

Aus der Abteilung für Zellbiologie
des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg
Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Werner W. Franke

**Zell- und molekularbiologische Charakterisierung neuartiger Zell-Zell-
Verbindungsarten in Glioma-Zellen und mesenchymalen Stammzellen**

INAUGURAL - DISSERTATION

Zur Erlangung der Doktorwürde

Der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von

Dr. med. (Univ. Debrecen) Judit Boda-Heggemann
aus Debrecen, Ungarn

Heidelberg, 2005

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Werner W. Franke

Prof. Dr. Dr. h.c. Volker Storch

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden und werden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Straub, B.K., Boda, J., Kuhn, C., Schnoelzer, M., Korf, U., Kempf, T., Spring, H., Hatzfeld, M., Franke, W.W. 2003. A novel cell-cell junction system: the cortex adhaerens mosaic of lens fiber cells. *J. Cell. Sci.* 116, 4985-4995.

Wuchter, P., Boda, J., Grund, C., Kuhn, C., Krause, U., Eckstein, V., Gottschling, S., Franke, W.W., Ho, A.D. 2003. A novel type of cell-cell connections in mesenchymal stem cells. *Blood Suppl.* 112, 11.

Folgende Manuskripte sind in Vorbereitung:

Boda-Heggemann J., Hofmann I., Grund C., Kuhn C., Straub B., Schumacher H., Régnier-Vigouroux A., Spring H., Klekner A., Csécei G., Franke W.W. A novel kind of intercellular adhering junction and the principle of intrinsic type diversity of junction formation in astrocytes and astrocytomas.

Wuchter P., Boda-Heggemann J., Straub B., Grund C., Kuhn C., Krause U., Seckinger A., Spring H., Ho A.D., Franke W.W. *Processus adhaerentes*: tentacular cell processes studded with a special kind of adherens junctions connect bone marrow-derived human mesenchymal stem cells.

Hämmerling B., Grund C., Boda-Heggemann J., Moll R., Franke WW. The *complexus adhaerens* of mammalian endothelia revisited: A junction even more complex than hitherto thought.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von September 2001 bis Juli 2005 in der Abteilung für Zellbiologie des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. W. W. Franke.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. W. W. Franke für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit.

Prof. Dr. Dr. h.c. Volker Storch danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Dr. Beate Straub danke ich für die nette kollegiale Zusammenarbeit, für Korrektur und aufbauende Kritik. Dr. Hans Heid danke ich für zusätzliche Korrekturen und für seine Hilfe in der Antikörper-Herstellung, Dr. Herbert Spring für die LSM-Aufnahmen, Priv.-Doz. Dr. Ilse Hofmann für die Einführung in die Proteinbiochemie. Dr. Patrick Wuchter danke ich für die wesentliche Kooperation bei der Kultur und Analyse der menschlichen Knochenmark Zellen.

Prof. Dr. György Csécssei[†], Dr. Álmos Klekner, Prof. Dr. Zoltán Nemes und Prof. Dr. Markku Miettinen danke ich für das Sammeln und Überlassen der Gehirntumor-Proben sowie für Hilfe bei der diagnostischen Auswertung und Priv.-Doz. Dr. Anne Régnier-Vigouroux für die Überlassung der Primärkulturen von Mäuse-Astrocyten.

Mein besonderer Dank gilt Cécilia Kuhn und Christine Grund für ihre Hilfe bei der Immunfluoreszenz- und Elektronenmikroskopie, Edeltraut Noffz, Heide Schuhmacher und Michaela Hergt für ihre Unterstützung bei bestimmten Zellkulturen; Stefanie Winter für ihre Hilfe bei 2D-PA-Gelelektrophoresen, Dr. Martina Schnölzer und Dr. Tore Kempf für die MALDI-Analysen, Jutta Osterholt für die brillante photographische Arbeit und Einweisung in die Bildverarbeitung.

Dr. Ulrich-Frank Pape, Dr. Wiebke Peitsch, Dr. Sandra Kneissel, Susanne Voltmer, Priv.-Doz. Dr. Marion Schmidt-Zachmann und Prof. Dr. Jürgen Kartenbeck danke ich für wissenschaftlichen Diskussionen und experimentellen Ratschläge, wie ich mich ganz allgemein für die freundliche Unterstützung und das gute Arbeitsklima bei allen Mitarbeitern der Abteilung recht herzlich bedanken möchte.

Für seine Liebe, sein Verständnis, seinen Humor und seine Unterstützung in allen Lebensbereichen danke ich meinen Mann Dr. Felix Heggemann.

Meinen Eltern Prof. Dr. Zoltán Boda und Dr. Emese Ujvárosi danke ich für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen und dafür, dass sie mir einen universitären Werdegang ermöglicht haben.

Szüleimnek, Prof. Dr. Boda Zoltánnak és Dr. Ujvárosi Emesének szeretném megköszönni, hogy minden élethelyzetben támogatnak és hogy elindítottak egy tudományos pályán.

Meiner Familie/ Családomnak

SUMMARY

Junctions of the adherens category are characterised by cell type-specific combinations of transmembrane glycoproteins of the cadherin family and cytoplasmic plaque-proteins attached to them, which mostly anchor actin microfilaments. They are one of the main structural elements of cell type-specific architecture and cell-cohesion and also participate in several dynamic cell functions. Over the past decade, it has become increasingly obvious that the “adhering junctions” (AJs) of certain specific cell types can not be subsumed under the classic categories of adhering junctions but that they represent with their specific molecular combination new junctions *sui generis*. In this thesis, two new types of AJs of human cells and tissues have been identified and characterised, using cell biological, biochemical, immunological and molecular biological methods.

Astrocytoma and glioblastoma-cells as well as astrocytes are connected by AJs of different sizes, which are characterised by a compact plaque and contain the transmembrane glycoproteins N-cadherin, cadherin-11 and in some cell colonies also VE-cadherin. These are combined on the intracellular side with the plaque-proteins α - and β -catenin, together with the additional *armadillo*-proteins p120^{ctn}, ARVCF and plakoglobin and – surprisingly – the desmosomal protein plakophilin 2 and the tight junction proteins ZO-1, ZO-2 and cingulin which anchor, together with afadin and the actin-binding protein vinculin, microfilament-cables of the actin-type. Molecular interactions in this structure are discussed on the basis of data obtained by immunoprecipitation experiments, and possible functions of this AJ-type (termed *colligatio permixta*) in embryology, histology and pathology are discussed. Of particular interest is here the spontaneous clonal expression of VE-cadherin in a subtype of cells, a molecule which up to now has been found only in endothelial cells. This observation is discussed in relation to the known interactions of astrocytes and endothelia, especially in developmental biology.

Similarly in cultured human bone marrow cells, called “mesenchymal stem cells” another novel AJ-type been discovered, which consists also of N-cadherin and cadherin-11, in combination with significant amounts of the plaque-proteins α -catenin, β -catenin, p120^{ctn} and afadin, which -again- anchor cables of actin microfilaments. This type of AJs appears as small *puncta adherentia* (diameter about 30-200 nm) located on the central cell body as well as on long (up to 400 μ m) tentacle-like cell processes of core actin filament cables which are stabilised by ezrin, α -actinin and myosin. Such processes (*processus adherentes*) can be connected with similar processes of other cells through *puncta*-containing bridge-like structures but can also deeply and tight-fittingly penetrate in long (up to 40 μ m) invaginations of neighbouring cells. The AJ-regions of *puncta* of both cells are mostly fused into enormously long “double membrane” junctions (*manubria adherentia*). Indications of the occurrence of such *processus adherentes* in embryogenesis, possible biological functions and the diagnostic potential of these marker structures are discussed.

ZUSAMMENFASSUNG

Zell-Zell-Verbindungen ("Junctions") der Adhaerens-Kategorie sind durch zelltypische Kombinationen von Transmembran-Glykoproteinen der Cadherin-Großfamilie und damit assoziierten cytoplasmatischen Plaque-Proteinen bestimmt, die meist Actin-Mikrofilamente verankern. Sie stellen Hauptstrukturelemente des spezifischen Gewebe-Aufbaus und -Zusammenhalts dar und sind darüberhinaus auch an vielen dynamischen Zellfunktionen beteiligt. In den letzten Jahren hatte sich zunehmend deutlicher herausgestellt, dass viele "Adhering Junction" (AJ) besonderer Zelltypen nicht unter die bisher bekannten Klassen bzw. Typen von AJ subsumieren lassen, sondern aufgrund ihrer Struktur, vor allem aber ihrer besonderen molekularen Zusammensetzung eigene Strukturtypen *sui generis* darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit sind zwei AJ-Typen menschlicher Zellen und Gewebe in ihrer molekularen Zusammensetzung bestimmt worden, wobei Untersuchungen an Zellkulturen sowie zellbiologische, biochemische, immunologische und molekularbiologische Methoden benutzt wurden.

Astrocytom-Zellen, auch Astrocyten, und Glioblastom-Zellen bilden viele AJ unterschiedlicher Größe aus, die durch einen recht kompakten Plaque ausgezeichnet sind und die Cadherine N-Cadherin, Cadherin-11 sowie in einigen Zellkolonien immer wieder auch VE-Cadherin enthalten, die auf der Binnenseite mit den Plaque-Proteinen α - und β -Catenin, den weiteren *armadillo*-Proteinen p120^{ctn}, ARVCF und Plakoglobin sowie - überraschenderweise - dem von Desmosomen her bekannten Protein Plakophilin 2 und den - von "Tight Junctions" bekannten - Plaque-Proteinen ZO-1, ZO-2 und Cingulin komplexiert sind und zusammen mit Afadin und dem Actin-bindenden Protein Vinculin Mikrofilament-Bündel des Actin-Typs verankern. Molekulare Interaktionen innerhalb dieser Struktur werden aufgrund erster Immunpräzipitations-Ergebnisse ebenso diskutiert wie die mögliche Bedeutung dieses AJ-Typs, dem der Name *Colligatio permixta* gegeben wurde, in Embryologie, Histologie und Pathologie. Dabei ist das spontane klonale Auftreten einer Unterform, die das - erstmals außerhalb von Gefäß-Endothelien nachgewiesene - VE-Cadherin enthält, auch deshalb von besonderem Interesse, weil der Astrocyt - gewissermaßen seiner natürlichen Position nach - oft eine räumliche wie funktionale Beziehung zu Blutgefäßen, besonders Kapillaren erkennen lässt. Neue tumordiagnostischen Möglichkeiten wie entwicklungsbiologischen Implikationen der Entdeckung dieses neuen Junction-Typs werden besprochen.

Gleichzeitig ist in Kulturen bestimmter menschlicher Knochenmarkzellen, sogenannter "mesenchymaler Stammzellen", ein anderer - in seiner molekularen Zusammensetzung äußerst schlichter - AJ-Typ entdeckt worden, der ebenfalls N-Cadherin und Cadherin-11 in Verbindung mit signifikanten Mengen der Plaque-Proteine α - und β -Catenin, Protein p120^{ctn} und Afadin enthält und vielfach auch Actinfilament-Bündel verankert. Dieser AJ-Typ erscheint in der Regel in Form kleiner *Puncta adhaerentia* (Durchmesser meist im Bereich 30-200 nm), wobei diese sowohl am eigentlichen zentralen Zellkörper als auch auf tentakel-artigen Zellausläufern verschiedener, teils sehr großer Länge (bis über 400 μ m lang) vorkommen, die einerseits durch Actinfilament-Bündel in Verbindung mit Ezrin, α -Actinin und Myosin stabilisiert sind, andererseits aber auch Mikrotubuli enthalten. Solche

Zellausläufer (*Processus adhaerentes*) können dabei sowohl über durch *Puncta* hergestellte Brückenstrukturen mit Ausläufern anderer Zellen verbunden sein, andererseits aber auch tief und eng in entsprechenden, z.T. sehr häufigen und langen (bis über 40 µm) Invaginationen von Nachbarzellen verankert sein, wobei die AJ-Regionen der *Puncta* beider Zellen gewissermaßen zu einer riesigen Doppelhülle (*Manubrium adhaerens*) fusioniert sein können. Hinweise auf ein Vorkommen solcher *Processus adhaerentes* in der Embryogenese und mögliche biologische Funktionen solcher Strukturen werden ebenso besprochen wie Einsatzmöglichkeiten und mögliche Bedeutung in der Diagnostik.

Inhaltsangabe

Abkürzungsverzeichnis

Besondere Definitionen und Terminologie

1 EINLEITUNG	1
1.1 Gewebe-Aufbau und Zellarchitektur-Elemente	1
1.2 Cytoskelett-Filamente	1
1.3 Interzelluläre Verbindungen	2
1.3.1 „Tight Junctions“	3
1.3.2 Adhärenz-Verbindungen	4
1.3.3 Desmosomen	8
1.3.4 Sonderformen von „Adhering Junctions“	10
1.2.4 Zielsetzung der Arbeit	12
2 MATERIAL	14
2.1 Zellkulturlinien und primäre Zellkulturen	14
2.1.1 Humane Zellkulturlinien	14
2.1.2 Humane primäre Zellkulturen	15
2.1.3 Nichthumane Zellkulturlinien	15
2.1.4 Nichthumane primäre Zellkulturen	16
2.2 Gewebe	16
2.3 Antikörper	16
2.3.1 Primärantikörper	16
2.3.2 Sekundärantikörper	21
2.4 Chemikalien	21
2.5 Puffer, Medien und Lösungen	21
2.6 Geräte	23
2.7 Verwendete Kits	23
3 METHODEN	24
3.1 Zellkultur	24
3.1.1 Primärkulturen von Endothelzellen	24
3.1.2 Primäre Astrocyten-Kulturen von BALB/c Mäusen	24
3.1.3 Primäre humane Mesenchymale Stammzell (MSC)-Kulturen	25
3.1.4 Klonierung von Zellen	25

3.2 Lichtmikroskopie	26
3.2.1 Fixierung von Kulturzellen	26
3.2.1.1 Methanol/Aceton-Fixierung	26
3.2.1.2 Formaldehyd- Fixierung	26
3.2.2 Herstellung und Fixierung von Kryostatschnitten	27
3.2.3 Färbung mit Methylenblau	27
3.3 Antigen-Freilegung („Antigen-Retrieval“) durch Mikrowellenbehandlung von Gewebeschnitten	27
3.3.1 Herstellung und Fixierung von Gewebeschnitten von in Paraffin eingebetteten Gewebe	27
3.4 Fluoreszenzmikroskopie	28
3.4.1 Immunfluoreszenzmikroskopie	28
3.4.2 Fluoreszenzmikroskopie mit anderen Reagenzien	29
3.5 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (LSM)	29
3.6 Immunhistochemie	30
3.7 Haematoxylin-Eosin Färbung	30
3.8 Elektronenmikroskopie	30
3.8.1 Konventionelle Elektronenmikroskopie	31
3.8.2 Immunelektronenmikroskopie	32
3.9 Biochemische Proteintechniken	32
3.9.1 Proteinfällung mit Methanol/Chloroform	32
3.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	33
3.9.3 „Zweidimensionale“ Gelelektrophorese: Isoelektrische Fokussierung (IEF/SDS-PAGE)	34
3.9.4 Färbung von Proteinen in Gelen	36
3.9.4.1 Coomassie-Brillantblau Färbung	36
3.9.4.2 Kolloidale Coomassie-Brillantblau Färbung	36
3.9.5 Transfer von Polypeptiden auf PVDF Membranen („Naßblot“-Verfahren)	37
3.9.6 Spezifische Antigen-Erkennung durch Antikörper auf PVDF-Membranen („Immunblot“)	38
3.9.7 Mehrfachverwendung von PVDF Membranen („Stripping“)	38
3.10 Biochemische Methoden	39
3.10.1 Herstellung von Zell-Lysaten aus Kulturzellen („Gesamtzell-Extrakt“)	39
3.10.2 Herstellung von Cytoskelett-Präparaten	39
3.10.3 Immunpräzipitation (IP)	39

3.10.4 Massenspektrometrie	40
3.10.4.1 Trypsin-Spaltung im Gel	41
3.10.4.2 MALDI-Analyse	41
3.11 Molekularbiologische Methoden	41
3.11.1 Extraktion von Gesamt-RNA von Zellen	41
3.11.2 Herstellung cDNA mittels RT-Reaktion	42
3.11.3 DNA-Methoden	42
3.11.3.1 DNA-Längenstandards für Agarose-Gelelektrophorese: Bluescribe Vector mit Hinfl (Roche) verdaut	42
3.11.3.2 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	42
3.11.3.3 PCR-Techniken	43
3.11.3.4 Agarose-Gelelektrophorese	44
3.11.3.5 Sequenzanalyse der DNA	45
4 ERGEBNISSE	46
4.1 <i>Colligatio permixta</i>: ein neuer Typ von „Adhering junctions“ in Glioma-Zellen	46
4.1.1 Die Zellkultur-Linie U333/MG und verwandte Linien: Morphologie und Nachweis der glialen Abstammung	47
4.1.2 Biochemischer Nachweis von Zelladhäsionsproteine in U333 Glioma-Zellen	48
4.1.2.1 Zusammensetzung des Cytoskeletts	48
4.1.2.2 Molekulare Zusammensetzung der Zell-Zell-Verbindungen	48
4.1.2.2.a Proteine der „Adherens Junctions“	48
4.1.2.2.b Vorkommen desmosomaler Proteine	51
4.1.2.2.c Vorkommen von Proteinen der „Tight Junctions“	51
4.1.2.3 Endotheliale Merkmale	51
4.1.2.4 Ergebnisse in weiteren Glioma Zelllinien und Kulturen primärer Astrocyten	52
4.1.3 Analyse der Cadherin-haltigen Komplexe in U333-Glioma-Zellen mit Immunpräzipitation (IP)	53
4.1.4 Glioma-U333-AJ in der Immunfluoreszenzmikroskopie	56
4.1.5 Analyse der Cadherin-haltigen Glioma-AJ mit Doppelfluoreszenzmikroskopie und Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)	56
4.1.6 Lokalisierung anderer Zellverbindungskomponenten	66
4.1.7 Nachweise von VE-Cadherin und Protein p0071 mRNA in Glioma-Zellen mit RT- PCR	67
4.1.8 Elektronenmikroskopie	68
4.1.9 Zellverbindungen in Primärkulturen aus Balb/c Astrocyten	71

4.1.10 Klonierung der U333 Glioma-Zellen	72
4.1.11 Bildung heterotypischer Zell-Zell-Verbindungen von Glioma-Zellen in Mischkulturen	73
4.1.12 Zur molekularen Zusammensetzung der „Junctions“ in humanen Glia-Tumoren	74
4.1.12.1 Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Gewebeschnitten	76
4.2 <i>Processus adhaerentes</i>: Neuartige Zellverbindungsstrukturen von mesenchymalen Stammzellen (MSC)	79
4.2.1 MSC-Kulturen	79
4.2.2 Biochemischer Analyse der Zell-Adhäsionsmolekülen in MSC-Kulturen	80
4.2.3 Vorkommen verschiedener Zelltyp-Differenzierungsproteine in MSC	82
4.2.4 Nachweis von Cadherin-Komplexen in MSC in Immunpräzipitationsversuchen	84
4.2.5 Darstellung von Cytoskelett- und Zellverbindungsproteinen in der Immunfluoreszenzmikroskopie	85
4.2.6 Analyse der MSC-„Junctions“ mit Doppelimmunfluoreszenz-LSM	88
4.2.7 Elektronenmikroskopie der MSC-Zellverbindungen	94
4.2.8 Quantitative und dynamische Aspekte	97
4.2.9 Nachweise verschiedener Cadherin-mRNAs	99
4.2.10 Abwesenheit von Syndecan-1 in MSC Zell-Zell-Verbindungen	100
5 DISKUSSION	102
5.1 Mesenchymale Zellen und Tumore	102
5.2 Bedeutung der Glia-Zellen in Biologie und Medizin	103
5.2.1 Ein neuer Typ von Adhering Junctions: Die <i>Colligatio permixta</i> von Glioma- und Glia-Zellen	105
5.2.1.1 Die Cadherine der <i>Colligatio permixta</i>	107
5.2.1.2 Zur Bedeutung der Cadherin-Komplexe beim Aufbau von Endothel-Glia-Zell-Verbänden	109
5.2.1.3 Plaque-Komponenten der <i>Colligatio permixta</i>	110
5.2.1.4 Zur Signifikanz von Doppelimmunlokalisierungen in CP und anderen komplexen Strukturen und zur möglichen histopathologischen Bedeutung von CP	112
5.3 Mesenchymale Stammzellen bei Säugetieren - embryonale und adulte Formen: Definitionen und Hypothesen	114
5.3.1 <i>Puncta et manubria adhaerentia</i>: Die beiden morphologischen Hauptformen der Adhärenz-Verbindungen mesenchymaler Stammzellen in Kultur	115

5.3.1.1 Zur Cadherin-Ausstattung der <i>Puncta</i> und <i>Manubria adhaerentia</i> mesenchymaler Stammzellen in Kultur	117
5.3.1.2 Die Plaques der MSC-Zellverbindungen und die dort verankerten Cytoskelettelemente	119
5.3.1.3 Die <i>Processus-adhaerens</i>-Strukturen als neue zellbiologische Entitäten	120
5.4 Schlussbemerkungen	124
6 LITERARURVERZEICHNIS	127

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABP	Actin-bindende Proteine
AJ	„Adherens Junction“
APS	Ammoniumperoxisulfat
<i>arm</i>	<i>Armadillo</i>
AS	Aminosäure
ARVCF	“ <i>Armadillo</i> repeat gene deleted in the Velo-Cardio-Facial syndrome”
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaar(e)
BSA	„Bovine Serum Albumin“, Rinderserumalbumin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CK	Cytokeratin
CP	<i>Colligatio permixta</i>
CPAE	„Calf Pulmonary Arterial Endothelial Cells“ - Endothelzellen aus der Kälberlungenarterie
Da	Dalton
DAPI	4'6-Diamidin-2-Phenyl-Indol
DES	Desmosom
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ECACC	„European Collection of Cell Cultures“
ECGS	„Endothelial Cell Growth Supplement“, Wachstumsfaktoren für Endothelzellen in Kultur
ECL	„Enhanced Chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat, liegt als Natriumsalz vor
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin
FACS	Durchflußcytometrie
FERM	Proteine: Four-point-one (4.1), Ezrin, Radixin, Moesin
GBM	<i>Glioblastoma multiforme</i>
GFAP	„Glial fibrillary acidic protein“, Gliafilamentprotein
GJ	“Gap Junction”
gt	„goat“; Ziege
gp	„guinea pig“; Meerschweinchen
h	Stunde
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N''-2-Ethansulfonsäure
HUVEC	“Human Umbilical Vein Endothelial Cells“; humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene
HRP	„Horseradish-Peroxidase“, Meerrettich-Peroxidase
HSC	„Hematopoetic Stem Cell“; Hämatopoetische Stammzelle

ICAM	„Intercellular Adhesion Molecule“
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
IF	Intermediärfilament
IFM	Immunfluoreszenzmikroskopie
IgG	Immunglobulin der Subklasse G
IgM	Immunglobulin der Subklasse M
IP	Immunpräzipitation
JAM	„Junctional Adhesion Molecule“
kDa	kilo-Dalton
LSM	Konfokale „Laser-Scanning“ Mikroskopie
m	Maus bzw. Meter
M	Molar
mA	Milli-Ampere
mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI-MS	„Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Mass Spectrometry“
min	Minute
MG	Molekulargewicht
MSC	„Mesenchymal Stem Cells“, Mesenchymale Stammzellen
mRNA	„Messenger Ribonucleic Acid“
NAP	Nectin-Afadin-Ponsin
NCS	„Newborn Calf Serum“, Serum von neugeborenen Kälbern
NP40	Nonidet P40 (Ethylphenylpolyethylenglycol)
NPRAP	„Neural Plakophilin-related <i>Armadillo</i> Protein“ (Neurojungin)
ODG	Oligodendrogliom
pA	polyklonales Antiserum
PA	<i>Processus adhaerens</i>
PBS	„Phosphate-Buffered Saline“, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDZ	Eine Gruppe ähnlicher Proteine: PSD-95: ein postsynaptisches Protein, Dlg: <i>Drosophila lethal disc-large-1</i> Tumorsuppressor-Gen und ZO-1
PKP	Plakophilin
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
rb	„Rabbit“, Kaninchen
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	„Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction“
SDS-PAGE	„Sodium Dodecyl Sulphate“ (Natriumdodecylsulphat) –Polyacrylamid Gelelektrophorese
sec	Sekunde
SMA	„Smooth Muscle- α -Actin“; Glattmuskel- α -Actin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer

TBST	„Tris Buffered Saline“- Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenamid
TJ	„Tight Junction“
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
Triton-X-100	Ethylenglycol(x)p-y-octylprenol
Tween-20	Polyethylensorbitanmonolaurat
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	„Weight per volume“, Masse pro Volumen
WHO	„World Health Organisation“
ZO	<i>Zonula occludens</i> , „Tight junction“

Besondere Definitionen und Terminologie

A.

In der Fachliteratur werden in Zusammenhang mit den Cadherinen und ihren Funktionen die Begriffe "homophile" bzw. "heterophile" Bindung bzw. Adhäsion verwandt, ohne dass dabei immer völlig klar ist, in welcher Weise das jeweils gemeint ist. In dieser Arbeit soll daher der Klarheit wegen durchweg spezifisch unterschieden werden:

I. *Cis*-homophile Interaktion ist die direkte, d.h. molekular-nachbarschaftliche, laterale Wechselwirkung zwischen Cadherinen derselben Art in derselben Struktur (z.B. "Junction") derselben Zelle.

II. *Trans*-homophile Interaktion ist die direkte frontale molekulare Wechselwirkung zwischen Cadherinen derselben Art in den beiden spiegelbild-symmetrischen Teilen derselben Struktur ("Junction") zweier - dadurch verbundener - Zellen.

III. *Cis*-heterophile Interaktion ist die direkte laterale Wechselwirkung zwischen zwei Cadherin-Molekülen verschiedener Art in derselben Struktur ("Junction") derselben Zelle.

IV. *Trans*-heterophile Interaktion ist die direkte frontale Wechselwirkung von verschiedenen Cadherin-Molekültypen in den beiden spiegelbild-symmetrisch angeordneten Hälften derselben Struktur (z.B. "Junction") zweier sich berührender Zellen.

Die Begriffe werden hier somit streng molekularbiologisch benutzt, was der jeweiligen entwicklungsbiologischen, nur den Zelltyp berücksichtigenden "klassischen" Definition nicht entsprechen muss (zur komplexen - und nicht immer stimmigen - Literatur und experimentellen Ansätzen hierzu siehe z.B. Herbst, 1990; Holtfreter, 1939, 1944; Steinberg, 1958, 1962a-d, 1963a,b, 1964, 1970, 1978; Harris, 1976; Takeichi, 1993, 1995; Steinberg und Takeichi, 1994; Redies, 2000; Tepass et al., 2000; Niessen und Gumbiner, 2002; Duguay et al., 2003; Foty und Steinberg, 2005).

B.

Die in dieser Arbeit verwandten Kulturzellen aus menschlichen Hirntumoren sind nach der derzeitigen WHO-Nomenklatur (Kleihues und Cavenee, 1997, 2000) unter der Gruppen-

Bezeichnung "Astrocytic tumors" zu führen. Es wird hier aber meist die breiter umfassende Bezeichnung "Glioma" verwandt.

1 EINLEITUNG

1.1 Gewebe-Aufbau und Zellarchitektur-Elemente

Cytoskelett-Filamente und interzelluläre Kontakte bestimmen vielfach die Gestalt der Zelle und sind für Aufbau und Aufrechterhaltung von Zell- und Gewebearchitektur, auch vieler Funktionen verantwortlich. Sie sind außerdem an Prozessen, bei denen die Zelle ihre Form oder Gestalt ändert, beteiligt, so z.B. bei Zellteilungen, Bewegungen, Formveränderungen, Endo- und Exocytose. Aufgrund ihrer relativ stabilen Struktur und geringer Löslichkeit lassen sich die einzelnen Architektur-Komponenten mit Zellfraktionierungsverfahren und biologischen Methoden anreichern und in vielen Fällen auch *in vitro* zu den jeweiligen typischen Polymerstrukturen rekonstruieren („Self-assembly“).

1.2 Cytoskelett-Filamente

Cytoskelett-Filamente können nach ihrem Durchmesser in drei verschiedene Systeme eingeteilt werden, die in **Tabelle 1** zusammengefasst sind (neuere Übersichten: Fuchs und Weber, 1994; Herrmann und Harris, 1998; Coulombe et al., 2001; Herrmann und Aebi, 2004).

