass er mich in allen Lebenslagen unterstützt, für sein Verständnis und seine Geduld und für das Drucken der Arbeit.

7.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Untersuchungen zu Wechselwirkungen von VE-Cadherin-Molekülen untereinander und mit TRPC4“ im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Leitung von Prof. Dr. D. Drenckhahn mit Unterstützung durch Prof. Dr. W. Baumgartner, Dr. habil. S. Hübner und Dr. R. Koob ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt. Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

Gutberlet J, Baumgartner W, Koob R, Drenckhahn D. 2004. Regulation of adhesion by dimerisation and oligomerisation of vascular endothelial cadherin. 99. In Wien, Österreich vom 2. bis 5. April 2004. - 2004. - XXXI (Anatomischer Anzeiger; Bd. 186, Suppl.), S.106

Gutberlet J, Baumgartner W, Hübner S, Drenckhahn D. 2006. Association of VE-cadherin and TRPC4. 101. Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft in Freiburg Deutschland vom 7. bis 10. April 2006, Abstracts (in alphabetical order): <http://www.uni-luebeck.de/nc/anatges/pdf/VHB-gesamt.pdf>, S.111/112

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Kongressbeiträge angenommen worden:

Forced dimerisation and oligomerisation of cadherins modulate VE-cadherin mediated adhesion

J. Gutberlet, W. Baumgartner, R. Koob and D. Drenckhahn
Vortrag im Rahmen des SFB 487-Treffens (Regulatorische Membranproteine)
Würzburg, 24.11.2003

Regulation of adhesion by dimerisation and oligomerisation of vascular endothelial cadherin

J. Gutberlet, W. Baumgartner, R. Koob and D. Drenckhahn
Poster bei der Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft
Wien, 02.-05.04.2004

Transinteraction and Oligomerisation of Cadherins

J. Gutberlet, P. Bruggeman, J. Waschke, R. Koob, W. Baumgartner,
D. Drenckhahn
Poster bei dem Internationalen Symposium des SFB 487
Würzburg, 10.-12.06.2004

Association of VE-cadherin and TRPC4

Gutberlet J, Baumgartner W, Hübner S, Drenckhahn D
Poster bei der Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft
Freiburg, 07.-10.04.2006

Regulation of VE-cadherin adhesion

J. Gutberlet, W. Baumgartner and D. Drenckhahn
Vortrag bei der 23. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft
Würzburg, 27.-29.09.2006

In Vorbereitung ist die Publikation:

Targeting and modulation of TRPC4 by VE-cadherin in the vascular endothelium

Werner Baumgartner, Klaus Groschner, Stefan Hübner, Michael Poteser, Petra Eder, Judith Gutberlet, Christian Rosker, and Detlev Drenckhahn

Würzburg, den 10. August 2006

Judith Gutberlet