Tab. 1. Klassifikation der vornehmlichen Cytoskelett-Filamente

	Mikrotubuli	Intermediärfilamente (IF; nach Haupt-Proteinen)	Mikrofilamente
Durchmesser [nm]	20-25	8-14	5-6
Haupt-Proteine	α-Tubulin β-Tubulin (weitere Tubuline)	Typ I und II: Cytokeratine Typ III: Vimentin, Desmin, ¹ GFAP, Peripherin Typ IV: Neurofilamente Typ VI: Nestin, Synemin Typ V: *	Actine (zelltypische Kombinationen von 6 Genprodukten)
Verankerungs- Strukturen	z.B. Centriol, Kinetochor, Cilien- Basis (Polplatten an der Kernhülle)	² Fleckdesmosomen (Desmosomen, <i>Maculae adhaerentes</i>)	Z-Banden und Plasmamembran-Plaques („Focal Adhesions“) ² Adhärenzverbindungen ² Verschchlusskontakte (TJ)

*Typ V-IF-Filamentproteine (Lamine) bilden andere Strukturen und sind in der Regel in der Lamina des Zellkerns anzutreffen.

¹GFAP, Gliofilamentprotein („Glial Filament Acidic Protein“)

²Bei deutschen Bezeichnungen wird weitgehend der Nomenklatur von Drenckhahn (1994) gefolgt.

1.3 Interzelluläre Verbindungen

Interzelluläre Zell-Zell-Verbindungsstrukturen sind wesentlich bei der Entstehung, Morphogenese und Aufrechterhaltung von Geweben und komplexen Organismen (Metazoen) beteiligt. Sie tragen schon in der Embryogenese zur Gewebebildung und zum Aufbau des Organismus in entscheidender Weise bei (z.B. Holtfreter, 1939; Trinkaus und Groves, 1955; Steinberg, 1962a-d, 1963b, 1970, 1996; Steinberg und Takeichi, 1994; Takeichi, 1977; Duguay et al., 2003; siehe auch weitere Literaturangaben unter „Besondere Definitionen und Terminologie“). Außerdem spielen einige ihrer Proteine auch bei der Vermittlung von Signalen und Zell-Zell-Interaktionen im Zellinneren eine Rolle (u.a. Behrens, 1999; Huelsken und Birchmeier, 2001; Jamora und Fuchs, 2002; Getsios et al., 2004).

In der heutigen „Lehrbuch-Klassifikation“ (siehe z.B. Bloom und Fawcett, 1975; Kühnel, 2002; Drenckhahn, 1994) interzellulärer Kontakte werden gemeinhin die folgenden Kategorien aufgeführt:

1. Verschlusskontakte („**Tight Junctions**“, TJ; z.B. *Zonula occludens*; neuere Übersichten: Stevenson und Keon, 1998; Tsukita et al., 2001; Matter und Balda, 2003; zu verwandten Strukturen vgl. z.B. Langbein et al., 2002, 2003), die als Hauptbarriere für die parazelluläre Ausbreitung von Zellen, Partikeln und vielen Molekülen bilden.

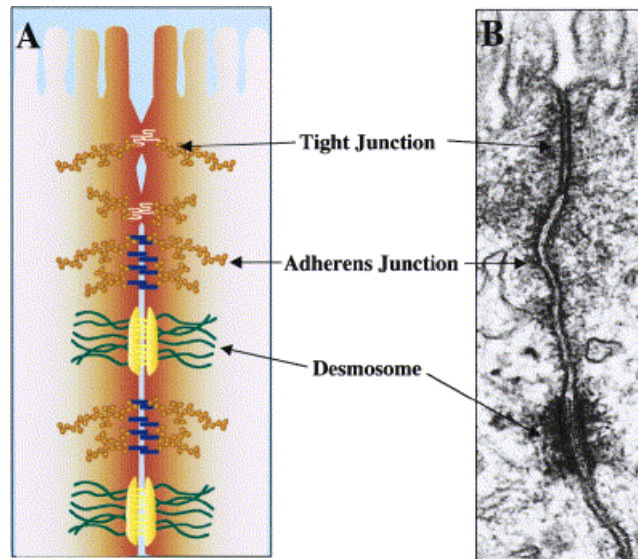
2. „**Adherens Junctions**“ (AJ; *Zonula, Fascia, Punctum adhaerens*) und

3. Fleckdesmosomen (**Desmosomen**, DES; *Macula adhaerens*), die beide auch unter dem Begriff Adhärenzverbindungen („**Adhering Junctions**“) zusammengefasst werden können und für spezifische Filament-Verankerungen und die mechanische Stabilität von Geweben verantwortlich sind (**Tab.1**; vgl. z.B. Farquhar und Palade, 1963; Staehelin, 1974; Geiger et al., 1983; Edelman und Thiery, 1985; Franke et al., 1987, 1994; Godsel et al., 2004; Perez und Nelson 2004), sowie

4. Kommunikationskontakte („**Gap Junctions**“, GJ; *Nexus, Maculae communicantes*), die in der interzellulären Kommunikation und dem direkten cytoplasmatischen Stoffaustausch kleiner bis mittelgroßer Moleküle eine Rolle spielen (z.B. Simon und Goodenough, 1998; Goodenough und Paul, 2003).

Die Transmembranproteine dieser Zell-Zellverbindungen sind auf der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran meist mit bestimmten Proteinen verbunden und bauen mehr oder weniger ausgeprägte Plaque-Strukturen auf, die im Fall der ersten drei genannten Junction-Typen besonders ausgeprägt sein können. Diese drei Plaque-tragenden, „geschlossenen“ (d.h. keine Kanalstrukturen ausbildenden) Zellverbindungstypen sind

deshalb im Folgenden besonders beachtet. Eine Übersicht über die Anordnung dieser drei Interzellulärverbindungen ist im **Schema 1** für den besonders übersichtlichen Fall des subapikalen Zell-Zell-Kontaktbereiches im Dünndarmepithel vorgestellt.



Schema 1. Schematische Darstellung (A) der klassischen Einteilung der subapikalen „Junctions“ (nach Perez-Moreno et al., 2003) in polaren Epithelien und elektronenmikroskopische Aufnahme (B) dieser Region in humanen Duodenalzellen („absorptive cells“).

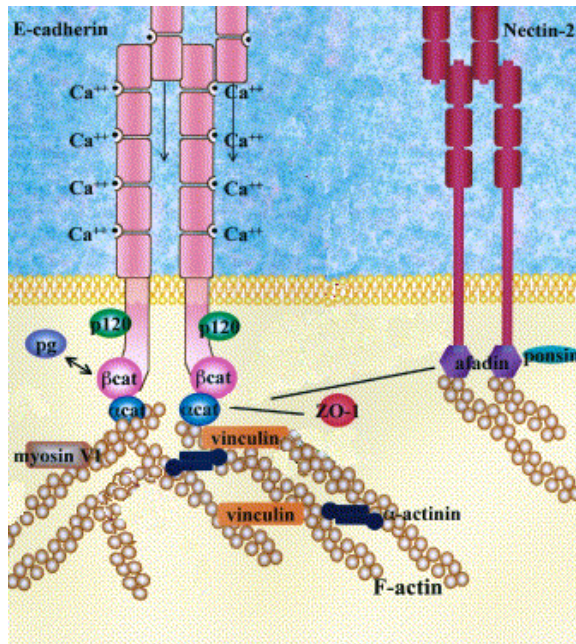
1.3.1 „Tight Junctions“

Tight Junctions (TJ) sind seit Jahrzehnten als charakteristische Strukturen der einschichtigen Epithelien und Endothelien bekannt, deren biologische Hauptrollen einerseits in der Schaffung von Barrieren zwischen Lumina (z.B. Darm, Lunge, Gefäße) und dem mesenchymalen Raum und andererseits einer intramembranösen Sperre zwischen apikaler und basolateraler Membranregion („Fence“) liegen. TJ wurden ursprünglich über ihre morphologischen Eigenschaften definiert: In elektronenmikroskopischen Aufnahmen erscheinen sie typischerweise als maximal enge Membran-Membran-Kontakt-Regionen („kissing points“), oft mit einem schmalen elektronendichten cytoplasmatischen Plaque, an dem Mikrofilamente assoziiert sein können. Durch TJ-Membranprotein-Komplexe entsteht eben der weitgehend undurchlässige Verschluss, der den parazellulären Transport verhindert bzw. begrenzt. Als Transmembran-Komponenten wurden **Occludin**, Mitglieder der **Claudin**-„Superfamilie“ (bisher 24 Mitglieder; Tsukita und Furuse, 2000; Tsukita et al., 2001) und die **Proteine JAM 1-4** (eine Immunglobulin-Familie; vgl. Aurrand-Lions et al., 2001) identifiziert. Das erste charakterisierte TJ-Plaque-Protein war **Protein ZO-1** (Stevenson et al.,

1986; Anderson et al., 1988). Protein ZO-1 wie auch die Proteine **ZO-2** und **ZO-3** gehören zur **PDZ-Protein-Familie** (PSD95/DLG/ZO-1; PDZ-Domäne: ein aus 80-90 Aminosäuren bestehendes Motiv). Weitere TJ-PDZ-Proteine sind **PAR 3** und **6** sowie **Plas1**. Ebenso gehören sie zur **MAGUK (Membran-assoziierte Guanylatkinasen)**-Familie wie auch die **MAGI 1-3** („MAGUKs with inverted domain structure“) genannten Proteine. Protein ZO-1 wurde außer in TJ auch in GJ lokalisiert (Giepmans und Moolenaar, 1998; Toyofuku et al., 1998; Nielsen et al., 2001). Weitere Proteine der TJ-Plaques sind das **Cingulin** und das „dual“ (d.h. auch im Zellkern) lokalisierte Protein **Symplekin** (Citi et al., 1988; Gumbiner et al., 1991; Jesaitis und Goodenough, 1994; Keon et al., 1996; Haskins et al., 1998; Stevenson und Keon, 1998; Hofmann et al., 2002). In jüngster Zeit wurden darüberhinaus TJ-artige Strukturen nicht nur in der obersten lebenden Schicht menschlicher Epithelien nachgewiesen (z.B. Brandner et al., 2002; Furuse et al., 2002; Schlüter et al., 2004) sondern es wurden auch weitgehend unbekannte, molekular verwandte Zell-Zell-Verbindungen (z.B. *Coniunctio laminosa*, *Iunctura structa*) in verschiedenen mehrschichtigen Epithelien, selbst in Gebilden ohne Lumen wie den Hassallschen Körperchen des Thymus und den „Hornperlen“ verschiedener Plattenepithel-Carcinome, beschrieben (Langbein et al., 2002, 2003).

1.3.2 Adhärenz-Verbindungen

Adhärenz-Verbindungen (AJ) sind durch einen mittleren Membran-Membran-Abstand (von etwa 20-30 nm) und einen elektronendichten cytoplasmatischen bis zu 20 nm dicken Plaque bestimmt, an den Mikrofilamente inserieren (Staehelin et al., 1974; Geiger et al., 1983; Borrmann et al., 2000; Huelsken und Birchmeier, 2001; Nagafuchi, 2001; Vasioukhin und Fuchs, 2001; Tepass, 2002; Pokutta und Weis, 2002). Sie kommen in Epithelien, Endothelien, im Nervengewebe, in Muskeln und vielen anderen Zelltypen, auch in Zellkulturen, vor und erscheinen morphologisch in vielfältigen Formen, die z.B. als *Zonula*, *Fascia* oder *Punctum adhaerens* bezeichnet werden (u.a. Geiger et al., 1983, 1985; Perez-Moreno et al., 2003; Bazzoni und Dejana, 2004; weitere Literaturangaben und Erörterungen finden sich im Abschnitt „Diskussion“ dieser Arbeit). Das derzeitige – vereinfachte - Bild ihres molekularen Aufbaus ist im **Schema 2** abgebildet.



Schema 2. Schematischer Aufbau von Adhärenz-Verbindungen. Dargestellt sind das Cadherin-, Catenin- und das NAP (Nectin-Afadin-Ponsin)-System, welche mit dem Actin-Cytoskelett in Verbindung stehen (modifiziert nach Perez-Moreno et al., 2003).

Abkürzungen: Pg, Plakoglobin; p120, Protein p120ctn; α-cat, α-Catenin; β-cat, β-Catenin.

Die Transmembran-Proteine der *Zonulae adhaerentes* sind sog. **klassische Cadherine** (vgl. die Übersicht bei Angst et al., 2001; zur Geschichte der embryologischen Experimente, die zu der Entdeckung der Cadherine geführt haben, siehe u.a. Holtfreter, 1939; Steinberg, 1962 a,b, 1963, 1970, 1978; Edelman, 1993; Okada, 1996). Cadherine sind Calcium-abhängige Adhäsions-Glykoproteine („**Calcium-dependent adhering proteins**“), die für die Morphogenese, das Zell-„Self-Sorting“ und die Etablierung von Gewebegrenzen eine wichtige Rolle spielen (u.a. Imhof et al., 1983; Vestweber und Kemler, 1984; Takeichi, 1990; Edelman und Crossin, 1991; Steinberg und Takeichi, 1994; Takeichi, 1995; Redies, 2000; Niessen und Gumbiner, 2002; Duguay et al., 2003; Gooding et al., 2004). Neben den klassischen Cadherinen sind auch die desmosomalen Cadherine, die atypischen Cadherine und die Protocadherine Mitglieder der Cadherin-Familie, die alle sog. extrazellulär gelegene „Cadherin-repeat“-Sequenzen besitzen (Oda et al., 1994). Unter Ca^{2+} -Mangel werden bei vielen Zell- und Gewebe-Typen die Cadherin-haltigen AJ geschwächt bzw. ihre Bildung unterbunden (s.o. angegebene Literatur, ferner Kartenbeck et al., 1982, 1991; Duden und Franke, 1988; Demlehner et al., 1995). Die cytoplasmatische Domäne vieler Cadherine enthält vor allem eine konservierte Sequenz, die für die Bindung der Catenine verantwortlich ist (vgl. Nagafuchi und Takeichi, 1989).

Die „klassischen“ Cadherine können aufgrund struktureller Unterschiede in der extrazellulären Domäne in zwei Typen aufgeteilt werden. Die Bildung verschiedener Cadherin-Subtypen ist während der embryonalen Entwicklung räumlich und zeitlich reguliert (Hatta und Takeichi, 1986; Takeichi, 1991; Redies, 2000). Sie werden in vielen Geweben

auch in zelltyp-spezifischer Weise gebildet, z.B. das Typ-I Cadherin **E-Cadherin** (Synonyme: Uvomorulin, L-CAM) hauptsächlich in epithelialen Zellen, hingegen **N-Cadherin** (Synonyme: Neurales Cadherin, A-CAM) in Nerven-, Muskel- und Bindegewebe, sowie in bestimmten Knochenmark- und Blut-Zellen (Takeichi, 1988; Knudsen et al., 1995; Salomon et al., 1992; Soler und Knudsen, 1994; Puch et al., 2001; Hinz et al., 2004) gebildet. Weitere Mitglieder der Typ I Cadherin-Familie sind **M-Cadherin** im Skelettmuskel und bestimmten Zellen der *Cerebellum* (Donalies et al., 1991; Rose et al., 1995), **R-Cadherin** in Retina (Inuzuka et al., 1991), **P-Cadherin** in Plazenta (Nose und Takeichi, 1986), sowie **T-Cadherin** (Synonyme: Cadherin 13, H-Cadherin, CDH13) in Epidermis und Endothelien (Zhou et al., 2002). Typ II Cadherine sind u.a. das **VE-Cadherin** der Endothelien (Synonym: Cadherin-5; Dejana et al., 1999), und das **Cadherin-11** in mesenchymalen Geweben (Synonym: OB/Osteoblasten/-Cadherin; Kimura et al., 1995; die beiden werden ausführlich in dieser Arbeit behandelt, siehe Diskussion).

AJ-Plaques sind mit der cytoplasmatischen Seite der Cadherine assoziiert und bestehen u. a. aus den „**Arm-repeat**“ Proteinen. Die Multigen-Familie der **Armadillo**-Proteine ist durch das Vorkommen einer unterschiedlichen Anzahl von Wiederholungen der *Arm*-Domäne charakterisiert (nach dem Segment-Polaritätsgen *Armadillo* aus *Drosophila melanogaster*; Peifer und Wieschaus, 1990). Das gemeinsame Strukturmerkmal der *arm-repeat* Proteine ist ein 42 Aminosäuren-Motiv, das sich 6-13mal wiederholt und Bindungsstellen für Cadherine enthält (Pai et al., 1996; Paffenholz und Franke, 1997). Zur *Armadillo*-Proteinfamilie gehören z.B. β -Catenin, Plakoglobin, die Proteine p120^{ctn}, ARVCF und p0071, sowie Neurojungin und die Plakophiline. *Armadillo*-Proteine sind neben dem Aufbau von AJ auch an der sog. Wnt-Signalkaskade beteiligt. Lösliches **β -Catenin** interagiert darüberhinaus im Cytoplasma mit dem Protein APC („**Adenomatous Polyposis Coli**“) und LEF/TCF („**Lymphocyte enhancer factor/ T-cell factor**“)-, d.h. Transkriptionsfaktoren und reguliert dadurch die Genexpression (Behrens et al., 1996).

Plakoglobin wurde als erstes Protein der *Armadillo*-Familie und als einziges Protein, das konstitutiv sowohl in *Zonulae* als auch in *Maculae adhaerentes* zu finden ist, identifiziert (Cowin et al., 1986; Kapprell et al., 1987; Franke et al., 1989; Fouquet et al., 1992; Pasdar et al., 1995). Es bindet den cytoplasmatischen Teil sowohl der klassischen als auch der desmosomalen Cadherine (Cowin et al., 1986; Peifer et al., 1992; Troyanovsky et al., 1994) sowie die Plaque-Proteine Desmoplakin und α -Catenin (Aberle et al., 1994; Hinck et al., 1994) und interagiert in seiner löslichen Form ebenfalls mit dem LEF/TCF-Transkriptionsfaktor (Maeda et al., 2004). **Protein p120^{ctn}**, das ursprünglich als Substrat der

onkogenen Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase Src identifiziert wurde (Shibamoto et al., 1995), ist auch ein Bestandteil der Plaques von Adhärenz-Verbindungen (Aghib und McCrea, 1995; Daniel und Reynolds, 1995; Übersicht bei Anastasiadis und Reynolds, 2000; Peifer und Yap, 2003) und assoziiert mit klassischen Cadherinen über seine Juxtamembran-Region (Thoreson et al., 2000). Protein **ARVCF** („*Armadillo* repeat gene deleted in velo-cardio-facial syndrome /VCFS/“) zeigt in seiner Sequenz große Homologie zu Protein p120^{ctn} (Mariner et al., 1999). **Neurojungin** (Synonyme: δ -Catenin/NPRAP; „neural Plakophilin related *arm*-repeat protein“) wurde ursprünglich in neuronalen Zellen beschrieben sowie in den heterotypischen Zellverbindungen zwischen Photorezeptoren und Müller-Glia-Zellen in der *Zona limitans externa* der Retina lokalisiert (Paffenholz et al., 1997, 1999; Kim et al., 2002; Lu et al., 2002; Martinez et al., 2003). Protein **p0071**, ein weiteres Plaque-Protein, (Hatzfeld und Nachtsheim, 1996) interagiert sowohl mit AJ-Proteinen wie VE-Cadherin als auch mit desmosomalen Proteinen wie Desmoplakin (Calkins et al., 2003). Zusätzlich zu den *arm*-Proteinen sind in AJ Plaques Actin-bindende Proteine (ABP) wie α -Actinin und Vinculin (Kemler, 1992; Hinck et al., 1994; Reynolds et al., 1994; Aghib und McCrea, 1995; Daniel und Reynolds, 1995; Shibamoto et al., 1995) zu finden.

Das **α -Catenin** bindet über β -Catenin bzw. Plakoglobin an Cadherine (u.a. Nagafuchi et al., 1992; Aberle et al., 1994, 1996) und ist generell - als ein mit **Vinculin** verwandtes Protein - meist zusammen mit dem Vinculin am Aufbau der Plaques und an der Verankerung des Aktin-Filament-Systems beteiligt (Geiger et al., 1980; Weiss et al., 1998).

Außer dem Cadherin-Catenin-System muss auch der Nectin-Afadin-Ponsin-(NAP)-Komplex zu den konstitutiven Komponenten von "Adhering Junctions" gerechnet werden, sowohl in polaren Epithelzellen als auch in Fibroblasten bzw. ähnlichen Nicht-Epithelzellen, wobei dessen Moleküle in mehrfacher Weise mit den Cadherin-Catenin-Molekülen interagieren. Dabei kann **Nectin**, ein Ca^{2+} -unabhängig reagierendes Protein vom Bautypus der Immunglobuline, in vier Isoformen vorkommen, die homo- wie heterotypisch - eben wohl auch mit Cadherinen - interagieren können (Takahashi et al., 1999; Kikyo et al., 2000; Tachibana et al., 2000; Tanaka et al., 2003; Hoshino et al., 2004).

Afadin ist als Nectin- und Actinfilamente-bindendes, großes (~205.000 kDa) Plaque-Protein beschrieben worden, das in zwei - nur geringfügig verschiedenen - Spleiß-Varianten vorkommen kann (l- und s-Form) und offenbar ein wichtiges Verbindungselement zwischen dem NAP und dem Cadherin-Catenin-Ensemble darstellt (Mandai et al., 1997; Ikeda et al., 1999; Takahashi et al., 1999; Miyahara et al., 2000), ebenso wie das meist mit ihm zusammen auftretende ABP **Ponsin** (Mandai et al., 1999). Außerdem ist auch von einer Rolle von NAP-

Proteinen, speziell des Nectin, aber auch des Afadin, beim Aufbau von "Tight Junctions" (TJ) berichtet worden (Yamamoto et al., 1997; Fukuhara et al., 2002). Darüberhinaus kann offenbar die Bindung von Afadin auch an das Protein ZO-1/NAP-Komplex Teile sowohl an AJ als auch an TJ beitragen (Yokoyama et al., 2001).

1.3.3 Desmosomen

Desmosomen (*Maculae adhaerentes*, DES) sind „semistabile“, dynamisch reguliertem Aufbau und Abbau unterworfenen Strukturen, die vor allem den Aufbau und die Bewahrung der Gewebeorganisation sichern und bestimmte molekulare „Ensembles“ darstellen (u.a. Staehelin, 1974; Franke et al., 1981, 1982; Schwarz et al., 1990; Schmidt et al., 1994; neuere Übersicht bei Green und Gaudry, 2000; Getsios et al., 2004). Sie und ihre molekulare Bausteine sind z.B. wesentliche Elemente der Gewebestabilität bei mechanischer Belastung wie vor allem durch Gen-Ausschaltungsexperimente und den Folgen bestimmter Mutationen in desmosomalen Bausteinen bei Menschen und Tieren hervorgeht (u.a. Bierkamp et al., 1996; Ruiz et al., 1996; Gallicano et al., 2001; Protonotarios et al., 2001; Eshkind et al., 2002; Grossmann et al., 2004). Desmosomen dieser Zusammensetzung kommen in allen Epithelien, im Myokard, in dendritischen Retikulumzellen von Lymphknoten-Follikeln und in der Arachnoidea von Hirnhäuten vor (u.a. Franke et al., 1982b; Kartenbeck et al., 1984; Schwarz et al., 1990; Schmidt et al., 1994, 1999; Akat et al., 2003). Sie haben generell einen elektronendichten cytoplasmatischen Plaque und erscheinen meist plattenförmig symmetrisch mit Durchmessern zwischen 0,2 und 1,0 µm. Der Membran-Membran Abstand beträgt meist 25-30 nm und im Interzellularspalt ist oft eine elektronendichte „Mittellinie“ sichtbar, die sog. *Desmoglea* (von Glykoproteinen gebildet; Mueller und Franke, 1983; Cowin, Matthey und Garrod, 1984; Cowin et al., 1985a; Buxton et al., 1993; Garrod, 1993; Koch und Franke 1994; Schaefer et al., 1994; North et al., 1999).

Die Transmembrankomponenten der Desmosomen sind die **desmosomalen Cadherine**, Desmocollin (Dsc) 1-3 und Desmoglein (Dsg) 1-3 (Koch et al., 1990, 1992; Collins et al., 1991; Mechanic et al., 1991; Nilles et al., 1991; Parker et al., 1991; Buxton et al., 1993; Koch und Franke, 1994; vgl. Angst et al., 2001). Sie sind in ihrer molekularen Struktur den klassischen Cadherinen ähnlich, jedoch weisen die Desmocolline und Desmogleine eine deutlich größere und komplexere cytoplasmatische Domäne auf (Koch und Franke, 1994), in der sich u.a. ein konserviertes, allgemein Cadherin-typisches Segment befindetet, an dem Plaque-Proteine, besonders Plakoglobin, binden (u.a. Troyanowsky et al., 1993; Kowalczyk et

al., 1994; Witcher et al., 1996; Green und Gaudry, 2000). Die diversen Isoformen der **Desmocolline (Dsc 1-3)** und **Desmogleine (Dsg 1-4)** werden zelltyp-spezifisch gebildet (Koch et al., 1992; Buxton et al., 1993; Schäfer et al., 1994; Nuber et al., 1995, 1996; zur Funktion siehe auch Hanakawa et al., 2004), wobei besonders eine Zellschichten-spezifische Bildung in menschlichen Epithelien auffällt (Nuber et al., 1995, 1996; King et al., 1995; Schäfer et al., 1994; 1996) und auch funktionell wichtig ist, wie vor allem diverse Erberkrankungen zeigen, die auf Mutationen solcher Glykoproteine beruhen (siehe Übersicht bei Cheng und Koch, 2004). Bei der Maus wurden kürzlich auch weitere, anscheinend auf bestimmte Arten beschränkte Desmoglein-Isoformen beschrieben: **Dsg 4, 5 und 6** (Cheng und Koch, 2004). Beim Mensch wurde eine anscheinend nur in den obersten Schichten der Epidermis in bemerkenswerter Konzentration vorkommende Isoform, das Dsg 4, entdeckt (Übersicht bei Cheng und Koch, 2004). Die desmosomalen Cadherine bilden außer mit Plakoglobin auch Komplexe mit Plakophilinen und Desmoplakinen (Garrod, 1993; Koch und Franke, 1994).

Die Plaque-Proteine der DES sind die **Desmoplakine (DP I und II)**, die Plakophiline (**PKP 1-3**) und das **Plakoglobin** (Franke et al., 1981, 1982; Cowin et al., 1985a, 1986; Kapprell et al., 1988; Garrod, 1993; Heid et al., 1994; Schmidt et al., 1994; Mertens et al., 1996; Green und Jones, 1996; North et al., 1999). **Desmoplakin (DP)** gehört zur **Plakin-Familie** und kommt in zwei Spleißvarianten vor (Müller und Franke, 1983; Cowin et al., 1985b; Green und Gaudry, 2000; Ebata et al., 2001a; Übersichtsartikel z.B. bei Kapprell et al., 1990; Godsel et al., 2004). Desmoplakin ist, als erstes identifiziertes Plakin sozusagen der „Urtyp“ der Proteine der Plakin-Familie, die allgemein an der Bindung von Intermediärfilamenten beteiligt sein können. Weitere Mitglieder der Plakin-Familie sind z.B. die Proteine **BPAG1** („**B**ullous **p**emphigoid **a**ntigen 1“), **Envoplakin** und **Periplakin** (u.a. Green et al., 1992; Ruhrberg et al., 1997; zum Vorkommen außerhalb von Desmosomen siehe Straub et al., 2003).

Die Subfamilie der **Plakophiline (PKP 1-3)** gehört zur „Großfamilie“ der *arm-repeat* Proteine und umfasst derzeit drei Mitglieder, mit insgesamt bisher fünf Spleißvarianten. Alle Plakophiline sind bemerkenswerterweise – als einzige Junction-Proteine - basisch und enthalten 9 sog. „*arm-repeat*“ Motive. **PKP 1** (früheres Synonym: Bande-6 Protein) kommt in suprabasalen Schichten mehrschichtiger Epithelien vor (Franke et al., 1983; Kapprell et al., 1988; Schäfer et al., 1993; Hatzfeld et al., 1994; Heid et al., 1994; Schmidt et al., 1994). Das Protein kann in zwei Isoformen erscheinen, **PKP 1a** und **1b**, von denen mindestens eine im Zellkern vorkommen kann (vgl. z.B. Schmidt et al., 1997). **PKP 2** ist eine Komponente der

Desmosomen ein- und mehrschichtiger Epithelien, der „Junctions“ im Glanzstreifen des Herzmuskels und der Desmosomen des dendritischen Retikulums der Lymphknoten. PKP 2 bildet Komplexe mit der RNA-Polymerase II (Mertens et al., 1996, 1999, 2001), und gehört damit zu den „Dual Location Proteins“. **PKP 3** wird ebenfalls in Epithelien gebildet, vor allen auch in suprabasalen Schichten vieler mehrschichtiger Epithelien, fehlt aber in Cardiomyocyten und Hepatocyten (Bonné et al., 1999; Schmidt et al., 1999).

1.3.4 Sonderformen von „Adhering Junctions“

Im vergangenen Jahrzehnt musste die Kategorie der „Adhering Junctions“ um weitere neue Typen erweitert werden. Hierzu zählt z.B. die *Area composita* des Herzens (Borrmann, 2000; Borrmann et al., 2000; siehe auch Grossmann et al., 2004), die eine Art Mischform aus klassischer *Fascia adhaerens* und Desmosom darstellt. Der *Complexus adhaerens* ist ein neuer desmoplakin-haltiger Junction-Typ in den Rethothelzellen der Lymphknotensinus und in bestimmten lymphatischen Endothelien (Schmelz und Franke, 1993; Schmelz et al., 1994; siehe auch Ebata et al., 2001b; Gallicano et al., 2001; Zhou et al., 2004). Zu erwähnen sind auch noch der *Contactus adhaerens* in den Körnerzellen der Glomeruli des Cerebellums (Rose et al., 1995; Bahjaoui-Bouhaddi et al., 1997; Hollnagel et al., 2002), die heterotypischen Zell-Zell-Verbindungen in der *Zona limitans externa* der Retina (Paffenholz et al., 1999) und die *Cortex adhaerens* der Augenlinse (Straub et al., 2003), die je eine eigenständige Entität unter den Junctions darstellen.

Die bisher bekannten Typen von Adhärenz Zellkontakten und deren Zusammensetzung sind in der **Tabelle 2** zusammengefasst.

Tab. 2. Zell-Zell-Verbindungen der Adhärenz-Kategorie und ihre molekularen Bestandteile.

n.b.; nicht bestimmt.

Zelladhäsionstyp (Literatur)	Zelltyp und Gewebe	Assoziierte Filamente	Transmembran- Proteine	Plaques-Proteine (bisher nachgewiesen)
Desmosom (DES) <i>Macula adhaerens</i>	Epithelien, Myocardium, Arachnoidea, dendritisches Reticulum	Intermediär- filamente	Desmosomale Cadherine: Desmocolline (Dsc 1-3) Desmogleine (Dsg 1-3)	Plakoglobin Desmoplakin I und II Plakophilin (1a, 1b, 2a, 2b, 3)
„Adherens Junction“ (AJ) <i>Zonula/Fascia/ Punctum adhaerens</i>	Epithelien, Endothelien, Myocardium, verschiedene mesenchymal abgeleitete Zelltypen	Mikrofilamente	Klassische Cadherine (z.B. E-, N-, VE-, P- oder R-Cadherin) Nectin	Plakoglobin α -Catenin, β -Catenin Protein p120 ^{ctn} Protein ARVCF Protein p0071 Vinculin α -Actinin Afadin Ponsin
Complexus adhaerens (Schmelz und Franke, 1993; Franke et al., 1994)	Lymphknoten- Sinus- Rethotel, Lymphgefäß- Endothel	n.b.	VE-Cadherin	Plakoglobin α -Catenin β -Catenin Protein p120 ^{ctn} Desmoplakin Afadin Protein ZO-1
Contactus adhaerens (Rose et al., 1995; Bahjaoui- Bouhaddi et al., 1997; Hollnagel et al., 2002)	Cerebellum (Neuriten der Körnerzellen in den Glomeruli)	n.b.	M-Cadherin N-Cadherin	Plakoglobin α -Catenin β -Catenin
Zona limitans externa (Paffenholz et al., 1999)	Retina	Mikrofilamente	N-Cadherin	Neurojungin α -Catenin β -Catenin Plakophilin 2 Vinculin α -Actinin Protein ZO-1 Symplekin
Cortex adhaerens (Straub et al., 2003)	Augenlinse	Mikrofilamente	Cadherin-11 N-Cadherin n.b.	α -Catenin β -Catenin Plakoglobin Vinculin Protein p120 ^{ctn} Ezrin Periaxin Periplakin Desmoyokin
Area composita (Borrmann et al., 2000)	Cardio- myocyten, Purkinje- Fasern	Mikrofilamente	N-Cadherin Cadherin-11 Desmoglein 2 Desmocollin 2	Plakoglobin α -Catenin β -Catenin Protein ARVCF Desmoplakin I Plakophilin 2 Vinculin

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Während die Zell-Zell-Verbindungen in Epithelien und einigen anderen, relativ fest gefügten Geweben wie z.B. dem Myokard recht gut untersucht sind, müssen die Zellverbindungs-Typen des mesenchymalen Bereiches als noch weitgehend unbekannt – vor allem molekularbiologisch - angesehen werden. Das gilt für Säugetiere, bei denen bestimmte Strukturen mit Namen belegt sind, die allein schon das Defizit an Information und die Unsicherheit in der Ansprache deutlich werden lassen wie z.B. „Desmosome-like junctions“, „Attenuated desmosomes“, „Nascent desmosomes“, „Primitive cell junctions“ usw. (e.g. Erlandson, 1981; Ghadially, 1988; Dickersin, 2000). Es ist offensichtlich, dass – auch nach teilweiser immunhistochemischer Analyse – diese Strukturen keiner der bisher beschriebenen Kategorien von *Adhaerens*-Verbindungen (**Tab. 2**) zugeordnet werden können.

Das gilt aber noch viel mehr für viele der interzellulären „Junctions“ in niederen Vertebraten und Invertebraten, einschließlich solch elektronenmikroskopisch spektakulärer Strukturen wie den Adhärenz-Verbindungen des Endothels der *Rete mirabile*-Gefäße der Schwimmblase vieler Fische oder den besonderen, mit auffällig dicken Plaques versehenen „Junctions“ zwischen den Glia-Äquivalenten der Nervenscheiden des Bauchmarkstrangs bestimmter Polychaeten (z.B. Fawcett, 1981) oder den Glia- bzw. Glia-Neuron Strukturen von Mollusken und Arthropoden (Übersicht bei Lane, 1981; Trehene, 1981). Im Grunde müssen die meisten Zell-Zell-Verbindungen zwischen den nicht-Epithelzellen aller niedrigen Arten derzeit noch als molekular unklar angesehen werden. Das gilt vor allem auch für die Invertebraten bis hinunter zu den Myonemen – und Neuriten-Strukturen der Hydrozoen und sogar bestimmten Zell-Zell-Assoziationen von Nicht-Metazoen wie z.B. bestimmten Schleimpilzen, etwa *Dictyostelium*, die bemerkenswerter Weise durchaus typische Adhärenzverbindungsproteine – etwa β -Catenin-Homologe – enthalten können (z.B. Hydra: Hobmayer et al., 1996; vgl. plaque-tragende „Junction“-artige Hydrozoen-Strukturen bei Davis, 1973; Hausmann, 1973. Weitere Angaben für Invertebraten bei Lane, 1981; Green, 1984; Lamb et al., 1997).

Das vorsprüngliche Ziel dieser Arbeit war daher, bisher unbekannte Arten von Zell-Zell-Verbindungen mesenchymal abgeleiteten Zellen, sei es in gesunden Geweben, sei es in Tumoren, biochemisch-molekularbiologisch wie strukturell zu charakterisieren, auch in evolutiven Homologie bzw. Analogien. Da jedoch in orientierenden Vorversuchen in Zellkulturen gleich zwei bedeutende neuartige Zellverbindungsarten des Menschen entdeckt

wurden, konzentrierten sich die Experimente sehr bald auf die Aufklärung dieser Adhärenz-Strukturen.

2 MATERIAL

2.1 Zellkulturlinien und primäre Zellkulturen

Alle benutzten Zellkulturen wurden gehalten und passagiert, wie vom Hersteller bzw. in der Referenzliteratur angegeben. In der Regel wurden die Medien und Zusätze der Firmen Biochrom (Berlin), Gibco (Heidelberg) und Serva (Heidelberg) verwendet. Die Passagierung erfolgte alle 3-4 Tage, sofern nicht anders angegeben, wobei die Zellen 10 sec mit EDTA (0,7% in PBS) gespült, 2-3 min mit Trypsin (0,25% in PBS) behandelt und anschließend in frischem Medium in eine neue Kulturschale übertragen wurden.

2.1.1 Humane Zellkulturlinien

Soweit in den jeweiligen Literaturzitierten nicht anders angegeben, wurden die Zellen jeweils ursprünglich von der „American Type Culture Collection“ (ATCC; Manassas, VA, USA), der „European Collection of Cell Cultures“ (ECACC; Porton Down, Salisbury, Wiltshire, UK) oder der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ; Braunschweig) erhalten.

U333/MG Glioma	Astrocytomzellen (Osborn et al., 1981; Achtstaetter et al., 1986)
U87MG	Zellen aus einem Glioblastoma multiforme, Grad III (ECACC-89081402; Pontén und Macintyre, 1968)
U138MG	Zellen aus einem Glioblastoma multiforme, Grad III (DSMZ-ACC291; Pontén und Macintyre, 1968)
U373MG	Zellen aus einem Glioblastoma multiforme, Grad III (EACC-89081403; de Ridder et al., 1987)
T98G	Zellen aus einem Glioblastoma multiforme (ATCC-CRL-1690; Stein, 1979)
A172	Zellen aus einem Glioblastoma multiforme (freundliche Gabe von Dr. György Vereb, Universität Debrecen, Ungarn)
Caco-2	Zellen aus einem Colon-Adenocarcinom (ATCC-HTB-37; Fogh et al., 1977)

HaCaT	Permanente Kulturlinie von - nicht maligne transformierten - Keratinocyten (Boukamp et al., 1988)
MCF-7	Zellen eines Adenocarcinoms der Mamma (ATCC-HTB-22; Soule et al., 1973)
PLC	Zellen eines hepatozellulären Carcinoms (ATCC CRL-8024; Alexander et al., 1976)
RD	Zellen aus einem Rhabdomyosarkom (ATCC-CLL-136)
SV80	SV40-transformierte Fibroblasten (Franke et al., 1979)
HepG2	Zellen aus einem hepatozellulären Carcinom (ATCC-HB-8065; Knowles et al., 1980)
SkHep1	Zellen aus einem hepatozellulären Carcinom (ATCC-HTB-52; Fogh et al., 1977)
A431	Zellen aus einem Plattenepithelcarcinom der Vulva (ATCC-CRL-1555; Fabricant et al., 1977)
A431-A1B2	Eine permanente A431-Sublinie, stabil transfiziert mit Neurojungin-cDNA (Paffenholz et al., 1999)
HT29	Zellen aus einem Colon-Adenocarcinom (ATCC-HTB-38)

2.1.2 Humane primäre Zellkulturen

HUVEC	Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (Angaben zur Herstellung unter 3.1.1; vgl. Jaffe et al., 1973; vgl. Peitsch et al., 1999)
MSC	Mesenchymale Stammzell-Kulturen aus dem Knochenmark/ bzw. Nabelschnurblut von freiwilligen Spendern (Angaben zur Herstellung unter 3.1.3; Pittenger et al., 1999)

2.1.3 Nichthumane Zellkulturlinien

CPAE	Pulmonalarterien-Endothelzellen des Kalbs (ATCC-CLL209; Ryan et al., 1978)
C6	Gliomzellen aus der Ratte (ECACC-92090409; Benda et al., 1968)

2.1.4 Nichthumane primäre Zellkulturen

Maus-Astrocyten Primärkultur von Astrocyten präpariert von neugeborenen BALB/c Maus-Gehirne (Angaben zur Herstellung unter 3.1.2.; vgl. Burudi et al., 1999)

Maus-Mikroglia-Zellen

Primärkultur von Mikroglia-Zellen präpariert von neugeborenen BALB/c Maus-Gehirnen. Diese Maus-Zellkulturen wurden freundlicherweise von Dr. Anne Régnier-Vigouroux zur Verfügung gestellt (zur Methodik vgl. auch Burudi et al., 1999; Gresser et al., 2001).

2.2 Gewebe

Menschliche Gewebe, nach medizinischer Indikation entnommen, wurden von Herrn Prof. Dr. György Csécsi[†] und Dr. Àlmos Klekner (Institut für Neurochirurgie, Universität Debrecen, Ungarn), Prof. Dr. Zoltán Nemes (Institut für Pathologie, Universität Debrecen, Ungarn) und Prof. Dr. Markku Miettinen (Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC, USA) zur Verfügung gestellt. Rindergewebe stammten von frisch geschlachteten Tieren aus dem Mannheimer Schlachthof. Die Gewebeproben wurden sofort nach der Entnahme 1-2 min lang in Isopentan, das in flüssigem Stickstoff auf ca. -130°C vorgekühlt worden war, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3 Antikörper

2.3.1 Primärantikörper

In der vorliegenden Arbeit wurden die in **Tabelle 3** beschriebenen Antikörper verwendet.

Tab. 3. Verwendete Primärantikörper

Antigen	Antikörper (Klon)	Quelle und Referenzen	
<u>Cadherine</u>			
N-Cadherin	a) mAk, m	Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA	
	b) pA, rb	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	
	c) mAk, m (A-CAM)	Freundliche Gabe von Prof. Dr. B. Geiger, Weizmann Institute, Rehovot, Israel	
VE-Cadherin	a) mAk, m (BV9)	Freundliche Gabe von Prof. Dr. E. Dejana, Universität Mailand, Italien	
	b) mAk, m	Transduction Laboratories	
	c) pA, rb	Alexis Biochemicals, Grünberg	
	d) pA, Ratte	Transduction Laboratories	
	e) pA, gt	Serotec, Oxford, UK	
R-Cadherin	mAk, m	BD Biosciences, San Jose, CA, USA	
M-Cadherin	mAk, gt	RDI (Research Diagnostics, INC), Flanders, NJ, USA	
Cadherin-11	a) mAk, m	Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, USA	
	b) pA, rb		
E-Cadherin	mAk, m	Transduction Laboratories	
P-Cadherin	mAk, m		
T-Cadherin	pA, rb		
Cadherin-8	pA, gt		Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
LI-Cadherin	pA, gt		
OB-Cadherin-2	pA, gt		
Cadherin-6	mAk, m	US Biologicals, Swampscott, MA, USA	
Desmoglein 1-2	mAk, m (DG 3.10)	Progen Biotechnik (Progen), Heidelberg	
Desmocollin 1-3	pA, rb	Natutec, Frankfurt/M	
Desmocollin-1	mAk, m (U100)	Progen; Nuber et al., 1995; 1996	
Desmocollin-2	pA, rb	Natutec	
Desmocollin-3	mAk, m (U114)	Progen; Nuber et al., 1996	
<u>Arm-repeat Proteine</u>			
Plakoglobin	a) mAk, m (11E4)	Freundliche Gabe von Prof. Dr. M. J. Wheelock, Universität von Nebraska, Omaha, NE, USA	
	b) mAk, m (PG 5.1)	Progen; Cowin et al., 1986	
β-Catenin	a) pA, rb	Sigma, St Louis, MO, USA	
	b) mAk, m	Transduction Laboratories	
Protein p120 ^{ctn}	mAk, m		
Protein ARVCF	pA, gp (3Xh)	**	
Plakophilin 1 (PKP 1)	mAk, m (5C2)	Progen	Heid et al., 1994
Plakophilin 2 (PKP 2)	mAk, m (CM150)		Mertens et al., 1996
Plakophilin 3 (PKP 3)	mAk, m (270.6.2)		Schmidt et al., 1999
Neurojungin	mAk, m (J19)		Paffenholz et al., 1999
Protein p0071	mAk, m (6D-1-10)	Freundliche Gabe von Prof. Dr. M. Hatzfeld, Universität Halle/Halle/Saale ; vgl. Hatzfeld et al., 2003	

<u>Weitere Plaque-Proteine</u>		
α -Catenin	a) pA, rb	Sigma
	b) mAk, m	Transduction Laboratories
Desmoplakin (DP)	a) pA, rb	Natutec
	b) mAk, m, DP I&II (2.15, 2.17, 2.20)	Progen; Cowin et al., 1985
Desmoyokin/AHNAK	pA, rb	Freundliche Gabe von Prof. Dr. T. Hashimoto, Keio University of Medicine, Tokyo, Japan; Hashimoto et al., 1993
Vinculin	mAk, m (vin 11-5)	Sigma
α -Actinin	mAk, m	
<u>Nectin-Afadin-Ponsin Complex</u>		
Nectin 2 (PRR-2)	mAk, m	Diaclone, Besancon, France
Ponsin (Anti-Maus)	pA, rb	Zymed
l-Afadin	pA, rb	Sigma
l/s-Afadin	pA, rb	
<u>Transmembrane TJ Proteine</u>		
Claudin-1-5	pA, rb	Zymed
Occludin	a) mAk, m	
	b) pA, rb	
JAM-1	mAk, m	Transduction Laboratories
<u>ZO-Proteine mit PDZ-Domain</u>		
ZO-1	pA, rb	Zymed
ZO-2	pA, rb	
<u>ZO-Proteine ohne PDZ-Domain</u>		
Symplekin	mAk, m (E150)	Progen; Keon et al., 1996
Cingulin	a) pA, rb	Freundliche Gabe von Prof. Dr. Sandra Citi, Universität von Genf, Genf, Schweiz
	b) mAk, m (139.3.4.)	Progen; Langbein et al., 2002
<u>Intermediärfilamente</u>		
Vimentin	mAk, m (3B4)	Progen; Herrmann et al., 1989
„Glial fibrillary protein“ (GFAP)	a) mAk, m (GF12.24)	Roche Diagnostics, Mannheim
	b) pA, rb	Dianova, Hamburg
Nestin	mAk, m	Santa Cruz Biotechnology
Desmin	mAk, m	DAKO, Hamburg
Pan-Cytokeratin	mAk (Lu-5)	Dianova, Hamburg; Franke et al., 1987
Cytokeratin-19	mAk, m (z105.6)	Progen
Neurofilament	mAk, m	Diaclone
<u>Endotheliale Marker</u>		
Factor VIII	pA, rb	Natutec
Von-Willebrand-Factor	a) pA, Schaf	Serotec, via Biozol, Eching
	b) mAk, m	DAKO

Sonstige		
Syndecan-1	a) pA, rb	Zymed
	b) mAk, m (BB4)	RDI/Chemicon International, Hofheim
	c) mAk, Ratte (anti-Maus)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
	d) mAk, m	Santa Cruz Biotechnology
	e) pA, gt	
	f) mAk, m (2E9; anti-Syndecan-1 & -3)	Freundliche Gabe von Prof. Dr. G. David, Laboratory for Glycobiology and Developmental Genetics, Center for Human Genetics, Universität Leuven, Leuven, Belgien; Lories et al., 1989
	g) pAs, gp (1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B)	* Eigene Herstellung
Syndecan-2	pA, rb	Zymed
Syndecan-3	pA, rb	
Syndecan-4	pA, rb	
Syntenin	pA, rb	Synaptic Systems, Göttingen
ICAM-1, -2, -3	mAk-n, m	Chemicon International
L-Selectin	mAk, m	
CD44	a) mAk, m (Hermes 3)	Freundliche Gabe von Prof. Dr. H. Ponta, Institut für Toxikologie und Genetik, Forschungszentrum Karlsruhe; vgl. Jalkanen et al., 1987
	b) mAk, Ratte	Chemicon
	c) mAk, m	R&D Systems, Wiesbaden
	d) pA, rb	Freundliche Gabe von Prof. Dr. Margot Zöller, DKFZ, Heidelberg
Drebrin	mAk, m (M2F6)	MoBiTec, Göttingen
Ezrin	mAk, m	Sigma
Merlin/NF2	pA, rb	Santa Cruz Biotechnology
Moesin	mAk, m	Transduction Laboratories
Myosin	pA, rb	Bio Trend, Köln
Actin	mAk, m	Sigma
Sarkomeren-Actin	mAk, m	
Glattmuskel-Actin/ SMA	mAk, m (1A4)	Progen
Connexin 43	pA, rb	Zymed
Perilipin	pA, gp	Progen; Heid et al., 1996, 1998
Adipophilin	mAk, m (AP125)	Progen

****Herstellung polyclonaler Meerschweinchen-Antiseren gegen Syndecan-1**

Die Proteinsequenz von Syndecan-1 wurde aus dem Programm „Pubmed“ abgerufen (**Schema 3**), auf hydrophile Stellen untersucht und mit Sequenzen anderer relevanten Proteine (Syndecan-2-4 und andere „Junction“-Proteine; Programm „HUSAR“; DKFZ) verglichen. Es wurden Peptide ausgesucht, die die geringste Wahrscheinlichkeit hatten, dass der eventuell erzielte Antikörper mit anderen Proteinen kreuzreagiert. Peptide aus der humanen Syndecan-1

Aminosäure (AS)-Sequenz (AS Positionen 18-32: QPALPQIVATNLPPEC; AS Positionen 231-249: QSPVDQGATGASQGLLDRC; AS Positionen 291-302: CKQANGGAYQK) wurden von Herrn Dr. Hans-Richard Rackwitz (Peptide Speciality Laboratory, Heidelberg) hergestellt und an „Keyhole Limpet Hemocyanin“ (KLH) konjugiert.

```

1 mrraalwllwl calalslgpa lpqivatnlp pedqdgsgdd sdnfsgsgag alqditlsqq
61 tpstwkdtql ltaiptspep tgleataast stlpagegpk egeavvlpev epgltareqe
121 atrprettq lptthqastt tattagepat shphrdmqqg hhetstpagg sqadlhtpht
181 edggpsater aaedgassql paaegsggeqd ftfetsgent avvavepdrn nqspvdqgat
241 gasqglldrk evlggviavg lvglifavcl vgfmlyrmkk kdegysylee pkqanggayq
301 kptkqeefya

```

Schema 3. Proteinsequenz des humanen Syndecan-1. N-Glycosylierungstellen (blau), O-Glycosylierungsstellen (rot) und die Transmembran-Domäne (gelb) sind farbig unterlegt. Peptid 1, Peptid 2 und Peptid 3 sind in dieser Reihenfolge unterstrichen.

Pro Peptid wurden zwei Meerschweinchen je viermal, in Abständen von je 3 Wochen immunisiert. Die Peptide wurden mit Freundschem Adjuvans (bei der ersten Immunisierung komplett, bei den folgenden Immunisierungen inkomplett) gründlich gemischt und subcutan injiziert. 10 Tage nach der vierten Injektion wurden die Tiere in Isofluran-Narkose durch Herzpunktion entblutet. Das Blut liess man über Nacht bei 4°C gerinnen. Nach 30 min Zentrifugation bei 3500 U/min wurde das Serum abgetrennt, mit 0,2% Natriumazid versetzt, aliquotiert und bei -80°C aufgehoben.

**Antikörper gegen das ARVCF Protein wurden freundlicherweise von Priv.-Doz. Dr. Ilse Hofmann zur Verfügung gestellt. Dazu waren Meerschweinchen mit einem Gemisch von drei Peptiden (an KLH gekoppelt; Peptide Speciality Laboratory) immunisiert worden, die den folgenden Positionen des menschlichen ARVCF-Proteins entsprachen: AS Positionen 242-255: PGPPGGRSLPERFQ; AS Positionen 260-273: GLEDDTRS LAADDE; AS Positionen 424-437: LRNLSYGRD TDNKA.

2.3.2 Sekundärantikörper

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden in Ziegen hergestellte Sekundärantikörper verwendet, die gegen Spezies-spezifische Immunglobuline gerichtet und mit Fluorochrom-Farbstoffen Cy2, Cy3 oder Texas Red gekoppelt waren (Dianova, Hamburg). Zusätzlich wurden Alexa-488 oder Alexa-568 gekoppelte Sekundärantikörper gegen Maus-, Kaninchen-, oder Meerschweinchen-Immunglobuline (MoBiTec) benutzt.

Für Immunblot-Analysen wurden an HRP („Horseradish Peroxidase“, Meerrettich-Peroxidase) gekoppelte spezies-spezifische Sekundärantikörper (Dianova) in Kombination mit dem „Enhanced Chemiluminescence“ (ECL)-System (Amersham, Braunschweig) verwendet. In der Immunhistochemie wurden HRP-konjugierte spezies-spezifische Sekundärantikörper (DAKO) verwendet.

2.4 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien (Analysequalität) wurden von den Firmen Roche Diagnostics (Mannheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) bzw. Sigma (München) bezogen.

2.5 Puffer, Medien und Lösungen

10x PBS:	1,4 M NaCl 27 mM KCl 17 mM KH ₂ PO ₄ 81 mM Na ₂ HPO ₄	pH 7,4
10x TBST:	0,1 M Tris-HCl 1,5 M NaCl 1% (w/v) Tween 20	pH 8,0
2x SDS-Probenpuffer:	250 mM Tris-HCl 20% (v/v) Glycerol 10% (w/v) SDS 40 mM DTT 0,2% (w/v) Bromphenolblau	pH 6,8
Elektrophoresepuffer:	0,092 M Tris-HCl 0,76 M Glycin 0,2% (w/v) SDS	pH 8,8
Transferpuffer (Borat-Puffer):	20 mM Borsäure	pH 8,8

	1 mM EDTA	
„Stripping“-Puffer:	6,25 mM Tris-HCl 20 mM DTT 2% (v/v) SDS	pH 6,7
Immunpräzipitationspuffer:	20 mM HEPES 150 mM NaCl 1% Triton-X-100 0,5 mM CaCl ₂	pH 7,6
Pro 10 ml Puffer wurde 1 Tablette “Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail” (Boehringer, Mannheim) zugegeben.		
“Low Salt“-Puffer:	10 mM Tris-HCl 140 mM NaCl 5 mM EDTA 1% Triton-X-100	pH 7,6
“High Salt“-Puffer:	10 mM Tris-HCl 140 mM NaCl 5 mM EDTA 1,5 mM KCl 0,5 % Triton-X-100	pH 7,6
DNA-Probenpuffer:	100 mM Tris-HCl 200 mM EDTA 7,5 % (w/v) SDS 30% (w/v) Ficoll 0,01% (w/v) Bromphenolblau 0,01% (w/v) Xylencyanol	pH 7,5
10x TAE-Puffer:	40 mM Tris-HCl 0,12 % Essigsäure 1 mM EDTA	pH 8,0
Zitratpuffer:		
- Stammlösung A:	0,1 M Zitronensäuremonohydrat	pH 6,0
- Stammlösung B:	0,1 M Natriumzitat	pH 6,0
18 ml Stammlsg. A und 82 ml Stammlsg. B mit destilliertem Wasser ad 1l		
10x EDTA-Puffer:	1 mM EDTA	pH 8,0
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA	pH 7,5
10x RT-Puffer:	0,4 M Tris-HCl 0,4 M KCl 60 mM MgCl 10 mM DTT 10 mM dNTP (84x)	pH 8,0

Kollagenase-Lösung 0,003 % (w/v) CLS 3 (180 U/ml) in PBS
(Worthington Biochemical Cooperation; bezogen von
Pan Systems, Aidenbach)

2.6 Geräte

Brutschränke	Nabco und Forma Scientific, Labotect, Göttingen
Elektronenmikroskop EM900	Zeiss-Leo, Oberkochen
Entwicklermaschine	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Schwarzweißfilm: Agfa Pan 25	Agfa-Gevaert
Polaroid 677	Polaroid, Offenbach
Gelkammern	Cti, Idstein/Taunus
Gelschüttler	Landgraf, Hannover
Heizblock Typ 5302	Eppendorf, Hamburg
Immunblot-Kammern	Cti
Kryotom „Frigocut“ Mod 2700	Reichert-Jung, Nussloc
Leuchtplatte	Roth, Karlsruhe
Magnetrührer	Ika Conbimag, Staufen
Netzgerät Phero-stab 500	Biotec Fischer, West Perth WA, Australia
PCR Mini-Cycler	MJR Research, Biozyme, Oldendorf
RHS-1 Histoprocessor	Milestone/Diapath, München
Rotationsmikrotom	Mikrom, Walldorf
Schüttler: „Silent Rocker“	Cti
Tischzentrifugen	Beckman Instruments, München Heraeus Instruments, Hanau
Ultra-Turrax T25	Jahnke & Kunkel, Staufen
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbäder	Braun, Melsungen
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel

2.7 Verwendete Kits

ECL Kit (NEN, Dreieich); Qiagen RNeasy Mini Kit; Qiaex Agarose Gel Extraction Kit; Qiaquick PCR-Purification-Kit (alle von Qiagen, Hilden).

3 METHODEN

3.1 Zellkultur

3.1.1 Primärkulturen von Endothelzellen

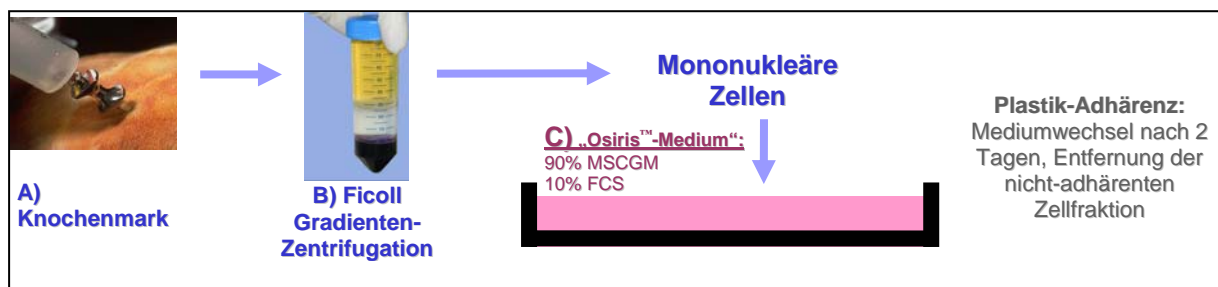
Primäre Kulturen von Endothelzellen (HUVEC) wurden von Zellen aus menschlichen Nabelschnurvenen hergestellt (St. Elisabeth Krankenhaus, Heidelberg). Die Nabelschnüre wurden gekühlt in PBS transportiert. Die Präparation erfolgte nach Jaffe et al. (1973), modifiziert nach Peitsch et al. (1999). Dazu wurden die Enden der Nabelschnüre abgeschnitten (etwa 1 cm). In die Nabelschnurvene wurde dann eine Knopfkanüle eingeführt, durch die die Vene erst mit etwa 50 ml PBS bei 37°C gespült und dann mit einer Kollagenase-Lösung gefüllt wurde. Nach einer Inkubationszeit von ca. 20 min bei 37°C wurden die abgelösten und suspendierten Zellen in Medium 199 mit 20% NCS (Gibco, Life Technologies, Karlsruhe; ergänzt mit 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 0,625 mg/ml Fungizone, 100 µg/ml ECGS und 100 µg/ml Heparin) aufgenommen und die Nabelschnurvene mit ca. 50 ml PBS nachgespült. Die gesammelten Zellen wurden 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert und in frischem Medium 199 aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in Zellkulturschalen, die vorher 1 h mit 1% Gelatine beschichtet worden waren, übertragen und bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle zwei Tage gewechselt, um restliche Erythrocyten und Zellreste zu entfernen. Nach der Bildung eines dichten Zellrasens (2-3 Tage) wurde die Kultur passagiert. Dazu wurden die Zellen nach Abnahme des Mediums ca. 10 sec mit EDTA (0,7 mM in PBS) gespült, 2-3 min mit einer Trypsin-Lösung (0,06% w/v in PBS) behandelt und in eine Kulturschale mit frischem Medium übertragen, um Sekundärkulturen zu erhalten.

3.1.2 Primäre Astrocyten-Kulturen von BALB/c Mäusen

Primäre Astrocyten-Kulturen wurden freundlicherweise von Dr. Anne Régnier-Vigouroux (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Astrocyten waren dazu aus den Gehirnen neugeborener BALB/c Mäuse präpariert worden (vgl. Burudi et al., 1999), in Kultur gebracht und wurden 7-10 Tage nach der letzten Passage in konfluenten Zustand für die Untersuchungen verwendet. Die Kulturen waren 95-98% rein, und die Reinheit wurde ständig kontrolliert (Gresser et al., 2001).

3.1.3 Primäre humane Mesenchymale Stammzell (MSC)-Kulturen

Primäre MSC-Kulturen wurden von Herrn Dr. Patrick Wuchter (Medizinische Klinik und Poliklinik, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. MSC wurden aus Knochenmark-Aspiraten von jeweils vier gesunden Spendern (MSC-142, -179, -185 und -209) präpariert. Alternativ wurden MSC aus Nabelschnurblut präpariert. Die Zellen wurden in „Mesenchymal Stem Cell Growth Medium“ (MSCGM, Osiris Therapeutics, Baltimore, MD, USA; bezogen über Cambrex Bioscience, Inc., Baltimore, MD, USA) gehalten. Mononukleäre Zellen wurden mittels einer Ficoll Gradienten-Zentrifugation isoliert und in Zellkultur-Gefäßen kultiviert (**Schema 4**). Die Zellen wurden durch Reaktionen mit 12 Antikörpern FACS-charakterisiert: Zellen waren negativ mit CD34, CD38, CD45 und HLA-DR (hämatopoetische Marker) und positiv mit CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166. Für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie-Untersuchungen ließ man die Zellen auf „Permanox Chamberslides“ (Nalge Nunc; Naperville, IL, USA) anwachsen.



Schema 4. Präparation von humanen Mesenchymalen Stammzellen. (A) Knochenmark-Aspiration von gesunden Spendern. (B) Isolation mononukleärer Zellen mittels Ficoll Gradienten-Zentrifugation. (C) Kultivierung in „Osiris Medium“ und Selektion der adhärenenten Zellen.

3.1.4 Klonierung von Zellen

Zur Klonierung wurden die Zellen unter Verwendung einer Trypsin-Lösung abgelöst und in hoher Verdünnung auf „Mikrotiter Platten“ (siehe Knapp und Franke, 1989; Knapp et al., 1989) transferiert. Löcher mit nur einer einzigen Zelle wurden für die weitere Kultivierung ausgesucht.

3.2 Lichtmikroskopie

Immunfluoreszenzmikroskopie und andere Methoden der Immunhistochemie dienen zur spezifischen Lokalisierung von Proteinen in Kulturzellen und Geweben. Dabei werden die Präparate meist mit einem für das nachzuweisende Protein spezifischen Primärantikörper und - nach Waschsritten - anschließend mit Sekundärantikörpern inkubiert. Die Sekundärantikörper sind gegen Immunglobuline der Spezies, in welcher die Primärantikörper erzeugt worden waren, gerichtet und an ein Erkennungsreagenz (Fluoreszenzfarbstoff oder ein Enzym wie z.B. HRP oder Alkalische Phosphatase) gekoppelt.

3.2.1 Fixierung von Kulturzellen

Vor der Inkubation mit Antikörpern war eine Fixierung der Kulturzellen erforderlich, wobei die folgenden Methoden verwendet wurden.

3.2.1.1 Methanol/Aceton-Fixierung

Die Methanol/Aceton-Fixierung ist schnell und einfach durchzuführen. Die Strukturhaltung der Zellen ist jedoch nicht immer optimal. Die auf Deckgläschen gewachsenen Zellen wurden dazu kurz mit auf 37°C vorgewärmtem PBS-Puffer gewaschen. Die Fixierung erfolgte zunächst 5 min bei -20°C in Methanol, dann 30 sec bei -20°C in Aceton. Anschließend wurden die Zellen luftgetrocknet.

3.2.1.2 Formaldehyd-Fixierung

Die Formaldehyd-Fixierung sichert im Vergleich zur Methanol/Aceton-Fixierung meist eine bessere Strukturhaltung der Zellen, allerdings muss häufig ein Verlust an Zugänglichkeit der Antigene in Kauf genommen werden. Zur Fixierung wurden die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen kurz in PBS bei 37°C gewaschen und anschließend 5 min in Formaldehyd-Lösung (2% in PBS) bei RT inkubiert. Freie Aldehydgruppen wurden durch eine 5 min Inkubation in 50 mM NH₄Cl in PBS-Puffer abgesättigt. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen 3-5 min mit 0,1% Triton-X-100 oder 0,1% Saponin (beides in PBS) permeabilisiert und nach nochmaligem Waschen in PBS ohne Trocknen weiterverwendet.

3.2.2 Herstellung und Fixierung von Kryostatschnitten

Von tiefgefrorenen Geweben wurden mit einem Kryomikrotom (Leica, Wien, Österreich) 4-5 µm dicke Schnitte hergestellt. Die Schnitte wurden mindestens 1 h lang luftgetrocknet und danach 10 min bei -20°C in Aceton fixiert und anschließend luftgetrocknet.

3.2.3 Färbung mit Methylenblau

Zur histologischen Betrachtung und Kontrolle der Gewebeschnitte wurde eine Methylenblau-Färbung durchgeführt. Dazu wurde der auf dem Objektträger aufgezogene Schnitt kurz in eine 0,5%-ige Methylenblau-Lösung getaucht, mit Wasser gespült und luftgetrocknet.

3.3 Antigen-Freilegung („Antigen Retrieval“) durch Mikrowellenbehandlung von Gewebeschnitten

3.3.1 Herstellung und Fixierung von Gewebeschnitten von in Paraffin eingebetteten Gewebe

Frisches menschliches Tumor- oder Gewebematerial zur Kryokonservierung ist oftmals nicht verfügbar. Deshalb ist es besonders wichtig, auch fixiertes Gewebematerial aus Paraffinblöckchen untersuchen zu können.

Durch Formalinfixierung und Paraffineinbettung werden viele Antigenstrukturen maskiert. Mit der Methode des „Antigen Retrieval“ können maskierte Strukturen häufig wieder für entsprechende Antikörper zugänglich gemacht werden.

Paraffinblöcke von menschlichem Nerven- und Gehirntumor-Gewebe stellten die Pathologischen Institute der Universitätsklinik Debrecen, Ungarn und des Armed Forces Institute of Pathology (Washington, DC, USA) zur Verfügung. Die Gewebeproben wurden 24-72 Stunden in Formaldehyd-Lösung (4 %) fixiert und dann in Paraffin eingebettet. Von den Paraffinblöckchen wurden mit einem Mikrotom (Rotationsmikrotom HM 355 S mit „Cool Cut“ und Schnitt-Transfersystem STS, Mikrom, Walldorf) ca. 5 µm dicke Schnitte hergestellt. Diese wurden über Nacht bei 37°C getrocknet und in einer absteigenden „Alkoholreihe“ entparaffiniert: 100% Xylol, zweimal 100% Ethanol und je einmal 95%, 80%, 70%, 50% Ethanol, jeweils 3 min. Anschließend wurden die Schnitte kurz in destilliertem Wasser gespült und weiterverarbeitet.

Die Mikrowellen-Behandlung in einer speziellen Mikrowelle (Mikromed T/T MEGA mit GPR-120 Histomodul, Mikrom, Walldorf) erfolgte mit den folgenden Variationen: Die Schnitte wurden bei 120°C 5 min oder 120°C 10 min oder 100°C 5 min in 0,01 M Zitratpuffer oder 0,1 M Tris-HCl (pH 9,5) mit 5% (w/w) Harnstoff oder EDTA-Puffer inkubiert und anschließend mindestens 15 min abgekühlt.

Dann wurden die Schnitte kurz in PBS gespült, in einer feuchten Kammer 10 min mit 2% Milchpulver in PBS equilibriert und anschließend 15 min mit 10% Ziegen Serum in 2% Milchpulver (in PBS) absorbiert. Die Schnitte wurden dann mittels Immunfluoreszenz- oder Immunperoxidase-Technik weiterbehandelt.

3.4 Fluoreszenzmikroskopie

3.4.1 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Immunfluoreszenz wurden die zu untersuchenden Kulturzellen und Gewebe mit einer der oben beschriebenen Methoden fixiert. Alternativ wurden auch entparaffinierte Gewebeschnitte nach Mikrowellen-Behandlung eingesetzt. In Abhängigkeit von den verwendeten Primärantikörpern bzw. zu untersuchenden Zellstrukturen wurden einige der fixierten Zellen und Gewebe zunächst 3-5 min in 0,1% Triton-X-100 in PBS-Puffer permeabilisiert, um Antigene besser zugänglich zu machen. Die Inkubationszeit der Schnitte mit dem jeweiligen Primärantikörper betrug in der Regel 45 min in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Deckgläschen oder Objektträger diesmal je 3x5 min durch Abspülen mit PBS gewaschen. Die Sekundärantikörper wurden für Einzelfluoreszenz-Versuche 1:500 (Cy3), 1:200 (Cy2 und Texas Red) oder 1:150 (Alexa 488) verdünnt und vor der Applikation in der Regel 10 min lang bei 13000 U/min zentrifugiert, um die nicht an Antikörpern gebundenen Farbstoff-Partikel zu entfernen. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verwendet. Nach 30 min Inkubation folgten drei Waschschrte (je 5 min) in PBS, gefolgt von einem kurzen Spülen in destilliertem Wasser. Dann wurden die Präparate 1 min in Ethanol entwässert. Die mit Zellen bewachsene Seite der Deckgläschen wurde mit einem Tropfen Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA) auf einen Objektträger geklebt. Nach der Erhärtung des Einbettmittels (mindestens 1 h) konnten die Präparate mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot II; Carl Zeiss, Oberkochen) ausgewertet werden. Die Fotodokumentation erfolgte mit Tmax400pro Filmen (Kodak).

Für Doppel-Immunlokalisierungen wurden Primär- und Sekundärantikörper unmittelbar vor der Anwendung in doppelter Konzentration angesetzt und gemischt (meist 1:1).

3.4.2 Fluoreszenzmikroskopie mit anderen Reagenzien

Phalloidin ist ein Toxin von *Amanita phalloides*, welches spezifisch F-Actin bindet (Löw und Wieland, 1974), so dass damit Actin-Filamentbündel in permeabilisierten Zellen dargestellt werden können. Phalloidin kann mit fluoreszierenden Farbstoffen (z.B. Alexa-488, -594 oder Cy3) gekoppelt und so direkt in der Immunfluoreszenzmikroskopie, oder mit Antikörpern zusammen in der Doppelfluoreszenzmikroskopie, verwendet werden (vgl. z.B. Wulf et al., 1979).

DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenyl-Indol; Serva, Heidelberg) ist ein DNA-spezifischer Fluoreszenzfarbstoff, welcher die Chromosomen bzw. die Zellkerne blau anfärbt. Gelegentlich wurden während der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie in den letzten 5 min der Inkubation 30 µl DAPI (1:10000) den Sekundärantikörpern zugegeben, um den Kern anzufärben.

3.5 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (LSM)

Konfokale Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskopie ermöglicht die Betrachtung von Zellen und Geweben in definierten optischen Schnittebenen und damit eine genauere Lokalisierung der Antigene. Die Untersuchungen wurden mit einem Zeiss LSM 510 UV Mikroskop (Jena bzw. Oberkochen) durchgeführt, das mit einem Argon-Laser (488 nm) und einem Helium-Neon-Laser (534 nm) ausgestattet war. Um bei Doppelfluoreszenz-Markierungen ein „Durchscheinen“ der verschiedenen Fluoreszenzfarben zu vermeiden, wurde der „Double Track Mode“ angewandt, d.h. jede durchzumusternde Zeile wurde alternierend mit nur einer der beiden jeweiligen Wellenlängen angeregt. Konfokale Serienschnitte durch die Präparate wurden in Abständen von 250 bis 350 nm zwischen den einzelnen Schnittebenen angefertigt. Um die Auflösung der optischen Schnitte zu erhöhen, wurde für einige Präparate das Dekonvolutionsverfahren (KS400-Software, Zeiss Vision GmbH, Hallbergmoos) mit einem so genannten „Least-Square“-Algorithmus und mit Computer-assistierten Iterationen angewandt.

3.6 Immunhistochemie

Die Paraffin-Gewebeschnitte wurden, wie oben beschrieben, entparaffiniert und mit der „Antigen Retrieval“-Methode behandelt. Die endogene Peroxidase-Aktivität wurde durch 10 min Behandlung mit 30% H₂O₂ (DAKO) in Tris-HCl (pH 7,5-7,9) blockiert. Die Schnitte wurden dreimal in destilliertem Wasser gewaschen, 2 min in TBST inkubiert und dann kurz mit TBS gewaschen. Die Schnitte wurden 30 min lang mit dem Primärantikörper inkubiert, dann dreimal in TBS gewaschen und danach mit dem Sekundärantikörper 30 min lang inkubiert. Nach erneutem Spülen der Schnitte in TBS erfolgte die 5 min dauernde Enzym-Nachweisreaktion mit der „Substrate Chromogen“-Lösung (DAB, Diaminobenzidin; DAKO), gefolgt von Spülen mit destilliertem Wasser und einer 25 sec Haematoxylin-Gegenfärbung. Zuletzt wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gewaschen und über eine jeweils viermalige Behandlung zunächst mit 100% Ethanol und dann mit 100% Xylol in Eukitt (O. Kindler GmbH, Freiburg i. Br.) eingebettet.

3.7 Haematoxylin-Eosin Färbung

Haematoxylin-Eosin Färbung ermöglicht die histologische Betrachtung von Gewebeschnitten. Nach der Entparaffinierung wurden die Gewebeschnitte 5 min in Haematoxylin-Färbelösung inkubiert, nach kurzem Waschen mit Wasser wurden die Schnitte in 10% Essigsäure getaucht und erneut mit Wasser gewaschen. Dann folgte eine Inkubation (3 min) in Eosin, bevor die Schnitte nach kurzer Behandlung mit 95%, 100% Ethanol, und Xylol in Eukitt eingebettet wurden.

3.8 Elektronenmikroskopie

LÖSUNGEN

Cacodylat-Puffer:	50 mM Na-Cacodylat, pH 7,2
Glutaraldehyd-Lösung:	2,5% Glutaraldehyd 50 mM KCl 2,5 mM MgCl ₂ in Cacodylat-Puffer
0,5% Uranylacetat-Lösung:	0,5% Uranylacetat in H ₂ O _{dest}
2% OsO ₄ -Lösung:	2% (w/v) OsO ₄ in Cacodylat-Puffer

Saccharose-Lösung:	50 mM HEPES 200 mM Saccharose	pH 5,8
Natriumthiosulfat-Lösung:	50 mM HEPES in H ₂ O _{dest} 250 mM Natriumthiosulfat	pH 7,8
2% Uranylacetat-Lösung:	2% (w/v) Uranylacetat in Methanol	
Bleizitrat-Lösung:	1,33 g PbNO ₃ 1,76 g Na-Zitrat-Dihydrat 8 ml 1M NaOH ad 50 ml H ₂ O _{dest} (vorher frisch abgekocht)	
Epon:		
- Gemisch A:	50 ml DDSA (2-Dodecylsuccinylanhydride) 31 ml Epon 812	
- Gemisch B:	44,5 ml MNA (Methylnadic anhydride) 50 ml Epon (Glycidether)	
Gemisch A und B wurden 3:2 (w/w) vermischt.		

3.8.1 „Konventionelle“ Ultradünnschnitt-Elektronenmikroskopie

Für konventionelle Elektronenmikroskopie wurden auf Deckgläschen gewachsene Zellen kurz in PBS-Mg (PBS, 1mM MgCl₂) gewaschen und anschließend 30 min mit 2,5% Glutaraldehyd in Cacodylat-Puffer fixiert. Nach dreimaligem Waschen (je 5 min) in Cacodylat-Puffer wurden die Zellen 2 h in 2% OsO₄ auf Eis nachfixiert. Es folgten mehrere Waschschritte mit destilliertem Wasser und eine Blockkontrastierung in 0,5% Uranylacetat über Nacht. Alternativ wurden die Zellen nach der sog. Simultanmethode (vgl. Franke et al., 1969, 1976) fixiert.

Die Entwässerung und die Einbettung erfolgten nach der von Franke et al. (1978a) beschriebenen Methode. Dazu wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 70%, 80%, 90% und 96% Ethanol auf Eis, je 5 min; 100% Ethanol, 2 x 20 min; bei RT) und anschließend in 100% Propylenoxid (2 x 20 min) entwässert. Danach wurden die Zellen über Nacht in einem Propylenoxid/Epon-Gemisch (1:1, v/v) inkubiert und eine mit nicht-polymerisiertem Epon-Gemisch gefüllte Gelatine kapsel (Serva, Heidelberg) auf die Zellen gesetzt. Die Polymerisierung des Eponxy-Herzes wurde in der Regel 48 h lang bei 60°C durchgeführt. Nach dem Absprengen des Deckglases durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff wurden die Epon-Blöckchen zielgenau „getrimmt“ (TM60, C. Reichert, Austria) und 50-nm-Ultradünnschnitte mit einem Ultramikrotom (Reichert Ultracut; Leica, Bensheim) angefertigt. Die Ultradünnschnitte wurden auf Kupfernetzchen befertigt und 15 min in 2% Uranylacetat-Lösung und 5 min in Bleizitrat (Reynolds, 1963) kontrastiert. Zur

Elektronenmikroskopie und zur Dokumentation wurde ein Elektronmikroskop EM900 (Zeiss-Leo, Oberkochen) benutzt.

3.8.2 Immunelektronenmikroskopie

Bei der Immunelektronenmikroskopie wurde die sog. „Preembedding“-Methode benutzt, bei der die Antikörper-Markierung vor dem Einbetten des biologischen Materials in Plastik durchgeführt wird. Dazu wurden die Zellen oder die Kryostatschnitte in 2% Formaldehyd in PBS (7 min) fixiert. Die Zellen wurden entweder mit 0,1% Triton-X-100 in PBS (2 min) oder mit 0,1% Saponin in PBS (5 min) permeabilisiert, dann mindestens 2 h lang mit dem Primärantikörper inkubiert und dreimal in PBS (je 5 min) gewaschen. Nachfolgend wurden die Präparate mit den entsprechendem Sekundärantikörpern (Anti-Maus-, Anti-Meerschweinchen- oder Anti-Kaninchen-Immunglobuline) die an 1,4 nm große kolloidale Goldpartikel („Nanogold“; Biotrend) gekoppelt waren, über Nacht inkubiert. Nach dem Auswaschen der nicht gebundenen Antikörper wurden die Präparate mit 2,5% Glutaraldehyd in Cacodylat-Puffer nachfixiert (15 min, RT) und anschließend kurz mit Cacodylat-Puffer gewaschen. Es folgten zwei Inkubationen (je 10 min) in Saccharose-Lösung, die Silber-Verstärkung der kleinen Goldpartikel nach Angaben des Herstellers (3-8 min; Silver Enhancement Kit, Nanoprobes, Stony Brooks, NY, USA), zwei 8-min-Waschschritte in Natriumthiosulfat-Lösung und 8-10 kurze Waschschritte in destilliertem Wasser. Die Nachfixierung mit 0,2% OsO₄ auf Eis dauerte 30 min. Alle weiteren Schritte entsprachen denen der konventionellen Elektronenmikroskopie.

3.9 Biochemische Proteintechniken

3.9.1 Proteinfällung mit Methanol/Chloroform

Durch Fällung können die in einer Lösung erhaltenen Proteine angereichert und anschließend in andere Lösungen überführt werden.

Die Methanol/Chloroform-Fällung wurde nach Wessel und Flügge (1984) durchgeführt. Dazu wurde die Proteinlösung mit 3 Vol Methanol und 1 Vol Chloroform gemischt, anschließend 5 min bei 13000 U/min abzentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Nach erneuter Zugabe von 3 Vol Methanol wurde wieder

gemischt, zentrifugiert und der Überstand nach dem Abnehmen verworfen. Das Proteinsediment wurde luftgetrocknet und in den gewünschten Puffer aufgenommen.

3.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die sog. „eindimensionale“ Gelelektrophorese zur Auftrennung von Polypeptid-Gemischen nach dem Molekulargewicht der erhaltenen Proteine wurden im wesentlichen nach der von Laemmli (1970) beschriebenen Methode durchgeführt (vgl. auch Weber und Osborn, 1969; Achstätter et al., 1986).

LÖSUNGEN

Lösung A:	30% Acrylamid 0,8% Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)	
Lösung B:	1,5 M Tris-HCl 0,4% (w/v) SDS	pH 8,8
Lösung C:	0,5 M Tris-HCl 0,4% (w/v) SDS	pH 6,8
APS:	10% Ammoniumperoxisulfat in H ₂ O _{dest}	
TEMED:	N,N,N',N'-Tetramethylethylenamid (Serva, Heidelberg)	

Trenn- und Sammelgele waren folgendermaßen zusammengesetzt (Mengenangaben pro Gel):

TRENNGELE

Acrylamidkonzentration	8%	10%	12,5%	15%
Lösung A (ml)	8	10	12,5	15
Lösung B (ml)	7,5	7,5	7,5	7,5
H ₂ O _{dest} (ml)	14,4	12,4	9,9	7,4
APS (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2
TEMED (ml)	0,01	0,01	0,01	0,01

SAMMELGELE

Lösung A (ml)	1
Lösung C (ml)	2,5
H ₂ O _{dest} (ml)	6,5
APS (ml)	0,1
TEMED (ml)	0,01

Die Gelelektrophorese-Platten wurden mit Wasser und Ethanol gereinigt und mit Abstandshaltern in einer Gel-Kammer zusammengefügt.

Die Trenngel-Lösung wurde bis etwa 1,5 cm unter den Rand der vorderen „Ohren-Platte“ gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Die Polymerisierungszeit betrug ca. 1 h, gefolgt

von kurzem Spülen mit destilliertem Wasser. Dann wurde die Sammelgel-Lösung über das Trenngel gefüllt, die „Plastik-Kämme“ eingefügt, und das Gel konnte auspolymerisieren.

Zur Auftrennung von Proteinen sehr unterschiedlicher Größe wurden kommerzielle Gradientengele (Novex, San Diego, CA, USA) benutzt, deren Acrylamidgradient von 4% im oberen bis 20% im unteren Abschnitt des Gels reichte.

Die in SDS-Probenpuffer gelösten, aufzutrennenden Proteingemische wurden in die Geltaschen gefüllt. Zum Größenvergleich wurden kommerzielle Größenmarker (New England Biolabs, Frankfurt/M) aufgetragen:

<u>Molekulargewicht [kDa]</u>	<u>Protein</u>
212	Myosin (Kaninchenmuskel)
158	MDP- β -Galaktosidase (<i>E. coli</i>)
116	β -Galaktosidase (<i>E. coli</i>)
97	Phosphorylase B (Kaninchenmuskel)
66	Rinderserumalbumin (BSA)
56	Glutamatdehydrogenase (Rinderleber)
43	Maltos-bindendes Protein 2 (<i>E. coli</i>)
36	Lactatdehydrogenase M (Schweinemuskel)
27	Triosephosphatisomerase (Kaninchenmuskel)
20	Trypsininhibitor (Sojabohne)
14	Lysosym (Hühnereiweiß)
6,5	Aprotinin (Rinderlunge)
2-3	Insulin A, B-Kette (Rinderpancreas)

Die Elektrophorese wurde bei 10-15 mA, nach dem Erreichen des Trenngels bei 25 mA, durchgeführt und beendet, wenn die Bromphenolblau-Front den unteren Gelrand erreichte. Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder mit (kolloidalem) Coomassie-Brillantblau angefärbt oder zur „Immunblot“-Analyse weiterverwendet. Nach Coomassie-Brillantblau-Färbung wurden die Gele unter Durchlicht auf Agfa Pan 25 Film (Agfa-Gevaert) dokumentiert.

3.9.3 „Zweidimensionale“ Gelelektrophorese: Isoelektrische Fokussierung und SDS-PAGE

Die sog. „zweidimensionale“ Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von Polypeptiden nach ihrem isoelektrischen Punkt und dem apparenten Molekulargewicht (geschätzt vom Wanderungsverhalten als SDS-Komplex). Hierbei wird nach der Methode von O'Farrell (1975) zur Auftrennung in der ersten Dimension in einem Rundgel ein pH-Gradient aufgebaut, in dem die zu trennenden Proteine bis zu der Stelle wandern, die ihrem

isoelektrischen Punkt entspricht (vgl. Achstätter et al., 1986a). Zur anschließenden Auftrennung in der zweiten Dimension wurde in der Regel die etwa fünffach größere Menge Protein eingesetzt.

LÖSUNGEN

Acrylamid-Lösung:	30% (w/v)
„Rundgel-Lösung“:	5,5 g Harnstoff 1,33 ml Acrylamid-Lösung (30% w/v) 2 ml 10% NP40-Lösung 0,2 ml Ampholine pH 3-5 0,2 ml Ampholine pH 4-7 0,1 ml Ampholine pH 2-11 15 µl 10% APS 10 µl TEMED
Lysis-Puffer:	9,8 M Harnstoff 10 mM Tris-HCl pH 8,0 5% β-Mercaptoethanol 0,8% Ampholine pH 4-6 0,8% Ampholine pH 5-7 0,8% Ampholine pH 2-11 2% (w/v) NP40
„Überschichtungspuffer“:	2 Vol Lysis-Puffer 1 Vol H ₂ O _{dest}
Anoden-Elektrophoresepuffer:	10 mM H ₃ PO ₄
Kathoden-Elektrophoresepuffer:	20mM NaOH
O-Puffer:	20 mM DTT 60 mM Tris-HCl pH 6,8 10% (v/v) Glycerol 2% (w/v) SDS

Zur Auftrennung in der ersten Dimension wurde in vorher mit Silikon beschichtete und einseitig mit Parafilm verschlossene Glasröhrchen „Rundgel-Lösung“ gegossen, mit destilliertem Wasser überschichtet und über Nacht polymerisiert. Der Parafilm an der Unterseite des Röhrchens wurde dann durch ein Stück Gaze ersetzt, das mit einem Gummiring fixiert wurde. Die polymerisierten Rundgele wurden in eine Elektrophorese-Apparatur (Biorad) eingesetzt.

Als Referenz-Proteine wurden die Proteine β-Actin (IEP 5,4) und Rinderserumalbumin (IEP 6,3) beigefügt. Die zu untersuchende Proteinprobe wurde gefällt und in 60-80 µl Lysis-Puffer aufgenommen. Nach kurzem Zentrifugieren wurde die in Lösung befindliche Probe

luftblasenfrei auf das Rundgel aufgetragen, mit 20 µl „Überschichtungspuffer“ und dann mit Kathoden-Elektrophoresepuffer überschichtet. Die obere Kammer der Elektrophorese-Apparatur wurde mit Kathoden-Elektrophoresepuffer, die untere mit Anoden-Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte 15 min lang bei 200 V, anschließend 30 min bei 300 V und schließlich 16-18 h bei 400 V.

Nach Beendigung der isoelektrischen Fokussierung wurde das Rundgel mit einer wassergefüllten Spritze vorsichtig aus dem Glasröhrchen herausgepresst und 30 min in O-Puffer äquilibriert, wobei nach etwa 15 min der Puffer gewechselt wurde. Die fertigen Rundgele wurden dann luftblasenfrei auf ein SDS-PAGE-Gel montiert und mit O-Puffer-Agarose (1% Agarose in O-Puffer mit etwas Bromphenolblau) überschichtet. Die elektrophoretische Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgte wie unter 3.9.2 beschrieben. Die Rundgele konnten auch nach der Äquilibration in O-Puffer bei -20°C gelagert werden.

3.9.4 Färbung von Proteinen in Gelen

3.9.4.1 Coomassie-Brillantblau Färbung

LÖSUNGEN

Färbelösung	0,4% Coomassie-Brillantblau 40% (v/v) Isopropanol 7% (v/v) Essigsäure in H ₂ O _{dest} ad 100%
Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure 20 % (v/v) Isopropanol in H ₂ O _{dest} ad 100%

Zur Anfärbung der Polypeptid-Banden mit Coomassie-Brillantblau wurde das Gel mindestens 1 h lang auf einem Gelschüttler in Färbelösung inkubiert. Die anschließende differentielle Entfärbung erfolgte – unter mehrfachem Wechsel der Entfärbelösung – so lange, bis die Banden bzw. Flecke deutlich zu erkennen waren. Das Gel wurde dann zur Dokumentation fotografiert und getrocknet.

3.9.4.2 Kolloidale Coomassie-Brillantblau Färbung

LÖSUNGEN

Fixierungslösung:	50% (v/v) Methanol 2% (v/v) Phosphorsäure
Inkubationslösung:	34% (v/v) Methanol 2% (v/v) Phosphorsäure 17% (w/v) Ammoniumsulfat
Färbelösung:	0,066% (w/v) Coomassie G-250 in Inkubationslösung

Zur Fixierung der Polypeptid-Banden wurde das Gel 6-16 h auf einem Gelschüttler in Fixierungslösung inkubiert, dreimal je 30 min lang gewässert und dann 1 h lang in die Inkubationslösung gelegt. Die Gele wurden anschließend in der Färbelösung mindestens 3-5 Tage angefärbt, anschließend mit destilliertem Wasser ca. 3 h entfärbt, zur Dokumentation fotografiert und häufig auch für die MALDI-Analyse weiterverwendet.

3.9.5. Transfer von Polypeptiden auf PVDF Membranen („Nassblot“-Verfahren)

Um durch SDS-PAGE aufgetrennte Polypeptide immunchemisch charakterisieren zu können, wurden diese auf eine Membran aus Nitrocellulose oder Polyvinyliden-Difluorid (PVDF) übertragen. Mit einigen Modifikationen wurde die von Achtstaetter et al. (1986) beschriebene Methode benutzt.

LÖSUNGEN

Färbelösung für PVDF-Membranen:	0,1% (w/v) Coomassie-Brillantblau 40% (v/v) Isopropanol 1% (v/v) Essigsäure in H ₂ O _{dest}
Entfärbelösung für PVDF-Membranen:	50% (v/v) Isopropanol 0,5% (v/v) Essigsäure in H ₂ O _{dest}

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden die Glasplatten vorsichtig entfernt. Die PVDF-Membran wurde vor der Verwendung mit Isopropanol und Transferpuffer angefeuchtet. Das für die Übertragung (hier „Blot“) benutzte Gerät wurde nach dem folgenden Schema zusammengebaut:

ANODE (+)
Plastikdeckel
Schwammtuch
3 Lagen Whatman-Blot-Papier
PVDF-Membran
Gel
3 Lagen Whatman-Papier
Schwammtuch
Plastikdeckel
KATHODE (-)

Luftblasen zwischen Gel und Membran wurden vorsichtig entfernt. Die Blot-Kammer wurde dann mit Transferpuffer gefüllt. Der Transfer war je 15 min lang bei einer Stromstärke von 150, 250 und 350 mA sowie anschließend 2 h bei 450 mA oder über Nacht bei 150 mA. Nach dem Transfer wurden die Proteinbanden auf der PVDF-Membran mit Coomassie-Färbelösung sichtbar gemacht. Die Membran wurde getrocknet und vor einer Verwendung im Immunblot-Verfahren mit Isopropanol erneut befeuchtet.

3.9.6 Spezifische Antigen-Erkennung durch Antikörper auf PVDF-Membranen („Immunblot“)

Der Nachweis der an die Membran gebundenen Polypeptide erfolgte immunchemisch als indirekter Enzym-Immuntest. Um unspezifische Hintergrundreaktionen weitgehend zu verhindern, wurde die PVDF-Membran 1 h auf einem Gelschüttler in Blockierungspuffer (5% Magermilchpulver in TBST) und anschließend mit dem in TBST verdünnten Primärantikörper 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST (je 15 min), folgte eine Inkubation mit dem Sekundärantikörper (gekoppelt mit HRP) 30 min. Anschließend wurde der Membran dreimal je 15 min in TBST gewaschen, kurz abgetupft und 20 sec mit einer frisch hergestellten Mischung (1:1) der beiden Komponenten „RPR Detection Reagent 1 und 2“ des ECL-Detectionsystems („Enhanced Chemiluminescence“, Amersham Biosciences, Freiburg i. Br.) benetzt. Die Chemilumineszenz wurde mit einem Röntgenfilm (Konica oder X-OMAT AR; Kodak) in Röntgenkassetten (Goos) dokumentiert. Die Expositionszeiten variierten zwischen 5 sec und 1 h.

3.9.7 Mehrfachverwendung von PVDF-Membranen („Stripping“)

Um eine PVDF-Membran nacheinander mit zwei oder mehreren verschiedenen Primärantikörper behandeln zu können, mussten die zuerst verwendeten Antikörper durch

„Stripping“ von der Membran entfernt werden. Nach kurzer Befeuchtung mit Ethanol wurde die Membran 30 min bei 55°C unter Schütteln in “Stripping”-Puffer inkubiert, dann dreimal mit TBST gewaschen und anschließend für eine erneute Antikörper-Reaktion verwendet.

3.10. Biochemische Methoden

3.10.1 Herstellung von Zell-Lysaten aus Kulturzellen („Gesamtzell-Extrakt“)

Die in 10-cm-Petrischalen gewachsenen Zellen wurden nach Entfernen des Mediums zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit SDS-Probenpuffer („Laemmli-Puffer“, 1 ml pro Schale) versetzt. Nach dem Abkratzen des Zellrasens mit einem Gummischaber wurden die in der Probe enthaltenen Nukleinsäuren mit Benzonase (Merck, Darmstadt; 2 µl pro Schale) weitgehend verdaut. Das Lysat wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, 3 min bei 95°C erhitzt und vor dem Auftragen auf ein Polyacrylamidgel kurz bei 13000 U/min zentrifugiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei –20°C.

3.10.2 Herstellung von Cytoskelett-Präparaten

Die Zellen wurden nach Entfernen des Mediums zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml „Low Salt“-Puffer (pro 10 cm Kulturschale) versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Diese Inkubation führt zur Zell-Lyse, wobei die Zellen vielfach noch am Schalenboden haften bleiben. Der Puffer wurde vorsichtig abgesaugt und für eine weiteren Analyse aufgehoben. Dann wurden die restlichen Zellbestandteile mit je 2 ml „High Salt“-Puffer 30 min auf Eis extrahiert. Die an der Schale haftenden Zellreste wurden dann mit einem Gummispatel abgeschabt und gesammelt. Diese Suspension wurde mit einem Dounce-Homogenisator (Stempel „L“) homogenisiert, auch um dabei DNA durch Scherkräfte zu zerkleinern. Diese Suspension wurde in ein Zentrifugen-Röhrchen überführt und mit 4000 U/min 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und zur Analyse verwendet. Das Sediment wurde in PBS homogenisiert und mit einer Eppendorf-Laborzentrifuge erneut zentrifugiert. Dann wurde das so erhaltene Sediment („Pellet“) als Cytoskelett-Präparation in „Laemmli-Probenpuffer“ für die gelelektrophoretische Auftrennung aufgenommen.

3.10.3 Immunpräzipitation (IP)

Die hierfür gewählte Methode macht es möglich, mit Hilfe spezifischer, an kleine magnetische Kugeln („Beads“) gekoppelte Antikörper Antigene und deren Bindungspartner aus einem Proteingemisch zu isolieren.

Die in 10-cm-Petrischalen gewachsenen Zellen wurden nach Entfernen des Mediums zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit IP-Puffer bzw. RIPA-Puffer (1 ml pro Schale) versetzt und 10 min lang lysiert. Nach dem Abkratzen des Zellrasens mit einem Gummischaber wurde das Lysat homogenisiert, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, 10 min bei 4°C bei 13000 U/min zentrifugiert, sodann der Überstand vorsichtig abpipettiert und weiterverwendet.

Die IP wurden mit Magnet-Beads („Dynabeads“; Dynal, Hamburg), die an Protein A, Maus-IgG oder Kaninchen-IgG gekoppelt waren, durchgeführt. Je 50 µl Dynabeads wurden viermal in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) gewaschen und mit dem entsprechenden Antikörper beladen (3-4 h unter Rotation bei 4°C). Für die Vorreinigung der Zellextrakte wurden die Beads im entsprechenden Extraktionspuffer (IP-Puffer) viermal gewaschen und mit dem beschriebenen Proteinextrakt 3-4 h inkubiert (Überkopf-Schüttler, bei 4°C).

Der vorgereinigte Überstand wurde über Nacht mit den Antikörper-beladenen Dynabeads inkubiert (Überkopf-Schüttler, bei 4°C). Die Beads wurden viermal mit IP-Puffer gewaschen, anschließend in dreifach konzentriertem SDS-Probenpuffer aufgenommen, unter Schütteln gelöst und 3 min lang bei 95°C denaturiert. Die Analyse der präzipitierten Proteine erfolgte mit SDS-PAGE und dem Immunblot-Verfahren.

Zur Kontrolle wurden auch Magnetpartikel, die mit Antikörpern gegen völlig andere („unrelated“) Proteine beladen waren, eingesetzt. Als weitere Negativ-Kontrolle dienten Antikörper-beladene Beads, die nur mit IP-Puffer inkubiert worden waren.

3.10.4 Massenspektrometrie

Anhand des charakteristischen Massenspektrums und durch den Vergleich mit den „theoretischen Massen“ können Molmassen von Proteinfragmenten (gewonnen durch Trypsin-Verdau) identifiziert werden. Diese Analysen wurden dankenswerterweise von Dr. Martina Schnölzer (DKFZ, Zentrale Proteinanalytik) durchgeführt.

3.10.4.1 Trypsin-Spaltung im Gel

LÖSUNGEN

Trypsin-Lösung: 20 µl Trypsin („Sequencing Grade modified Trypsin“, Promega, Mannheim) in 40 µl 1 mM HCl (pH 7,5-7,9)

NH₄HCO₃-Lösung: 40 mM NH₄HCO₃ pH 8,4

SDS-PAGE-Gele wurden mit „Kolloidaler Coomassie-Lösung“ gefärbt, die zu untersuchenden Polypeptid-Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in 0,2-ml-Reaktionsgefäße überführt. Es folgten Waschungen in 100 µl destilliertem Wasser (30 min) und zweimal jeweils in 100 µl 50% (v/v) Acetonitril-Lösung (je 15 min). Dann wurden die Gelstücke 15 min in 100 µl 100% Acetonitril entwässert und 5 min luftgetrocknet. Vor der Analyse wurden 0,8 µl Trypsin-Lösung und 20 µl frisch angesetzte NH₄HCO₃ Lösung zu den Gelstückchen gegeben. Nach 15 min Inkubation bei 37°C hatten die Gelstücke die Trypsin-Lösung aufgenommen, und der Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C, wobei zu beachten war, dass die Gelstücke immer mit Puffer bedeckt blieben.

3.10.4.2 MALDI-Analyse

MALDI („Matrix-assistierte Laser-Desorption/Ionisations“-Massenspektren wurden mit dem „Reflex II Time-of-Flight“ Instrument (Bruker-Daltonik, Bremen) aufgezeichnet und aus 50-200 individuellen „Laser-Schüssen“ ermittelt.

Als Matrix wurden 0,3 µl einer Nitrozellulose-haltigen gesättigten α -Zimtsäure-Lösung in Aceton in individuellen Punkten auf den Probenträger aufgetragen. Anschließend wurden 0,4 µl der verdauten Probe sowie 0,8 µl 10% Ameisensäure aufgetragen und langsam luftgetrocknet. Zur Entfernung von Salzen aus dem Trypsin-Verdau wurden mehrere Waschschriffe mit 10% Ameisensäure und mit H₂O_{dest} durchgeführt.

Die bei der MALDI-Analyse erhaltenen Molekülmassen wurden in einer Datenbanksuche mit den Programmen MS-Fit (University of San Francisco, CA, USA), Profound (Rockefeller University, New York, USA) und Peptide Search (EMBL, Heidelberg) ausgewertet.

3.11. Molekularbiologische Methoden

3.11.1 Extraktion von Gesamt-RNA von Zellen

Zur Präparation von Gesamt-RNA aus verschiedenen Zellkultur-Linien wurde das Rneasy Mini Kit von Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers benutzt.

3.11.2 Herstellung cDNA mittels RT-Reaktion

Über die Bindung von „random“ Hexamer-Oligonukleotid-Primern wurden unter Verwendung von Reverse Transkriptase (RT) aus mRNAs die entsprechenden cDNAs hergestellt (Frohman et al., 1988).

RT Ansatz (Gesamtvolumen 20 µl):

- 10 µg RNA
- 2 µl 10x Reverse Transkriptase Puffer (mit 15 mM dNTP-mix)
- 0,5 µl von 0,7 µg dN6-Oligonukleotid-Primern
- 1 µl (40 U) RNasin (RNase Inhibitor, Roche, Mannheim)
- 0,5 µl (12,5 U) AMV-Reverse Transkriptase (Roche)
- ad 20 µl H₂O_{dest}

Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne mRNA. Die zum Vergleich verwandte cDNA von menschlichem Herzgewebe war von Frau Dr. Ulrike Nuber (vgl. Nuber et al., 1994), die von der Rinder-Augenlinse gewonnene von Frau Dr. Beate Straub (Straub et al., 2003) überlassen worden.

3.11.3 DNA-Methoden

3.11.3.1 DNA-Längenstandards für Agarose-Gelelektrophorese: Bluescribe Vector mit

Hinf I (Roche) verdaut

- 1400 bp
- 517 bp
- 396 bp
- 356 bp
- 247 bp
- 75 bp

3.11.3.2 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Mit Hilfe eines UV-Absorptionsspektrometers wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) und bei 280 nm

(Absorptionsmaximum von Proteinen) gemessen. Nach dem Messen der Absorption wurde die DNA-Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Nukleinsäure-Konzentration} = A_{260} \times \text{Berechnungsfaktor} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Berechnungsfaktor für doppelsträngige DNA betrug 50 µg/ml, für eventuell vorhandene RNA 40 µg/ml und für Oligonukleotide 33 µg/ml. Anhand des Quotienten A_{260}/A_{280} konnten Verunreinigungen mit Proteinen festgestellt werden.

3.11.3.3 PCR-Techniken

Die Polymerase-Kettenreaktion dient zur Amplifizierung von spezifischen DNA-Sequenzen und besteht aus den folgenden Reaktionsschritten:

1. Denaturierung der DNA-Stränge
2. Hybridisierung von Primern
3. Kettenverlängerung mittels DNA-Polymerase

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurden die Puffer und die Polymerase von Roche Diagnostics (Mannheim) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

PCR-Ansatz:

- 1/10 Vol 10x PCR-Puffer mit MgCl₂
- 200 mM dNTPs
- 10 pmol spezifischer „sense“ Primer
- 10 pmol spezifischer „antisense“ Primer
- DNA
- 1-2 U Taq-Polymerase (Boehringer, Mannheim)
- Ad 50 µl mit H₂O_{bidest.} mit 20 µl Paraffinöl überschichtet.

PCR-Programm:

Reaktion	Zeit (min)	Temperatur (°C)
Denaturierung	40 sec	94
Hybridisierung	1	50
Verlängerung	1	72
Anzahl der Zyklen	35	

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte durch Elektrophorese in einem 2% Agarosegel. Als Negativ-Kontrolle diente ein Ansatz ohne DNA-„Template“, um den Versuchsansatz auf DNA-Verunreinigungen zu überprüfen. Weitere Kontrollen umfassten Ansätze, die jeweils nur den „sense“ oder den „antisense“ Primer enthielten. Vor der weiteren Verwendung der PCR-Produkte wurden diese mit Hilfe des „PCR Purification Kits“ (Qiagen) gereinigt.

Benutzte Primer:

N-Cadherin (vgl. Reid und Hemperly, 1990)

sense: CAAGTGCCATTAGCCAAGG

antisense: TTAAGCCGAGTGATGGTCC

VE-Cadherin (vgl. Ding et al., 2003)

sense: GACTGACCATCATGCCCTCT

antisense: GAACATCTGCCCCTTCTCAG

Vimentin (freundliche Gabe von PD Dr. Harald Herrmann, DKFZ, Heidelberg; vgl. Herrmann et al., 1989)

sense: ACAGCATGTCCAAATCGATGTGG

antisense: AGAGTCGACTTAGCAACCGCCTTCAAGGTCATCGTGATGC

Protein p0071 (vgl. Schröder et al., 2000)

sense: TTGGAGATCAACAGACGTGCC

antisense: TTGAAGGAGACACGCCTGTGC

T-Cadherin (vgl. Takeuchi et al., 2001)

sense: GCCACGATCATGATCGATGA

antisense: GTCTTCATTTTCCACTTTGA

P-Cadherin (vgl. Matsuyoshi und Imamura, 1997)

sense: GACCAACGAGGCCCTTTTGTGCTG

antisense: GTGGTGGGAGGGCTTCCATTGTCCA

3.11.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA zur Bestimmung des Molekulargewichtes (MG) erfolgt in einer Agarosematrix. Durch den Zusatz von Ethidiumbromid in der Lösung für das Agarosegel können die Nukleinsäuren bei UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Die DNA-Proben wurden mit Probenpuffer versehen und in einem 2% Agarosegel bei 70 V in Laufpuffer (1x TAE) aufgetrennt. Die PCR-Produkte wurden als Stückchen aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des „Qiaquick Gel Extraction-Systems“ aus dem Gel extrahiert.

2% Agarosegel:	0,8 g	Agarose
	40 ml	1x TAE
	2 µl	Ethidiumbromid (10 mg/ml)

3.11.3.5 Sequenzanalyse der DNA

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde dankenswerterweise von Herrn Andreas Hunziker (DKFZ, Heidelberg) mit Hilfe eines Sequenzierautomaten durchgeführt. Dabei wurde der *PRISM Cycle Sequencing Kit* mit AmpliTaq FS (Applied Biosystems, Weiterstadt) nach Angaben des Herstellers verwendet.

4 ERGEBNISSE

4.1 *Colligatio permixta*: ein neuer Typ von “Adhering Junctions” in Glioma-Zellen

Nach der allgemein üblichen Klassifizierung der Adhärenz-Verbindungen (AJ) werden diese in zwei große Gruppen eingeteilt (Farquhar und Palade, 1963; Staehelin, 1974; Bloom und Fawcett, 1975; Drenckhahn, 1988; Benninghoff, 2004): die Desmosomen (*Maculae adhaerentes*; Übersichten: Cowin et al., 1985a, b; Franke et al., 1994; Green und Gaudry, 2000) und die “Adherens Junctions” (morphologisch werden drei Typen unterschieden: *Zonulae* bzw. *Fasciae adhaerentes* sowie *Puncta adhaerentia*; vgl. Geiger et al., 1983). Diese Strukturen unterscheiden sich nicht nur in ihrer Gestalt, sondern vor allem auch in ihrem molekularen Aufbau: nur wenige Proteine kommen konstitutiv in beiden Strukturgruppen vor, vor allem das Plakoglobin (Cowin et al., 1986; vgl. auch Schwarz et al., 1990; Green und Gaudry, 2000; Hatzfeld et al., 2003; Brabletz, 2004; Godsel et al., 2004). Im letzten Jahrzehnt hat sich jedoch mit zunehmender Klarheit herausgestellt, dass sich nicht alle plaque-tragenden Zell-Zell-Verbindungen unter diese Kategorien subsumieren lassen. Außer - vor allem elektronenmikroskopisch auffälligen - morphologischen Unterschieden erwies sich die molekulare Zusammensetzung einer Reihe von Zellverbindungen als eigenständig, gewissermaßen typisch für jeweils einen besonderen Zellverbindungstyp *sui generis*. Bis jetzt sind so mehrere verschiedene neue Arten von Adhärenz-Verbindungen beschrieben worden: der *Contactus adhaerens* in den cerebellären Glomeruli (Rose et al., 1995), der *Complexus adhaerens* in lymphatischen Endothelzellen besonders den Retothel-Zellen des Lymphknotens (Schmelz und Franke, 1993; Schmelz et al., 1994), die heterotypischen Verbindungen von Photorezeptoren und Müller-Glia-Zellen der *Zona limitans externa* in der Retina (Paffenholz et al., 1999), die *Area composita* im Herz (Borrmann et al., 2000) und der *Cortex adhaerens* in der Augenlinse (Straub et al., 2003).

In Vorversuchen war aufgefallen, dass eine Reihe häufig benutzter menschlicher Zellkultur-Linien Verbindungsstrukturen aufwiesen, die zwar den bisher bekannten Adhärenz-Verbindungen ähnelten, andererseits aber von diesen in ihrem molekularen Aufbau in mehrfacher Weise so deutlich verschieden waren, dass eine biochemische Aufklärung dieser offenbar neuartigen Strukturen erforderlich war.

4.1.1 Die Zellkultur-Linie Glioma U333/MG und verwandte Linien: Morphologie und Nachweis der glialen Abstammung

Um Herkunft und Differenzierung der Zellen zu prüfen, wurde ein verlässlicher Glia-Marker, das Intermediärfilament (IF)-Protein GFAP („Glial Fibrillary Acidic Protein“), in der Immunfluoreszenzmikroskopie und in Immunblot-Versuchen eingesetzt. Das Cytoplasma der U333 Glioma-Zellen wies ein charakteristisches Cytoskelett mit typischen Intermediärfilament-Bündeln auf (**Abb. 1A**). Antikörper gegen dieses Protein ergaben auch im Immunblot eine positive und spezifische Reaktion (siehe 4.1.2.1, **Abb. 3B**). Zusätzlich enthielten alle Zellen Vimentin (**Abb. 1B**), ein in mesenchymalen Geweben und Zellen weit verbreitetes Intermediärfilament-Protein (Franke et al., 1978b, 1979; Osborn et al., 1981; Achtstaetter et al., 1986a).

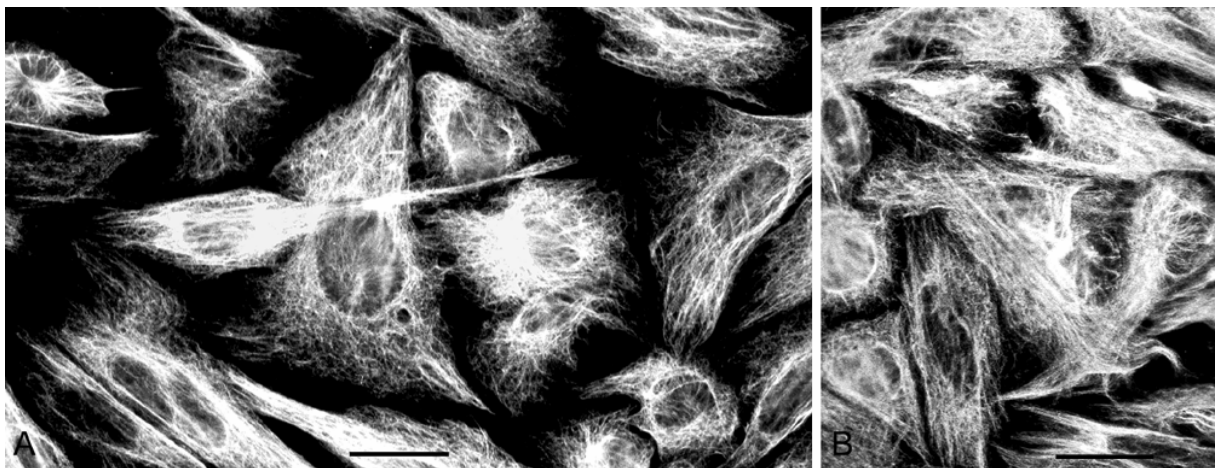


Abb. 1. Immunfluoreszenzmikroskopie des Intermediärfilament (IF)-Systems von U333/MG Glioma-Zellen des Menschen nach Reaktion mit Antikörpern gegen Gliafilamentprotein (GFAP; **A**) und Vimentin (**B**). Beide Antikörper zeigen in allen Zellen eine starke Reaktion mit IF-Bündeln. *Eichstriche:* 20 µm.

Die U333 Glioma-Zellen zeigten auch intensive Reaktionen mit Phalloidin, das Actin-Filamentbündel darstellt, und mit spezifischen Antikörpern gegen Vinculin, einem „Marker“ für die fokalen Kontakte auf der Unterseite der Zellen wie auch für Plaque-Strukturen von Actin-Filamente verankernde Junctions (**Abb. 2**).

Auch alle anderen in dieser Arbeit verwandten glialen Zell-Linien und Primärkulturen (u.a. T98G, U373MG und primäre Astrocyten-Kulturen aus Balb/c Mäusen) wurden auf das Vorhandensein von GFAP untersucht.

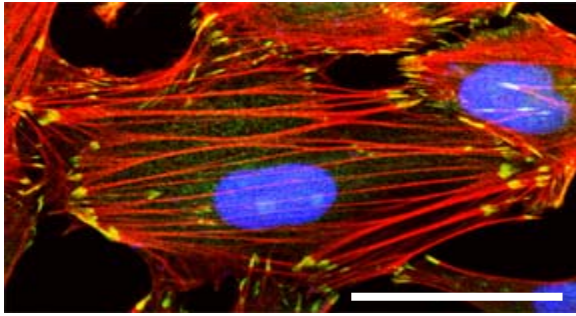


Abb. 2. Immunfluoreszenzmikroskopie (LSM) von humanen U333 Glioma-Zellen. Actin-Filamentbündel wurden mit Alexa-594-gekoppeltem Phalloidin (rot), fokale Kontakte und Plaques von Adhärenz-Verbindungen mit Antikörpern gegen Vinculin (grün) und Zellkerne mit DAPI (blau) nachgewiesen (vgl. u.a. auch Geiger et al., 1984).
Eichstrich: 20 µm.

4.1.2 Biochemischer Nachweis von Zelladhäsionsproteinen in Glioma-Zellen

Um die IF- und Zellverbindungs-Proteine von humanen U333 Glioma-Zellen zu charakterisieren, wurden zunächst Immunblot-Experimente mit Gesamtzell-Lysaten durchgeführt. So wurde das Vorkommen der für klassische AJ, DES und TJ spezifischen Zellverbindungsproteine und IF untersucht.

4.1.2.1 Zusammensetzung des Cytoskeletts

Antikörper gegen GFAP wiesen in U333 Glioma-Zellen auch im Immunblot eine Polypeptid-Bande bei MG 51 kDa nach (**Abb. 3B**). Als negative Zellkultur-Kontrollen wurden hier vor allem Endothelzellen wie HUVEC (Mensch) und CPAE (Rind) sowie die Epithelzell-Linien Caco-2 und PLC verwendet. In keiner dieser Kontroll-Zellen wurde GFAP nachgewiesen. In den Glioma-Zellen erschien neben dem GFAP auch das Intermediärfilament-Protein Vimentin. Antikörper gegen Nestin zeigten keine Reaktion.

4.1.2.2 Molekulare Zusammensetzung der Zell-Zell-Verbindungen

Zur Charakterisierung der interzellulären Verbindungen wurden Glioma-Zellen auf das Vorkommen der für AJ, DES und TJ typischen Proteine untersucht. Hierzu wurden Immunblot-Verfahren und Immunfluoreszenzmikroskopie eingesetzt.

4.1.2.2.a Proteine der „Adherens Junctions“

Von den klassischen Cadherinen konnte N-Cadherin (**Abb. 3C**) in Glioma-, aber auch in HUVEC-, CPAE- und PLC-Zellen nachgewiesen werden. Das „mesenchymale“ Typ II Cadherin, Cadherin-11 (OB-Cadherin), war in Glioma- und in HUVEC-Zellen ebenfalls stark

vertreten. Um die Möglichkeit einer Kreuzreaktion zwischen N-Cadherin und Cadherin-11 auszuschließen, wurde das Laufverhalten beider in der SDS-PAGE durch Koelektrophorese miteinander verglichen. Bei diesem Experiment waren zwei Banden von 135 kDa (N-Cadherin) und 120 kDa (Cadherin-11) erkennbar (nicht gezeigt). Auch zeigten Antikörper gegen Cadherin-11 in den N-Cadherin-positiven CPAE-Zellen keine Reaktion.

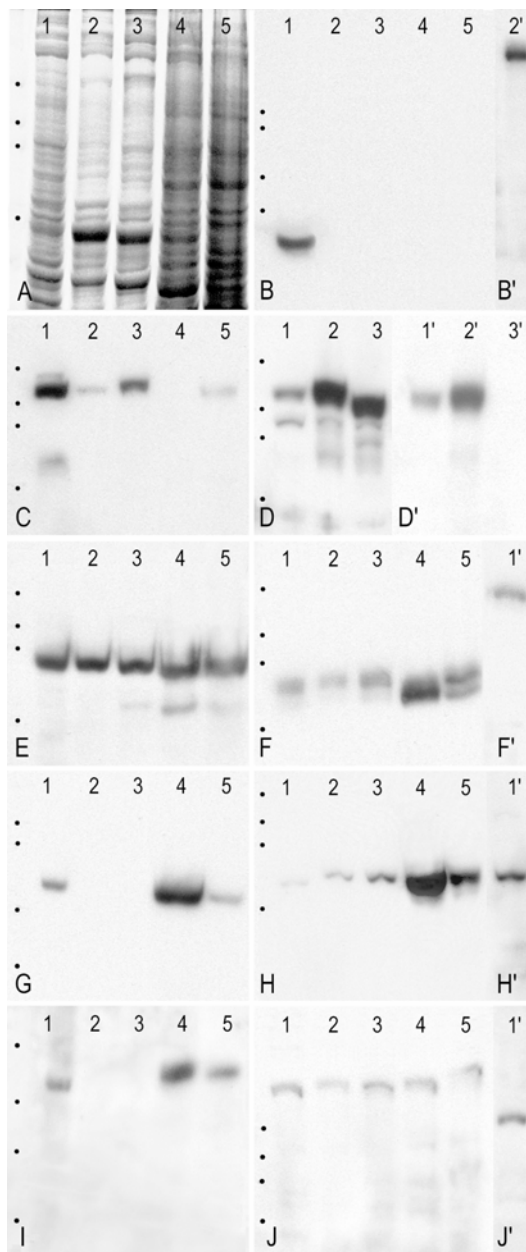


Abb. 3. Biochemische Charakterisierung von Zell-Verbindungsproteinen in U333 Glioma-Zellen mit SDS-PAGE und „Immunblot“-Verfahren.

Durch Zugabe von Probenpuffer zu den Kulturzellen wurde ein Lysat hergestellt, das in 8% Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt wurde. Nach Übertragung auf PVDF-Membranen wurden die Proteine mit spezifischen Antikörpern mit ECL-Reaktion nachgewiesen.

Die Coomassie-Blau-Färbung der Proteine von Gesamtzell-Lysaten (A) zeigt die etwa gleichmäßige Beladung der Gele (vgl. B-J', Immunblot-Nachweise): Gesamtzell-Lysate aus Zellen der Linien U333 Glioma (*Spur 1, 1'*), HUVEC-Endothel Zellen (*Spur 2, 2'*), CPAE-Kälberendothel-Zellen (*Spur 3, 3'*), Caco-2- (*Spur 4*) und PLC- (*Spur 5*) Carcinom-Zellen.

Dargestellt sind die Ergebnisse mit Antikörpern gegen GFAP (B), dem endothelialen Faktor VIII (B'), N-Cadherin (C), VE-Cadherin (D; D'), β -Catenin (E), Protein p120^{ctn} (F), Neurojungin (F'), Plakophilin 2 (G), Plakoglobin (H), Cingulin (I), Protein ZO-1 (J) und Protein ZO-2 (J'). Bei den zusätzlichen weniger intensiv doch spezifisch mit VE-Cadherin bzw. p120^{ctn} reaktiven Banden gegen VE-Cadherin (D) bzw. Protein p120^{ctn} (F) kann es sich um Spleiß- oder Phosphorylierungsvarianten (vgl. Aho et al., 2002) oder Abbau-Produkte handeln.

MG-Vergleiche sind durch Punkte jeweils am linken Rand angegeben (von oben nach unten): 158, 116, 97,2, 66,4 kDa.

Alle anderen Cadherine, die untersucht wurden (E-, M-, R-, P-Cadherin, Cadherin-6 und -8, LI-Cadherin, T-Cadherin und OB-Cadherin-2), wiesen in Glioma-Zellen keine Reaktion auf. Überraschenderweise war aber VE-Cadherin, das bisher als endothel-spezifisches Cadherin galt (Lampugnani et al., 1992; Breviario et al., 1995; Dejana et al., 1999), nicht nur in

HUVEC- und CPAE-Endothelzellen zu finden, sondern auch in den humanen Glioma-Kulturlinien, wobei es sowohl mit den Kaninchen-Antikörpern (**Abb. 3D**) als auch mit dem monoklonalen Antikörper BV9 dargestellt werden konnte (**Abb. 3D'**). Ebenso wurde mit dem Antikörper „Cadherin-5“ eine signifikante Reaktion (nicht gezeigt) nachgewiesen. Im Lysat der Rinderendothel-Zellen der Linie CPAE liefen die VE-Cadherin-positiven Polypeptide in der SDS-PAGE etwas schneller (**Abb. 3D, Spur 3**), wobei der monoklonale Antikörper BV9 keine Reaktion zeigte (**Abb. 3D, Spur 3'**), wohl deshalb, weil das betreffende Rinder-Antigen nicht erkannt wird. Keine der anderen epithelialen oder mesenchymalen Zellen (Caco-2, PLC, SV80) reagierte mit Antikörpern gegen VE-Cadherin.

Die Identität von VE-Cadherin wurde auch mit Hilfe von 2D-Gelelektrophorese und anschließender Immunblot-Analyse geprüft: Die als Fleck erkennbaren Polypeptide waren dabei identisch (nicht gezeigt).

In den Glioma-Zellen wurden unerwartet viele AJ-Plaque-Proteine gefunden, so α -Catenin und die *armadillo*-Proteine β -Catenin (**Abb. 3E**), Protein p120^{ctn} (**Abb. 3F**), dazu aber auch Spuren, die mit Antikörpern gegen Protein ARVCF (vgl. u.a. auch Kaufmann et al., 2000; Waibler et al., 2001; nicht gezeigt) und Neurojungin (**Abb. 3F'**). In Immunblots mit spezifischen Antikörpern gegen Protein p120^{ctn} wurden meist 2-3 verschiedene Banden erhalten, die wahrscheinlich den bekannten verschiedenen Spleißvarianten dieses Proteins entsprechen (vgl. auch Reynolds et al., 1992; Aho et al., 2002). Neurojungin dagegen war in den Glioma-Zellen nur durch eine sehr schwache Reaktion, wenn überhaupt, nachzuweisen, jedenfalls im Vergleich zu Lysaten von Gehirn-Gewebe oder Neurojungin-cDNA-transfizierten A1B2 Zellen. Das Plaque-Protein Plakoglobin (**Abb. 3H**; vgl. Cowin et al., 1986) konnte in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden, jedoch in unterschiedlichen Intensitäten. Das AJ-Plaque-Protein Afadin (zur Übersicht siehe Takai und Nakanishi, 2003) war ebenfalls in den Glioma-Zellen vorhanden (nicht gezeigt). Gegen humanes Nectin und Ponsin, die beiden anderen Mitglieder der NAP (Nectin-Afadin-Ponsin)-Gruppe, standen keine geeigneten Antikörper zur Verfügung.

Auch Antikörper gegen Mitglieder der ERM (Ezrin, Radixin, Moesin, Merlin/NF2)-Familie zeigten im Immunblot positive Reaktionen (nicht gezeigt). Keine signifikante Reaktion konnte jedoch mit vermuteten Transmembran-Partnern der ERM-Familie gezeigt werden (nicht gezeigt; ICAM-1-3, L-Selectin, CD44; vgl. Bretscher et al., 2002).

Antikörper gegen Vinculin, ein Bestandteil von fokalen Anheftungsstellen sowie der Plaques von Adhärenz-Verbindungen (Geiger et al., 1983; Jockusch et al., 1995; Weiss et al., 1998)

reagierten auch intensiv, ebenso solche gegen die Actin-bindenden Proteine α -Actinin und Drebrin (nicht gezeigt; vgl. Peitsch et al., 1999).

4.1.2.2.b Vorkommen desmosomaler Proteine

In Immunblot-Analysen von U333 Glioma-Zellen waren weder die klassischen desmosomalen Plaque-Proteine Desmoplakin I und II, Plakophilin 1 und 3 noch die desmosomalen Cadherine (Desmocollin 1-3, Desmoglein 1-3) nachzuweisen (nicht gezeigt), jedoch das desmosomale *arm*-Protein Plakophilin 2 (**Abb. 3G**). Plakophilin 2 war bis jetzt nur in Komplexen mit desmosomalen Proteinen beschrieben wurden. Das *armadillo* Protein p0071 (Hatzfeld und Nachtsheim, 1996; Hatzfeld et al., 2003) konnte dagegen nicht nachgewiesen werden, auch das Protein Desmoyokin („AHNAK“), das ursprünglich - offenbar fälschlicherweise - in Desmosomen beschrieben wurde (Hieda et al., 1989; vgl. dazu auch Hashimoto et al., 1993; Gentil et al., 2003), war nicht nachweisbar.

4.1.2.2.c Vorkommen von Proteinen der „Tight Junctions“

Unter den transmembranen TJ-Proteinen wiesen weder Occludin noch Mitglieder der Claudin-Superfamilie (untersucht wurden die Claudine 1-5) noch das Protein JAM-1 in Glioma-Zellen eine positive Reaktion auf (nicht gezeigt). Jedoch waren die TJ-Plaque-Proteine Symplekin, Cingulin (**Abb. 3I**), Protein ZO-1 (**Abb. 3J**) und ZO-2 (**Abb. 3J'**) positiv. Während die Proteine ZO-1 und ZO-2 schon in AJ anderer Zellen beschrieben wurden (z.B. Jesaitis und Goodenough, 1994; Howarth und Stevenson, 1995), war ein Vorkommen von Cingulin in Cadherin-haltigen AJ bisher nicht beschrieben. Vor allem ungewöhnlich ist das Vorkommen der TJ-Plaque-Proteine ZO-1 und Cingulin in Kombination mit einem desmosomalen Plaque-Protein, Plakophilin 2.

Alle Adhäsionsproteine, die keine positive Reaktion in Gesamtzell-Lysaten zeigten, wurden auch - in angereicherter Form - in Cytoskelett-Präparationen untersucht. Die Ergebnisse waren mit denen von Gesamtzell-Lysaten identisch.

4.1.2.3 Endotheliale Merkmale

Nachdem das endotheliale Protein VE-Cadherin in den Glioma-Zellen gefunden wurde, mussten auch endotheliale Merkmals-Proteine wie Faktor VIII und der von-Willebrand-

Faktor auf ihr Vorkommen in diesen Zellen untersucht werden. Weder in der Immunfluoreszenzmikroskopie noch nach Gelelektrophorese und Immunblot-Verfahren wurden entsprechende positive Reaktionen beobachtet, im Gegensatz zu den endothelialen Kontrollzellen wie HUVEC (**Abb. 3B'**) und CPAE (nicht gezeigt). In den Glioma-Zellen war dabei die Reaktion auf von-Willebrand-Faktor auch negativ, ebenfalls Reaktionen auf die für Endothelien spezifischen TJ-Proteine JAM-1 und Claudin-5 (nicht gezeigt). Zusammenfassend ist die nach den Gesamtlysate-Experimenten wahrscheinliche Zusammensetzung der U333 Glioma-„Junctions“ in **Tabelle 4** dargestellt.

Tab. 4. Zell-Zell-Verbindungsproteine in U333 Glioma-Zellen (nach SDS-PAGE und Immunblot-Analyse)

	Transmembran-Proteine	Plaque Proteine
Adherens Junction (AJ) Gruppe	N-Cadherin Cadherin-11 (VE-Cadherin)	α -Catenin β -Catenin Protein p120 ^{ctn} Protein ARVCF Plakoglobin Afadin
Desmosomen	keine	Plakoglobin Plakophilin 2
Tight Junction (TJ) Gruppe	keine	Protein ZO-1 Protein ZO-2 Cingulin

(): nicht in allen Zellen

4.1.2.4 Ergebnisse in weiteren Glioma-Zelllinien und Kulturen primärer Astrocyten

Neben U333 Zellen wurden auch andere humane Glioma-Zelllinien auf die Zusammensetzung ihrer Zell-Zell-Verbindungen untersucht, besonders stark die GFAP-positiven Linien U373MG und T98G. Die Ergebnisse waren ähnlich wie bei der Linie U333 (nicht gezeigt). In diesen beiden Linien fehlte aber VE-Cadherin und in den T98G-Zellen zusätzlich auch das Plakophilin-2 im Vergleich zu U333 Glioma-Zellen.

In primären Maus-Astrocyten-Kulturen wurden ebenfalls positive Reaktionen mit Antikörpern gegen N-Cadherin, Cadherin-11, VE-Cadherin, α - und β -Catenin, Protein p120^{ctn}, Afadin, Ponsin und Protein ZO-1 erhalten (**Abb. 4**). Das Vorkommen von Ponsin in diesen Zellen ist besonders bemerkenswert, da der einzige zu Verfügung stehende Antikörper spezifisch für Maus Ponsin war.

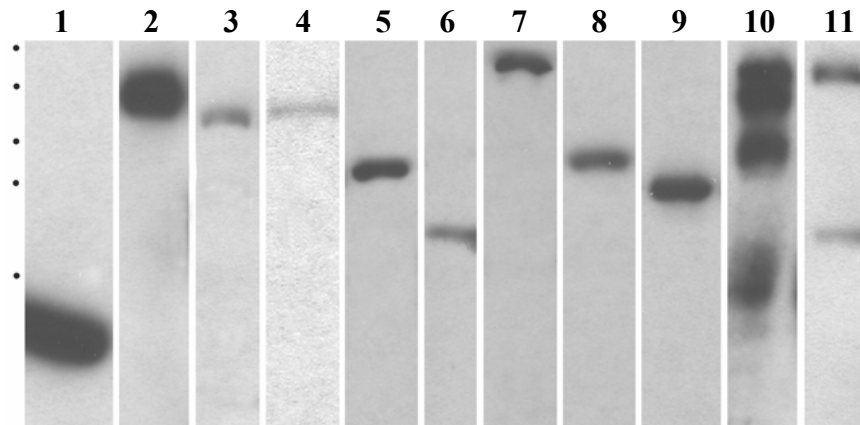


Abb. 4. Immunblot-Nachweis von verschiedenen Adhärenz-Verbindungs-Proteinen nach SDS-PAGE der Proteine von Gesamtzell-Lysaten aus Maus-Astrocyten-Primärkulturen.

Proteine aus Gesamtlisaten von konfluent gewachsenen Mäuse-Astrocyten wurden über 6-12,5% Polyacrylamid-Gele elektrophoretisch getrennt, auf PVDF Membranen transferiert und mit Antikörpern gegen folgende Proteine geprüft: GFAP (*Spur 1*); N-Cadherin (*Spur 2*); VE-Cadherin (*Spur 3*); Cadherin-11 (*Spur 4*); Plakophilin 2 (*Spur 5*); Plakoglobin (*Spur 6*); Protein ZO-1 (*Spur 7*); α -Catenin (*Spur 8*); β -Catenin (*Spur 9*); Ponsin (*Spur 10*); Afadin (*Spur 11*). MG-Vergleiche sind durch Punkte am linken Rand angegeben (von oben nach unten): 212, 158, 116, 97.2, 66.4 kDa.

4.1.3 Analyse der Cadherin-haltigen Komplexe in U333-Glioma-Zellen mit Immunpräzipitation (IP)

Um die Zusammensetzung der Cadherin-haltigen Komplexe zu analysieren, wurden U333-Glioma-Zellen in 1% Triton-X-100 Puffer mit 0,5 mM CaCl_2 lysiert. Aus im Lysat erhaltenen Zentrifugationsüberständen wurden N-Cadherin, VE-Cadherin und Cadherin-11 immunpräzipitiert, und die Immunpräzipitate (IP) wurden auf mögliche Bindungspartner mit einer Immunblot-Analyse untersucht (**Abb. 5**). Folgende Proben wurden dabei zusätzlich als Kontrollen aufgetragen: Gesamtzell-Lysat, Überstand nach Erhalt der IP, unspezifisch absorbierte Proteine der benutzten „Beads“, Antikörper-beladene „Beads“ ohne Lysat und mit anderen irrelevanten Antikörpern beladene „Beads“, die zuvor mit dem Zell-Lysat behandelt worden waren.

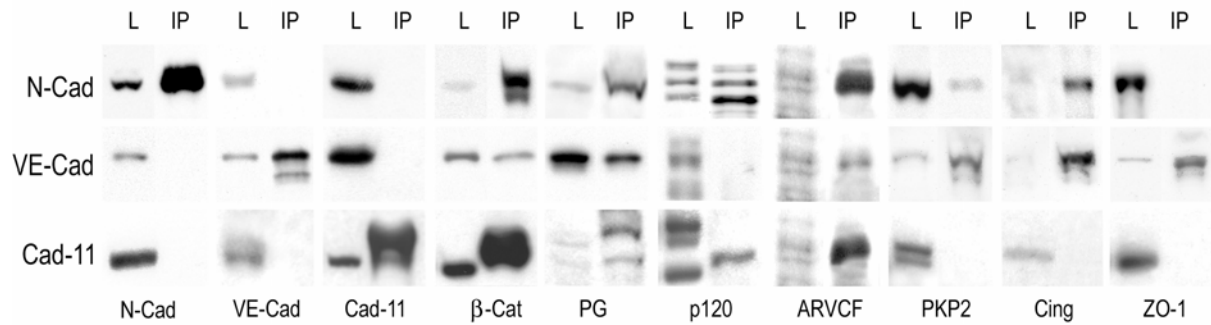


Abb. 5. Analyse der Cadherin-haltigen Protein-Komplexe mit Hilfe von Immunpräzipitation

Die Proteine von U333 Glioma-Zellen wurden in 1% Triton-X-100 Puffer, der 0,5 mM CaCl_2 enthielt, aufgebrochen und extrahiert. Für die Immunpräzipitationen wurden Antikörper gegen N-Cadherin (**N-Cad**), VE-Cadherin (**VE-Cad**) und Cadherin-11 (**Cad-11**) benutzt. Die möglicherweise immunpräzipitierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mit Antikörpern gegen N-Cadherin, VE-Cadherin, Cadherin-11, β -Catenin (**β -Cat**), Plakoglobin (**PG**), Protein p120^{ctn} (**p120**), Protein ARVCF (**ARVCF**), Plakophilin 2 (**PKP2**), Cingulin (**Cing**) und Protein ZO-1 (**ZO-1**) nachgewiesen. In dem Experiment bezeichnet „L“ das Gesamtzell-Lysat und „IP“ das entsprechende Immunpräzipitat. N-Cadherin immunpräzipitierte β -Cat, PG, p120, ARVCF, PKP2 und Cingulin. VE-Cadherin erschien dagegen zusammen mit β -Cat, PG, ARVCF, PKP2, ZO-1 und Cingulin, und Cadherin-11 kopräzipitierte mit β -Cat, PG, p120 und ARVCF. Die zusätzlichen Banden im Immunblot-Nachweis von Protein p120^{ctn} könnten die verschiedenen Modifikationsformen dieses Proteins darstellen.

N-Cadherin (**Abb. 5, N-Cad**) kopräzipitierte die AJ-Plaques-Proteine α -Catenin, β -Catenin, Protein p120^{ctn}, Protein ARVCF, Plakoglobin, aber auch das desmosomale Protein Plakophilin 2 und das TJ-Plaques-Protein Cingulin. Cadherin-11, VE-Cadherin, Afadin und Protein ZO-1 waren im Immunpräzipitat von N-Cadherin nicht nachweisbar.

VE-Cadherin (**Abb. 5, VE-Cad**) präzipitierte zusammen mit α - und β -Catenin, Protein ARVCF, Plakoglobin, Afadin, den TJ-Proteinen ZO-1 und Cingulin und dem desmosomalen Protein Plakophilin 2, aber nicht N-Cadherin, Cadherin-11 und Protein p120^{ctn}.

Dementsprechend kopräzipitierte Cadherin-11 (**Abb. 5, Cad-11**) α - und β -Catenin, Protein p120^{ctn}, Protein ARVCF und Plakoglobin, aber nicht N- und VE-Cadherin, Plakophilin 2, l-Afadin, Protein ZO-1, ZO-2 und Cingulin. Die drei verschiedenen Cadherine traten bemerkenswerterweise nicht in „Über-Kreuz-Immunpräzipitationen“ auf. Eine Übersicht über die Ergebnisse der Immunpräzipitationen gibt die **Tabelle 5**.

Die Proteinkomplexe der verschiedenen Cadherine ließen sich in der Saccharose-Gradienten-Zentrifugation nicht signifikant unterscheiden (nicht gezeigt).

Tab. 5. Zusammenfassung der Ergebnisse der Immunpräzipitationen von Proteinen der Adhärenz-Verbindungen aus U333 Glioma-Zellen. Besonders ungewöhnliche Kombinationen sind rot markiert.

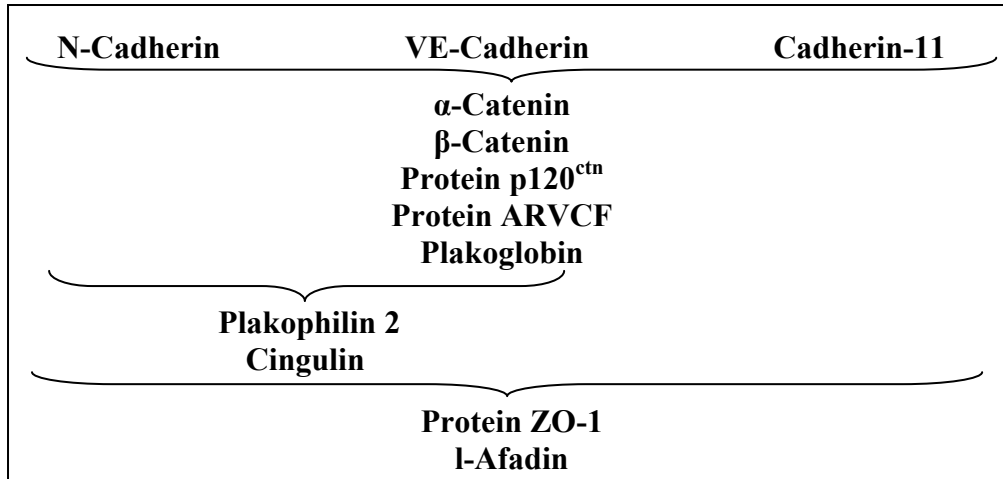
Nachweis von	N-Cadherin-Präzipitat	VE-Cadherin-Präzipitat	Cadherin-11-Präzipitat
N-Cadherin	+	-	-
VE-Cadherin	-	+	-
Cadherin-11	-	-	+
β-Catenin	+	+	+
α-Catenin	+	+	+
Plakoglobin	+	+	+
Protein p120 ^{ctn}	+	-	+
Protein ARVCF	+	+	+
Plakophilin 2	+	+	-
Cingulin	+	+	-
Protein ZO-1	-	+	-
Afadin	-	+	-

+: positiver Immunblot

-: negativer Immunblot

Bei den durch Koimmunpräzipitation ermittelten Protein-Interaktionen handelt es sich wahrscheinlich nicht um einzelne, definierte Interaktionen, sondern eher um „Protein-Superkomplexe“ aus mehreren Proteinen (**Tab. 6.**). Die Interaktionen der einzelnen Proteine dabei sind noch im Detail zu klären.

Tab. 6. Protein-Interaktionen in U333 Glioma Zellen



Dass das desmosomale Protein Plakophilin 2 und die TJ-Plaue-Proteine ZO-1 und Cingulin anscheinend mit verschiedenen Cadherinen Komplexe bilden, unterstreicht die Heterogenität und die ungewöhnliche molekulare Zusammensetzung der Glioma-Zellverbindungen.

4.1.4 Glioma-U333-AJ in der Immunfluoreszenzmikroskopie

In wesentlichen bestätigten und erweiterten die Ergebnisse der Einzel-Immunfluoreszenzen die mit SDS-PAGE und Immunblot-Verfahren erhaltenen. Proteine, die im Immunblot positiv waren, waren dies auch in der Immunfluoreszenz, mit folgenden Ausnahmen:

- Mit Antikörpern gegen Neurojungin (J19) wurden in den Glioma-Zellen keine Reaktionen an Zell-Zell-Grenzen erhalten.
- Das duale (TJ- und Kern)-Protein Symplekin wurde mit Sicherheit nur im Zellkern nachgewiesen.
- Das Protein ARVCF konnte in der Immunfluoreszenz nicht nachgewiesen werden.
- Ein Antikörper gegen das Protein p0071 (siehe auch Material und Methoden) reagierte mit cytoplasmatischen Filamentbündeln. Bei einer anschließenden Überprüfung der Spezifität wurde mit 2D-Gelelektrophorese und MALDI-MS-Analyse nachgewiesen, dass dieser Antikörper mit Vimentin kreuzreagierte. Diese Kreuzreaktion wurde zusätzlich mit einer positiven Immunblot-Reaktion des p0071 Antikörpers mit rekombinantem Vimentin bestätigt (nicht gezeigt). Leider stand kein anderer spezifischer Antikörper gegen p0071 zur Verfügung, so dass die Lokalisierung dieses Proteins nicht weiter untersucht werden konnte.

Alle sonstigen, im Immunblot negativ erscheinenden Antikörper gegen AJ-Proteine zeigten auch in der Immunfluoreszenzmikroskopie keine Reaktion (nicht gezeigt).

4.1.5 Analyse der Glioma-AJ mit Doppelfluoreszenzmikroskopie und Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)

Zunächst wurden immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen als Doppelmarkierungen mit N-Cadherin als Referenz durchgeführt, das dabei eine typische punkt- oder strichförmige Lokalisierung an den Zell-Zell-Grenzen aufwies. Da VE-Cadherin nur in etwa 20-30% der Zellen, und Cadherin-11 in etwa 80% der Zellen erschien, wurde N-Cadherin als der durchgängige Cadherin-Typ dieser Zellen angesehen. Beim Vergleich von N-Cadherin (**Abb. 6A, Abb. 7A-G**) mit anderen AJ-Proteinen wurde eine weitgehende Kolo-kalisierung mit α -Catenin (**Abb. 6A', A''**) sowie den *arm*-Proteinen β -Catenin (**Abb. 6A', B'**), Protein p120^{ctn} (**Abb. 6D'**) und Plakoglobin (nicht gezeigt) festgestellt. Bei der Untersuchung von desmosomalen Proteinen zeigte sich auch hier, dass Plakophilin 2 (**Abb. 6E'**) zusammen mit N-Cadherin an den Zell-Zell-Grenzen vorkam. Ebenfalls an punkt- oder komma-förmigen

Kontaktstellen lokalisierte N-Cadherin zusammen mit den TJ-Proteinen ZO-1 (**Abb. 6F'**) und Cingulin (**Abb. 6G'**).

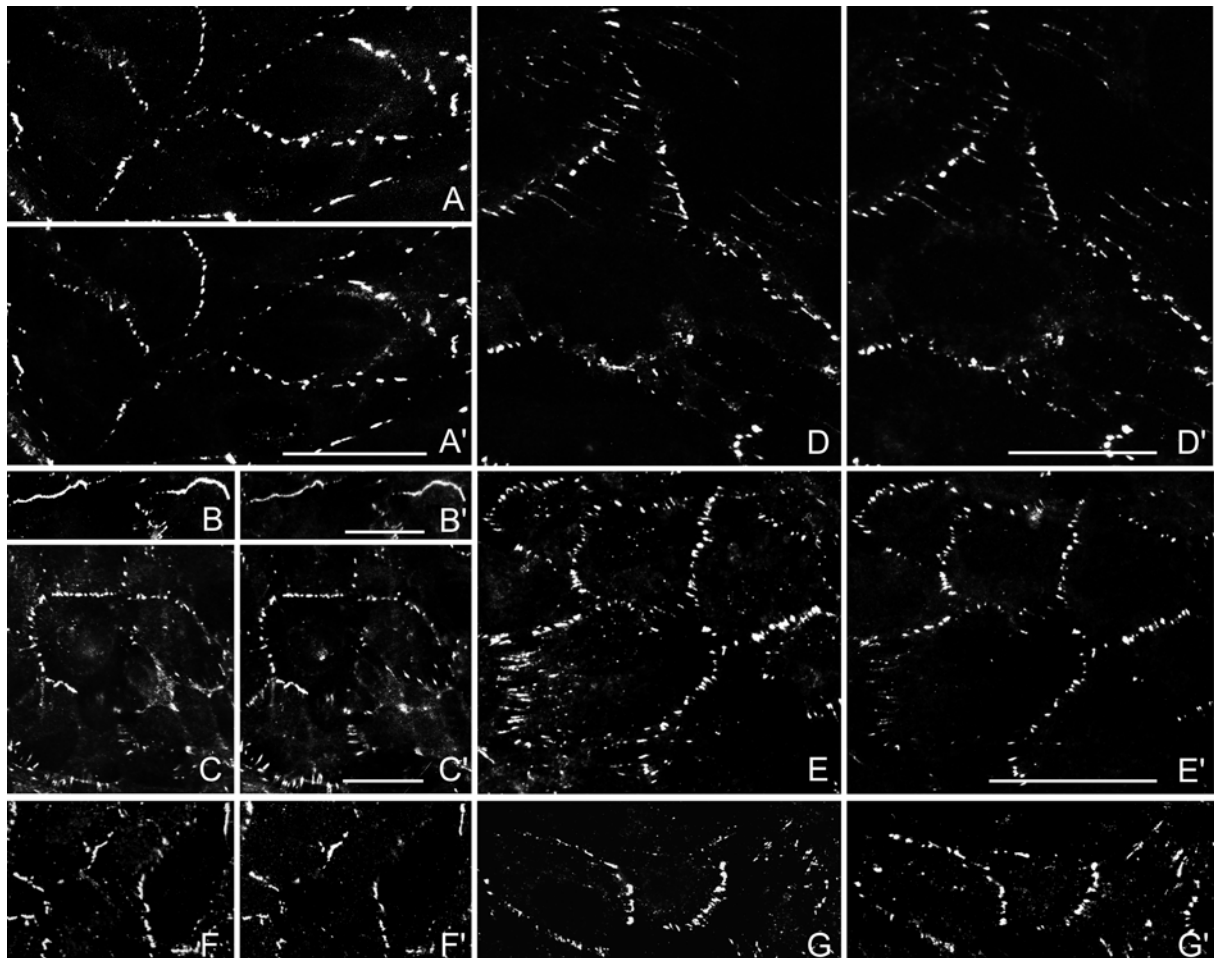


Abb. 6. Charakterisierung der N-Cadherin-haltigen Zellverbindungen in Glioma-Zellen der Linie U333 mit Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie. N-Cadherin (**A-G**) kolokalisiert mit β -Catenin (**A', B'**), α -Catenin (**C'**), Protein p120^{cas} (**D'**), Plakophilin 2 (PKP2; **E'**), Protein ZO-1 (**F'**) und Cingulin (**G'**) in distinkten *Adhaerens*-Zellverbindungsstrukturen, die wohl *Puncta* oder *Fasciae* entsprechen. *Eichstriche*: 10 μ m.

Unerwarteterweise wurde auch hier eine Kolokalisierung von PKP 2 und ZO-1 sowie von Cingulin mit N-Cadherin festgestellt, wobei all diese Proteine punkt- bzw. strichförmigen Zell-Zell-Grenzstrukturen angereichert waren, die sich eindeutig von dem für TJ charakteristischen linienförmigen Fluoreszenzmuster in Endothel- und Epithelzellen unterschieden (vgl. Tsukita et al., 2001; Brandner et al., 2002).

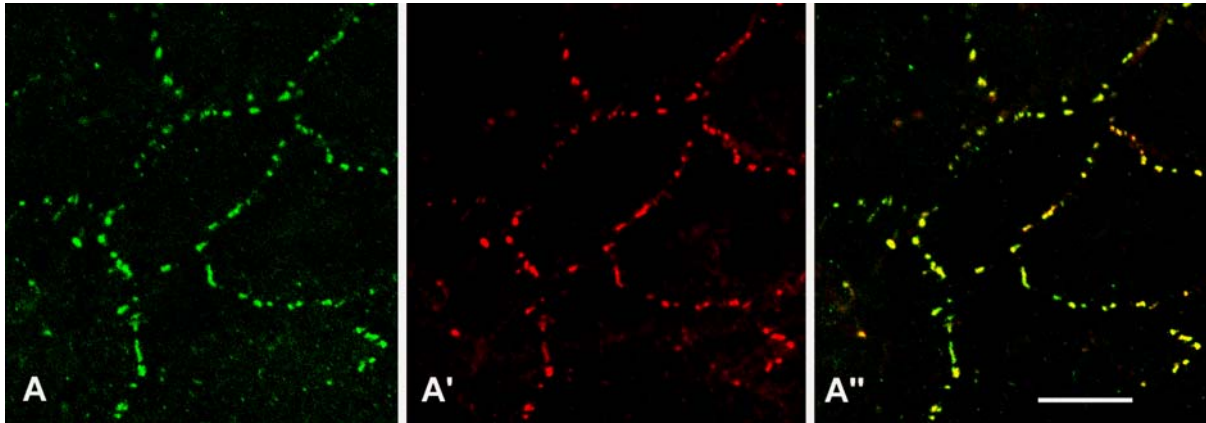


Abb. 7. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie von U333 Glioma-Zellen mit Antikörpern gegen N-Cadherin (A; grün) und α -Catenin (A'; rot). Die Mischfarben-Darstellung zeigt eine nahezu vollständige Kolo­kalisierung (gelbe Farbe in A''). Beide Proteine sind punkt- oder strichförmig entlang der Zell-Zell-Grenzen angeordnet. *Eichstrich:* 10 μ m.

Die Analyse von Doppel-Immunfluoreszenzen mit Hilfe des konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM) ergab Ähnliches: Hier sind die Reaktionsstellen für N-Cadherin (**Abb. 7A**) auch durchweg eindeutig positiv für α -Catenin (**Abb. 7A'**). Genauso kolo­kalisierte N-Cadherin (**Abb. 8A'**) mit β -Catenin (**Abb. 8A**), Protein p120^{ctn} (**Abb. 8B-B''**) und Plakophilin 2 (**Abb. 8C-C''**).

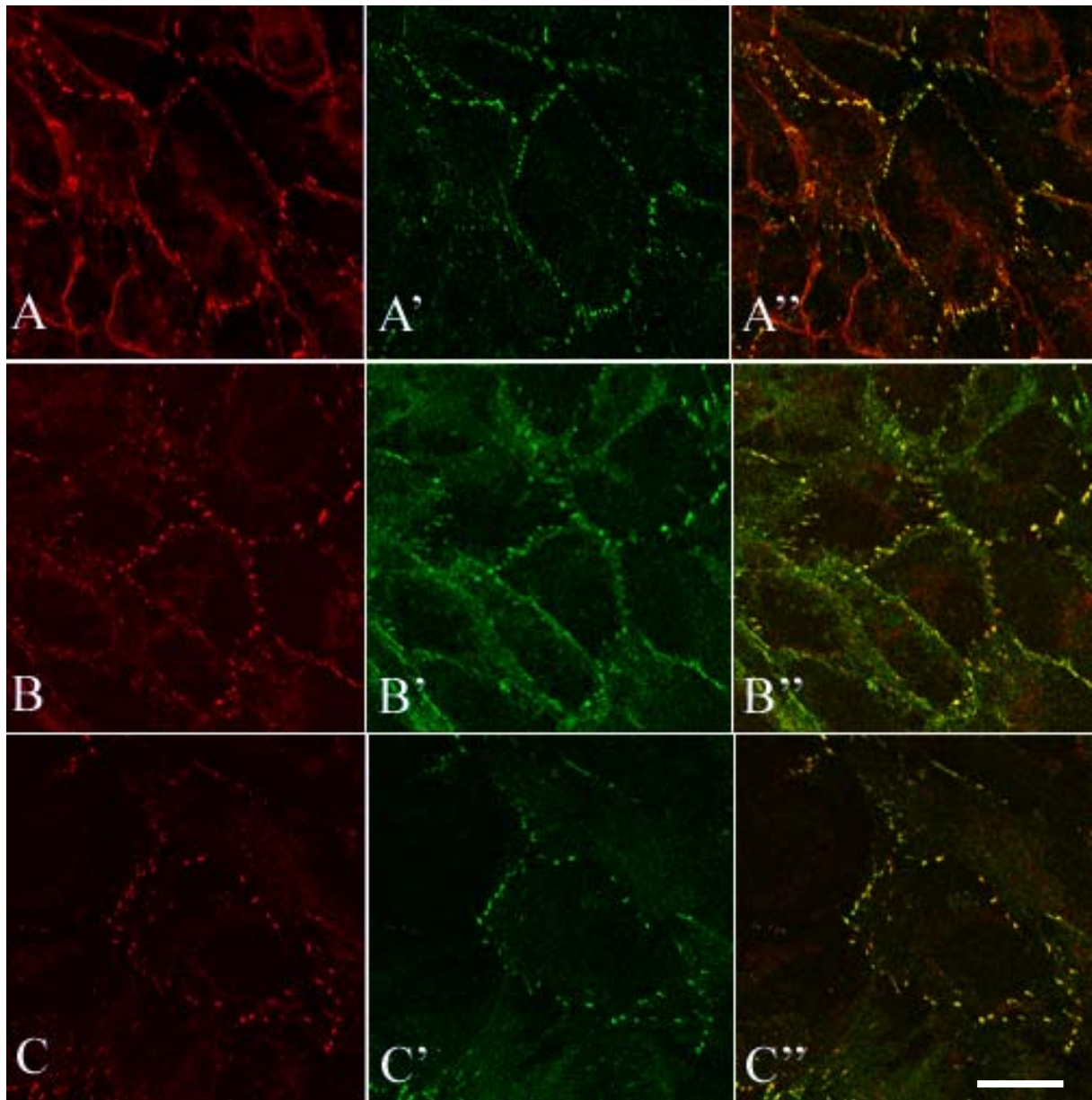


Abb. 8. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie von U333 Glioma-Zellen nach Reaktion mit Antikörpern gegen N-Cadherin (**A'**, **B**, **C**) zusammen mit solchen gegen β -Catenin (**A**), Protein p120^{ctn} (**B'**) bzw. PKP2 (**C'**). Die Misch-Aufnahmen zeigen vielfache Kollokalisierung (gelbe Farbe) von N-Cadherin mit β -Catenin (**A''**), Protein p120^{ctn} (**B''**) und PKP2 (**C''**). *Eichstrich:* 20 μ m.

Untersucht wurden auch die Zellverbindungen zwischen Glioma-Zellen, die VE-Cadherin als transmembrane Komponente erhielten: Auch hier erschien VE-Cadherin in punkt- bzw. strichförmigen Anordnungen an den Zell-Zell-Grenzen, allerdings nur in einen kleineren Teil der Zellen.

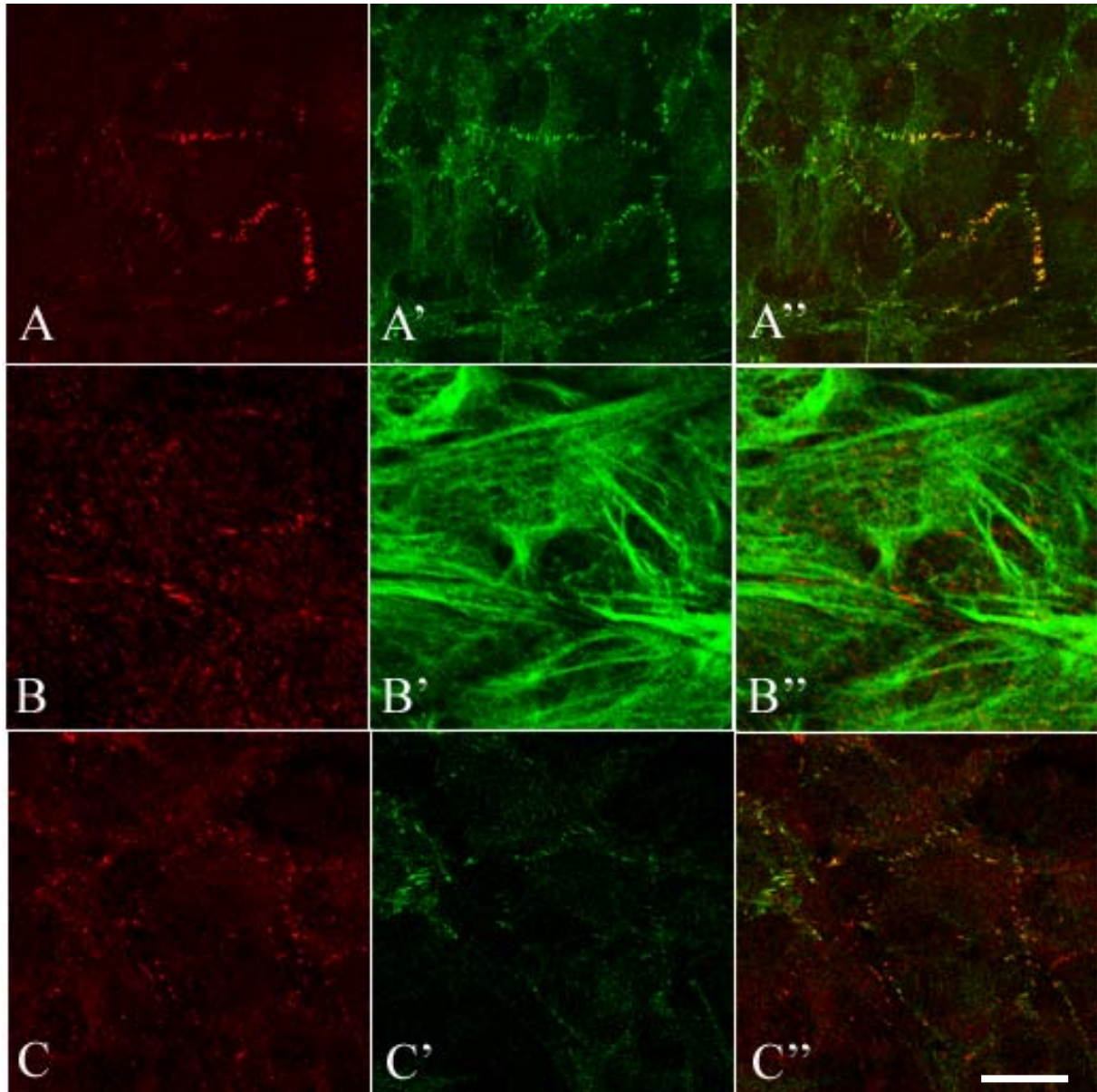


Abb. 9. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie von Glioma-Zellen mit Antikörpern gegen VE-Cadherin (**A**, **B**, **C**), β -Catenin (**A'**), GFAP (**B'**) und Plakophilin 2 (**C'**). Die Mischfarben-Aufnahmen (**A''-C''**) zeigen eine weitgehende Kolo-kalisierung von VE-Cadherin mit β -Catenin (gelbe Farbe in **A''**) bzw. mit Plakophilin 2 (PKP2; gelb-orange Färbung in **C''**). VE-Cadherin und PKP2 sind in einem punkt- bzw. strichförmigen Fluoreszenzmuster entlang der Zell-Zell-Grenzen angeordnet. GFAP-positive IF-Bündel (**B'**) erscheinen auch an VE-Cadherin-enthaltenden verankert zu sein (**B''**). *Eichstrich:* 20 μ m.

Beim Vergleich der Immunfärbung von VE-Cadherin mit der anderer AJ-Moleküle in der LSM kolokalisierte VE-Cadherin (**Abb. 9A, B, C**) mit β -Catenin (**Abb. 9A', A''**), Protein p120^{ctn}, Plakoglobin (nicht gezeigt) und teilweise auch mit Plakophilin 2 (**Abb. 9C', C''**).

Dagegen erschienen α -Catenin, β -Catenin und Protein p120^{ctn} oft in etwas ausgedehnteren Arealen im Vergleich zu VE-Cadherin, was mit dem eingeschränkten Vorkommen von VE-Cadherin erklärt werden könnte. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Glioma-Zellen große GFAP-IF-Bündel enthalten (**Abb. 9B'**), die an VE-Cadherin-haltigen Zellverbindungsstrukturen inserieren (**Abb. 9B, B''**). In manchen Zellen bzw. an manchen Stellen erschien das VE-Cadherin (**Abb. 10A**) auch in weitreichender Kolokalisierung mit α -Catenin (**Abb. 10B, C**). Bei der Untersuchung von Proteinen der TJ zeigte sich, dass auch „Non-arm“-Proteine wie z.B. die TJ-Proteine Cingulin (**Abb. 11A'**) und ZO-1 (**Abb. 11B'**) sowie das AJ Protein Afadin (**Abb. 11C'**) mit VE-Cadherin kolokalisierten.

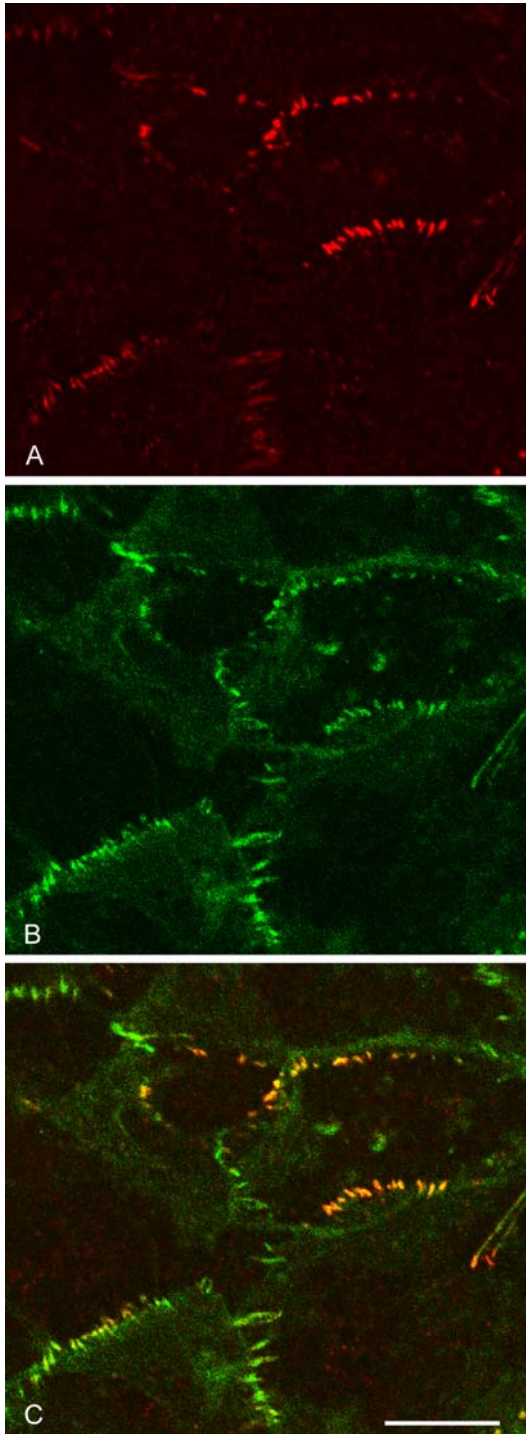


Abb. 10. Charakterisierung der VE-Cadherin-haltigen Zellverbindungen mit LSM durch Immunfärbungen mit Antikörpern gegen VE-Cadherin (A, C) und α -Catenin (B, C). α -Catenin zeigt etwas ausgedehntere Zellverbindungsstrukturen als VE-Cadherin. Beide Proteine kolokalisieren aber in distinkten Zell-Zell-Verbindungsstrukturen (C, *Puncta adhaerentia* oder *Fasciae adhaerentes*). *Eichstrich:* 10 μ m.

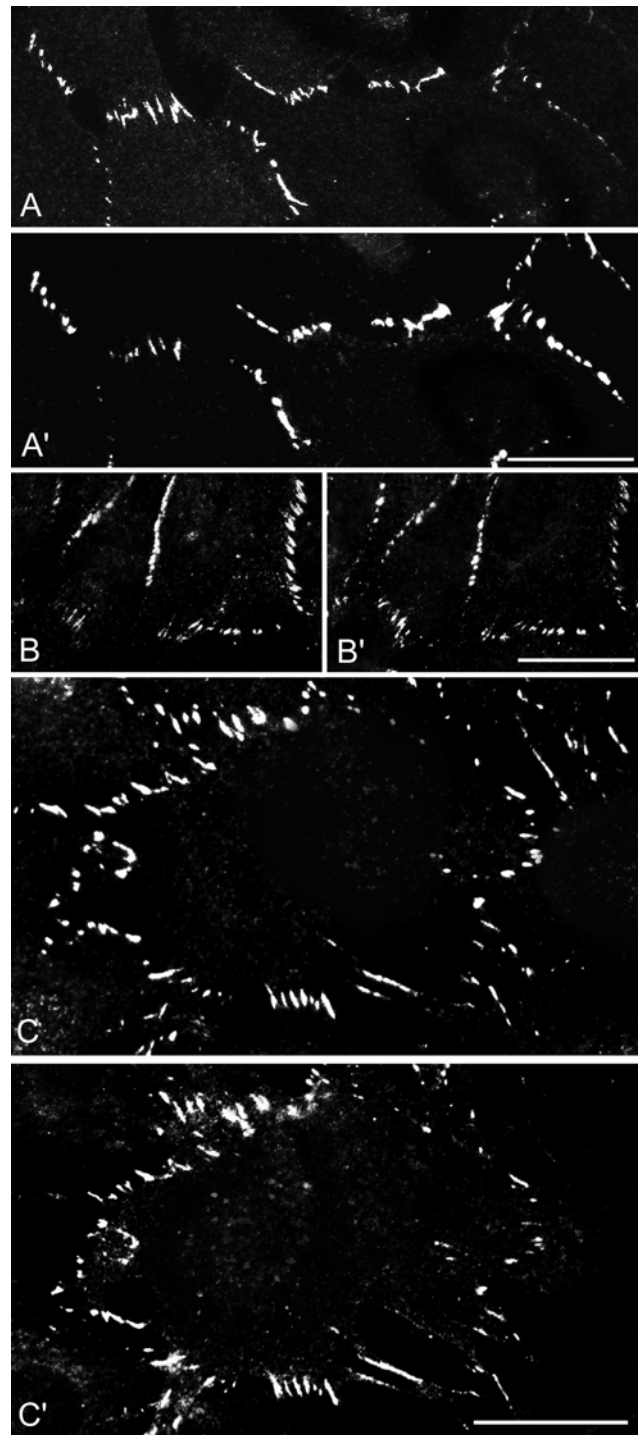


Abb. 11. Charakterisierung der VE-Cadherin-haltigen Zellverbindungen in der Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie. VE-Cadherin (A-C) kolokalisiert hier vielfach mit den „Non-arm“ Proteinen Cingulin (A'), ZO-1 (B') und Afadin (C'). *Eichstriche:* 10 μ m.

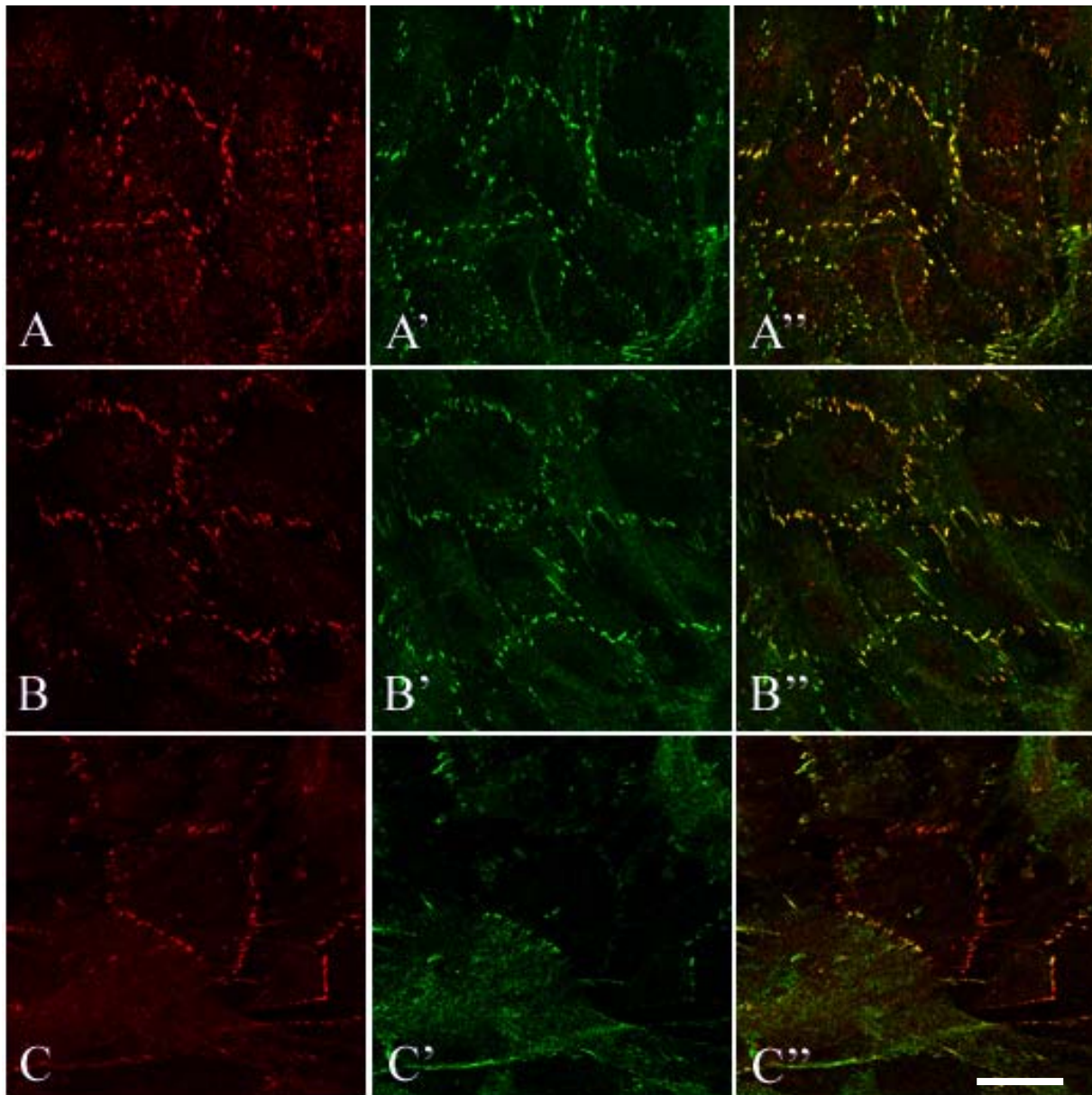


Abb. 12. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie von U333 Glioma-Zellen nach Reaktion mit Antikörpern gegen Cadherin-11 (**A**, **B**, **C**) bzw. β -Catenin (**A'**), Protein p120^{ctn} (**B'**) und α -Catenin (**C'**). Die Misch-Aufnahmen zeigen hier an vielen, aber nicht allen AJ-Strukturen eine Kolokalisierung (orange-gelbe Farbe in **A''**, **B''**, **C''**). *Eichstrich:* 20 μ m.

Cadherin-11 war in etwa 70-80% der Zellen positiv und zeigte - genau wie N- und VE-Cadherin - ein punkt- oder strichförmiges Lokalisierungsmuster an den Zell-Zell-Grenzen (**Abb. 12A**, **B**, **C**), wobei es an manchen, aber nicht allen Stellen mit verschiedenen AJ-Proteinen wie den *arm*-Proteinen Plakoglobin (nicht gezeigt), β -Catenin (**Abb. 12A'**) und Protein p120^{ctn} (**Abb. 12B'**) sowie mit α -Catenin kolokalisierte (**Abb. 12C'**; Mischfarbenaufnahmen in **Abb. 12A''**, **B''**, **C''**). Cadherin-11 kolokalisierte ebenso mit dem Non-*arm*-Protein Afadin (nicht gezeigt).

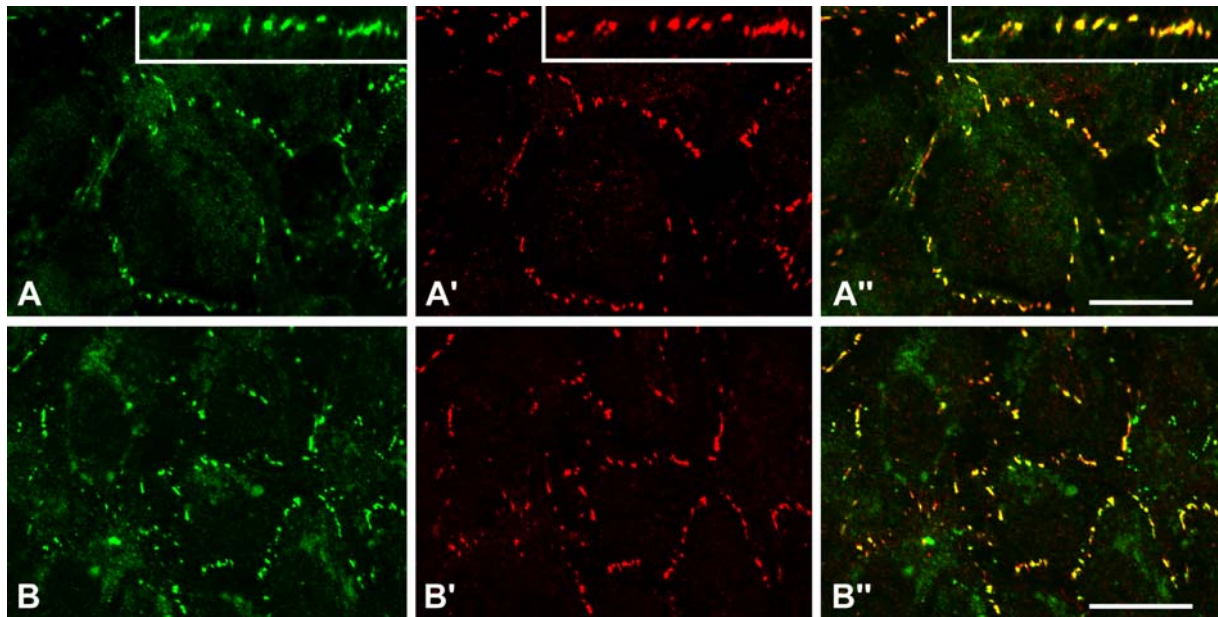


Abb. 13. Immunfluoreszenzmikroskopie von U333 Glioma-Zellen nach Doppelmarkierung: Cadherin-11 (**A**, **B**) kolokalisiert weitgehend mit Plakophilin 2 (PKP2; **A'**, gemeinsam in **A''**) und mit Protein ZO-1 (**B'**, gemeinsam in **B''**). Die Teilabbildungen (oben rechts) zeigen Kolokalisierung (**A''**) von Cadherin-11 (**A**) und PKP2 (**A'**) bei höherer Vergrößerung. *Eichstriche*: 10 μ m.

In LSM Untersuchungen kolokalisierten Cadherin-11 (**Abb. 13A**) und Plakophilin 2 (**Abb. 13A'**) ebenso weitgehend (**Abb. 13A''**) wie Cadherin-11 (**Abb. 13B**) mit Protein ZO-1 (**Abb. 13B'**). Beide Paare traten aber an manchen Stellen auch separat auf (**Abb. 13A'',B''**).

Beim Vergleich der Lokalisierung von N-Cadherin und VE-Cadherin in denselben Glioma-Zellen wurden die folgenden Ergebnisse erhalten:

VE-Cadherin - das nur in 20-30% der Zellen vorhanden war (und zwar ausschließlich in AJ) - erschien oft mit N-Cadherin (**Abb. 14A, A'**), in einigen Fällen an denselben Strukturen (**Abb. 14A'', B**) an anderen Stellen aber strikt getrennt. Cadherin-11 dagegen, das in diesen Versuchsreihen in ungefähr 80% der Zellen vorkam, und N-Cadherin (**Abb. 14C**) zeigten sowohl Beispiele ausgesprochener Kolokalisierung als auch getrennte lokale AJ-Anreicherungen (**Abb. 14C''**). Entsprechend verhielten sich auch Cadherin-11 (**Abb. 14D'**) und VE-Cadherin (**Abb. 14D**; Mischbild in **14D''**).

Diese Ergebnisse bestätigen in gewisser Weise auch die Immunpräzipitationen (Siehe auch **Abb. 5**).

Wegen ihrer eigenartigen, komplexen und teils spontan variablen Zusammensetzung sind diese AJ der Glioma-Zellen als eine getrennte Kategorie anzusehen. Wir fassen daher diese Strukturen unter dem Namen „*Colligatio permixta*“ (CP) zusammen. Sie fallen vor allem deshalb auf, weil sie typische Proteine aller drei Plaque-tragenden „Junctions“ (AJ, TJ, DES) enthalten.

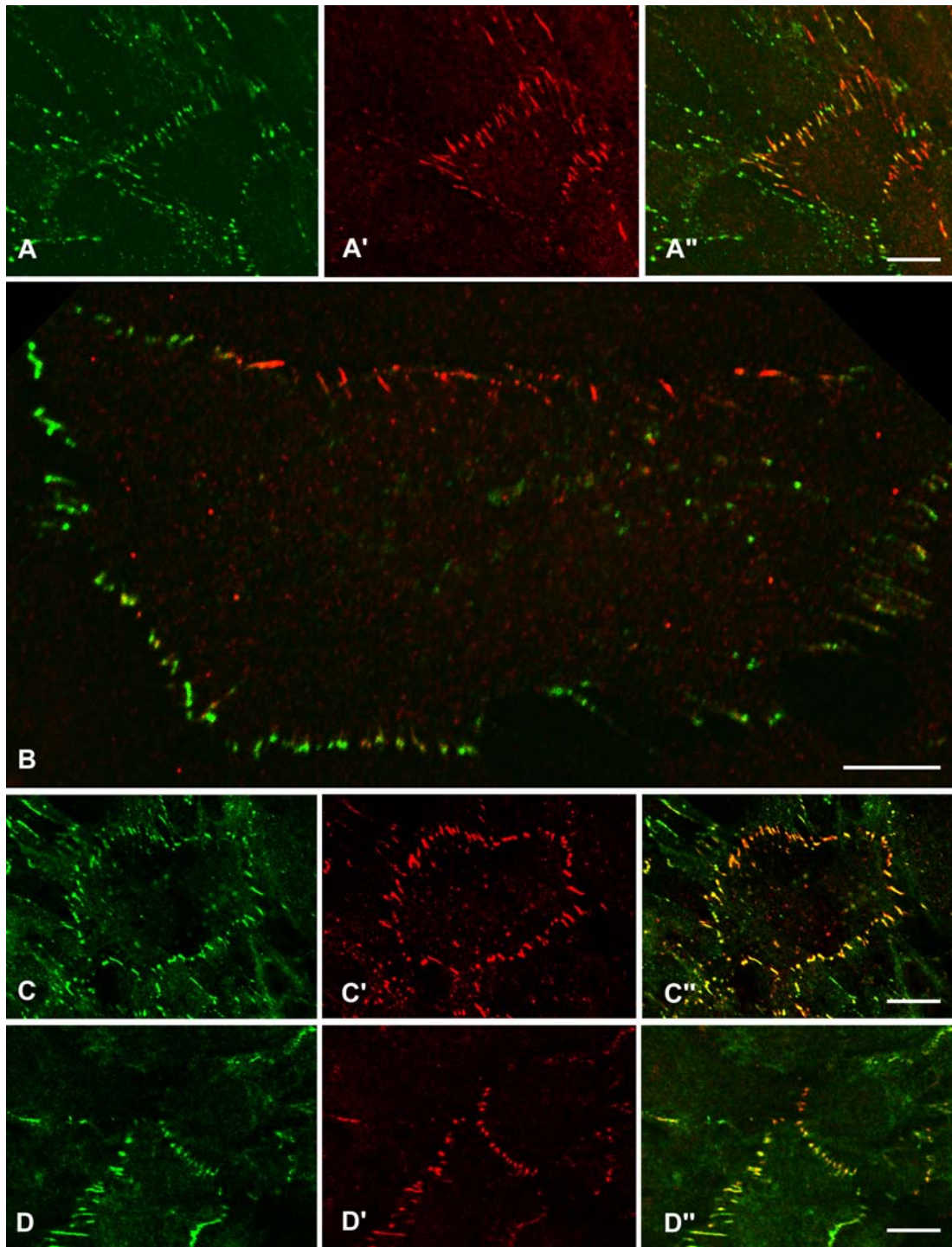


Abb. 14. Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie (LSM) von U333 Glioma-Zellen mit Antikörpern gegen N-Cadherin, VE-Cadherin und Cadherin-11. Die jeweiligen Misch-Aufnahmen zeigen ausschließliche wie auch überlappende Lokalisierungen. (A, A', A'') Vergleich der Lokalisierung von N-Cadherin (A) und VE-Cadherin (A'; A''). An den meisten AJ Stellen schließen sich in dieser Kolonie die beiden Proteine aus, einige wenige AJ jedoch (gelbe Mischfarbe in A'') zeigen Orte einer anscheinenden echten Kolokalisierung. (B) Hier ist nur die Misch-Aufnahme einer Zelle bei höherer Auflösung gezeigt: N-Cadherin (grün) und VE-Cadherin (rot) überlappen in ihrer Lokalisierung kaum; vielmehr scheint es in dieser Zelle spezifische „reinrassige“ N- bzw. VE-Cadherin-haltige AJ zu geben. (C, C', C'') Teilweise Kolokalisierung ist hier für N-Cadherin (C) und Cadherin-11 (C') zu erkennen (gelben Mischstrukturen in C''). (D, D', D'') Die Doppelimmunlokalisierung von VE-Cadherin (D) und Cadherin-11 (D') zeigt an einigen Stellen eine deutliche Kolokalisierung (D''). *Eichstriche:* 10 µm.

Die gleichzeitige Darstellung von N- und VE-Cadherin in derselben Zelle erforderte besonders gründliche Kontrollen, da bisher die Literatursage dominierte, dass in Endothelzellen, dem einzigen Zelltyp, in dem beide Cadherine bisher nachgewiesen waren, nur das VE-Cadherin in AJ-Strukturen, das N-Cadherin dagegen lediglich diffus verteilt auf der Zelloberfläche vorkamen (vgl. Salomon et al., 1992; Navarro et al., 1998; Dejana, 1996, 2004; siehe jedoch auch Schulze und Firth, 1993). Bei den Voruntersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurde jedoch etwas grundsätzlich Anderes festgestellt, und zwar mit ganz verschiedenen Antikörpern gegen diese Cadherine (siehe Material und Methoden): Vorausgesetzt, dass eine hinreichende Konzentration der bivalenten Kationen aufrecht erhalten wurde, lokalisierten beide Cadherine in *Zonulae adhaerentes* von Endothelzellen *in situ* wie in Kulturzellen der HUVEC und CPAE-Linien (hier nicht gezeigt). In den Glioma-Zellkulturlinien, in denen diese beiden Glykoproteine ebenfalls vorkamen, in denselben Zellen, erschien das N-Cadherin vornehmlich an Zell-Zell-Grenzen, entweder regional sich gegenseitig mit VE-Cadherin kolokalisierend, oder ausschließend (**Abb. 14. A-A'', B**). Es gab keine Hinweise auf einen Verdrängungsmechanismus, wie es etwa von Jaggi et al. (2002) beschrieben wurde (vgl. auch Navarro et al., 1998), dass also VE-Cadherin das N-Cadherin von Junctions verdrängen und dieses dann in der AJ-Struktur ersetzen würde. Entsprechende Befunde wurden kürzlich auch von anderen Autoren veröffentlicht (Luo und Radice, 2005), so dass das Vorkommen beider Cadherine in AJ derselben Zelle um als bewiesen gelten muß, sei es als „Mischung“ in denselben Strukturen oder in Form regional begrenzter „reinrassiger“ AJ-Typen. Dieses gilt nun in Prinzip auch für VE-Cadherin und Cadherin-11 (z.B. **Abb. 14 D-D''**).

4.1.6 Lokalisierung anderer Zellverbindungskomponenten

In Immunfluoreszenzmikroskopie-Untersuchungen von U333 Glioma-Zellen wurden auch starke AJ-nahe Reaktionen mit Antikörpern gegen Mitglieder der ERM Familie (Ezrin, Moesin und Merlin) beobachtet. Diese traten aber auch diffus an der Zelloberfläche und in Mikrovillus-artigen Zellausläufern auf. Drebrin dagegen erschien vor allem in den Lamellipodien der Zellen und in α -Actinin-haltigen Bereichen an der Zelloberfläche bzw. an fokalen Anheftungsstellen (nicht gezeigt; vgl. hierzu auch Peitsch et al., 1999, 2001). Zusätzlich wurden die Mikrofilamentbündel verankernden Plaques der fokalen Anheftungsstellen und der Zell-Zell-Verbindungen auch mit Antikörpern gegen Vinculin dargestellt (siehe **Abb. 2**).

4.1.7 Nachweise von VE-Cadherin und Protein p0071 mRNA in Glioma-Zellen mit RT-PCR

Um auszuschließen, dass es sich bei dem - gänzlich unerwarteten - Vorkommen von VE-Cadherin in Glioma-Zellen um eine Antikörper-Kreuzreaktion handelte, wurde auch die mRNA mit RT-PCR untersucht. Ein 400 bp Fragment vom VE-Cadherin wurde amplifiziert, als Positivkontrollen dienten die Endothelzellen HUVEC und CPAE, als Negativkontrolle MCF-7-Zellen. HUVEC-, CPAE- und U333 Glioma-Zellen gaben ein eindeutiges positives Signal, im Gegensatz zu MCF-7-Zellen und anderen Negativkontrollen (**Abb. 15**).

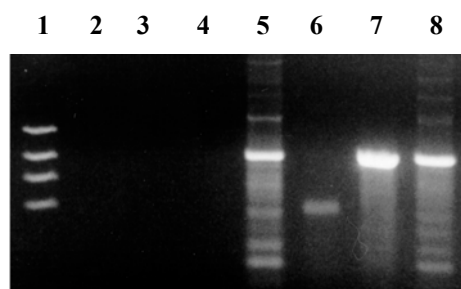


Abb. 15. RT-PCR-Nachweis der mRNA von VE-Cadherin in U333 Glioma-Zellen

Ein 400 bp Fragment der VE-Cadherin cDNA war in den Positivkontroll-Zellen der Linien CPAE (*Spur 5*) und HUVEC (*Spur 7*) ebenso zu erkennen wie in U333 Glioma-Zellen (*Spur 8*). MCF-7-Zellen (*Spur 6*) dienten als Negativkontrolle und zeigten kein solches PCR-Produkt. Weitere Negativkontrollen waren Ansätze ohne „Template“ (*Spur 2*), ohne „Sense-Primer“ (*Spur 3*) und ohne „Antisense-Primer“ (*Spur 4*). In *Spur 1* wurde eine „Größenstandard“-Mischung zum Vergleich aufgetragen (Bluescribe Vector, mit Hinf I verdaut, von oben nach unten: 517, 396, 356, 247 bp).

VE-Cadherin-mRNA konnte auch in anderen Glioma-Linien nachgewiesen werden, so in T98G- und U373MG-Zellen, ebenso in Primärkulturen von Balb/c Astrocyten (**Abb. 16**).

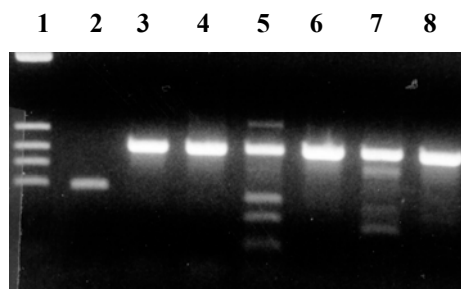


Abb. 16. RT-PCR Nachweis der mRNA von VE-Cadherin in verschiedenen Glioma-Zellkulturen

Ein 400 bp Fragment von VE-Cadherin erschien in HUVEC Zellen (*Spuren 3* und *4*), in Primärkulturen von Maus-Astrocyten (*Spur 5*), in den humanen Glioblastoma-Zellen der Linien T98G und U373MG (*Spuren 6* und *7*) und in U333 Glioma-Zellen (*Spur 8*). Als Negativkontrolle diente die cDNA von Caco-2-Zellen (*Spur 2*). In *Spur 1* wurde ein Größenstandard (Bluescribe Vector, mit Hinf I verdaut, von oben nach unten: 517, 396, 356, 247 bp) aufgetragen.

Das Vorkommen des vermeintlich desmosomalen Plaque-Proteins p0071 (vgl. Hatzfeld und Nachtsheim, 1996; Hatzfeld et al., 2003) war immunfluoreszenzmikroskopisch und proteinbiochemisch nicht endgültig zu klären. Zum Nachweis dieses Proteins wurde daher aus Glioma-Zellen Gesamt-RNA isoliert und mittels RT-PCR amplifiziert (**Abb. 17**). Als Positivkontrollen dienten menschliches Herzgewebe (*Spur 2*), mesenchymale Primärkulturen aus menschlichem Knochenmark (MSC, *Spur 5*) sowie HUVEC-Zellen (*Spur 6*) und als

Negativkontrollen Rinder-Augenlinsen-Gewebe (*Spur 1*) und Zellen der Menschen-Hepatocarcinom-Linie PLC (*Spur 3*).

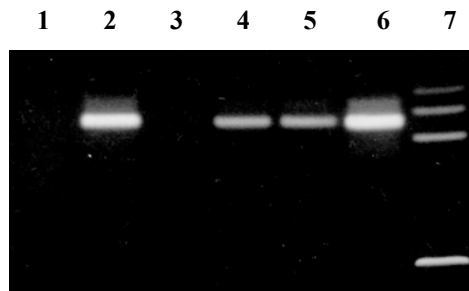


Abb. 17. RT-PCR Nachweis der mRNA von Protein p0071 in U333 Glioma-Zellen.

Als Negativkontrollen wurden cDNAs von Rinderlinsen-Gewebe (*Spur 1*) und PLC-Zellen (*Spur 3*) verwendet. Positiv reagierten: humanes Herz (*Spur 2*), U333 Glioma-Zellen (*Spur 4*), MSC- (*Spur 5*) und HUVEC- (*Spur 6*) Zellen. In *Spur 7* wurde ein DNA-Größenstandard (Bluescribe-Vektor, mit Hinf I verdaut) aufgetragen.

Protein p0071-mRNA war in humanem Herzgewebe, in U333 Glioma-Zellen, in humanen MSC-Zellen und in HUVEC-Zellen nachweisbar. Als Negativkontrollen wurden cDNAs von Rinderlinsen-Gewebe und PLC-Zellen bestätigt.

4.1.8 Elektronenmikroskopie

Anhand ihrer molekularen Zusammensetzung ließen sich die AJ-Typ Zell-Zell-Verbindungen in U333 Glioma-Zellen keiner der bisher beschriebenen „Junction“-Typen zuzuordnen. Sie schienen eine andere, neue Form von Zell-Zell-Verbindung *sui generis* darzustellen („*Colligatio permixta*“). Um diese anscheinend neuartige Zellverbindung morphologisch genauer zu untersuchen, wurden Ultradünnschnitte angefertigt und im Elektronenmikroskop untersucht.

Ultradünnschnitte durch Kulturen konfluent gewachsener Glioma-Zellen (**Abb. 18A-D**) ließen ausgedehnte, Plaque-assoziierte Membran-Membran-Kontakte erkennen. Normale elektronenmikroskopische Untersuchungen von mit Glutaraldehyd fixierten Zellen wiesen dabei oft ausgedehnte Zell-Zell-Verbindungszonen mit einem elektronendichten cytoplasmatischen Plaque auf, an dem sowohl Bündel von Intermediärfilamenten als auch Mikrofilamente anzusetzen schienen. Der Membran-Membran-Abstand betrug dabei etwa 10-25 nm. Manchmal war eine gepunktete „Midline“-Struktur zu beobachten, oder die Membranen erschienen durch ein fein filamentöses interzelluläres Material verbunden.

Die Verteilung der an den Zellverbindungsstrukturen beteiligten Proteine wurde auch mit Hilfe der Immunelektronenmikroskopie (**Abb. 18E-I**, **Abb. 19**) untersucht. Dabei wurden sowohl Einzel-Immungold-Lokalisierungen als auch welche mit Silberverstärkung eingesetzt. Antikörper gegen Protein ZO-1 (**Abb. 18E, F**), Cingulin (**Abb. 18G**), PKP2 (**Abb. 18H, I**) und VE-Cadherin (nicht gezeigt) zeigten allesamt eine Lokalisierung in den elektronendichten

Plaques der gesamten Zell-Zell-Verbindungszone. PKP2 wies dabei eine besonders membran-nahe Markierung auf: Sie schien manchmal sogar im extrazellulären Spalt zu liegen, vermutlich als Folge der besonders Plasmamembran-nahen Lage des hier reaktiven Epitops (vgl. Mertens et al., 1996). Eine ähnliche Lokalisierung wurde auch mit einigen Antikörper gegen N-Cadherin beobachtet (**Abb. 19**).

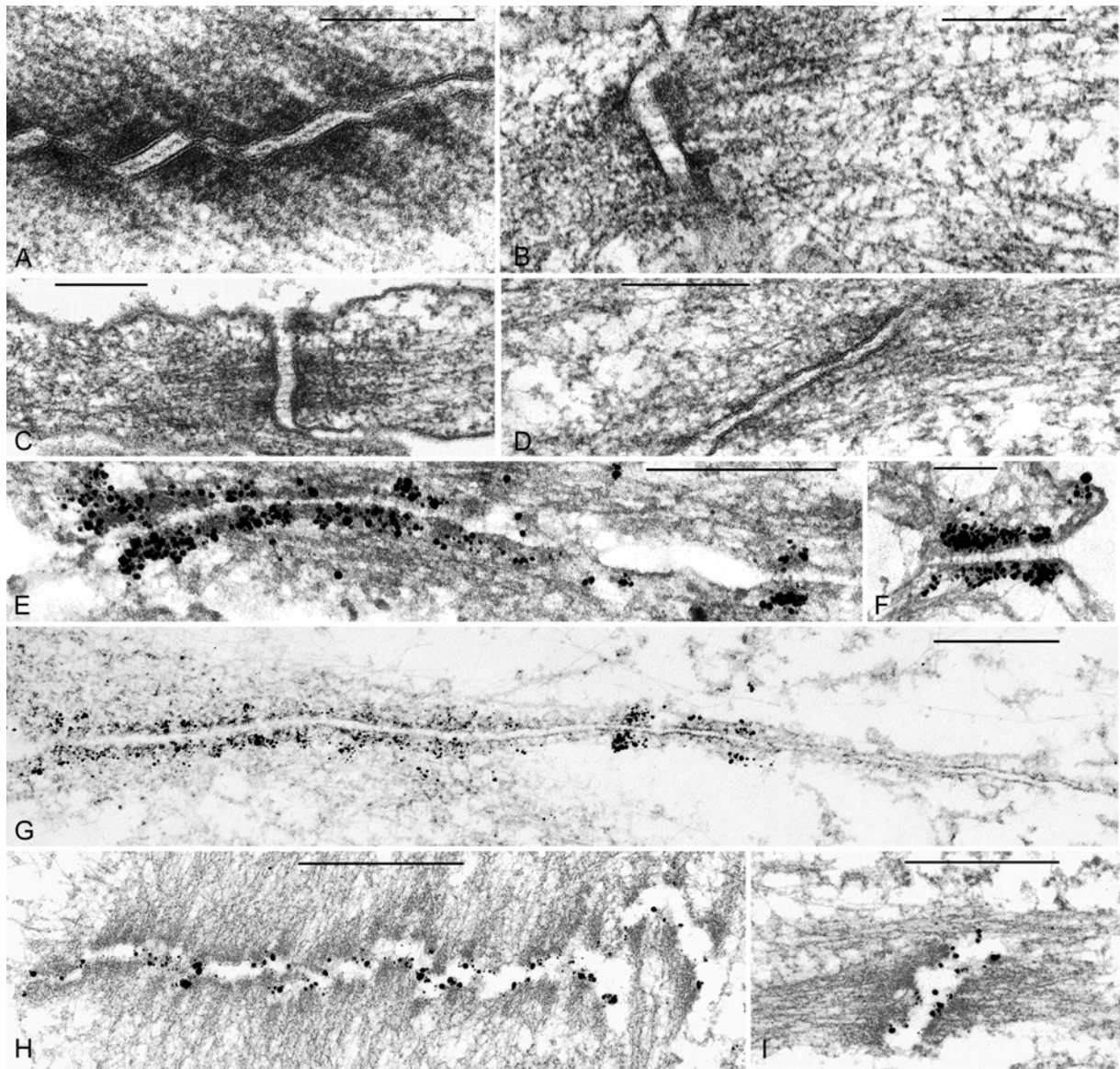


Abb. 18. Elektronenmikroskopische Darstellung von Ultradünnschnitten durch Zell-Zell-Verbindungen von U333 Glioma-Zellen.

(A-C) Transmissionselektronenmikroskopische Bilder von mit Glutaraldehyd fixierten Zellen. Lange, dicht nebeneinander liegende Zell-Zell-Verbindungen (*Fasciae adhaerentes*-artig) sind mit elektronendichten cytoplasmatischen Plaques assoziiert, die Cytoskelett-Filamente verankern. Der interzelluläre Abstand der Membranen beträgt 10-25 nm und lässt manchmal eine punktierte „Midline“-Struktur oder fein filamentöse Quer-Strukturen erkennen.

(E, I) Immunelektronenmikroskopie von durch Silberreaktion verstärkten Immungold-Lokalisierungen mit Antikörpern gegen Protein ZO-1 (E, F), Cingulin (G) und Plakophilin 2 (H, I). Alle diese Proteine sind Teil der Plaque-Struktur. Plakophilin 2 (H, I) zeigte dabei eine besonders membrannähe Färbung (vgl. Mertens et al., 1996; zu PKP 1 und 3 siehe auch Schmidt et al., 1997, 1999; North et al., 1999).

Eichstriche: (A-D), 0,2 µm; (E-I), 0,5 µm.

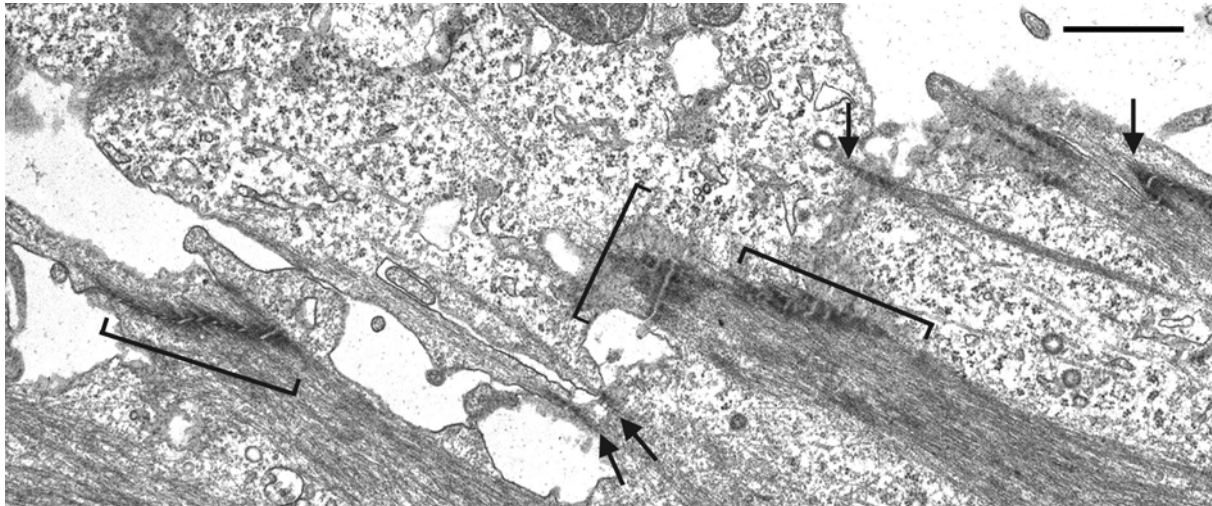


Abb. 19. Übersichtsaufnahme (Präparat in **Abb. 18 A-D**) einer Kontaktregion von zwei Glioma-Zellen in der die Größen- und Anordnungsunterschiede von AJ-Verbindungsstrukturen (relativ kleine mit Pfeilen, größere bzw. „Batterien“ mit Klammern bezeichnet) auffällig sind. *Eichstrich*, 1µm.

4.1.9 Zellverbindungen in Primärkulturen von Astrocyten der Maus (Balb/c)

Die bereits erwähnten primären Balb/c Astrocyten-Kulturen (siehe auch **Abb. 4**) sind morphologisch den U333-Glioma-Zellen sehr ähnlich, auch in der Reaktion mit Antikörpern gegen GFAP im Immunblot-Verfahren (**Abb. 4, Spur 1**) und in der Immunfluoreszenzmikroskopie (**Abb. 20A**). Kontaminationen etwa durch endotheliale Zellen wurden hier ebenfalls durch die negative Reaktion von Antikörpern gegen Faktor VIII bzw. den von-Willebrand-Faktor ausgeschlossen (nicht gezeigt).

Um primäre Astrocyten mit den Astrocyten-Linien zu vergleichen, wurden die Strukturproteine immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Subkonfluente Balb/c Astrocyten-Kulturen ließen mit Antikörpern gegen GFAP (**Abb. 20A**) eine stark positive Filamentbündel-Reaktion im Cytoplasma erkennen. Auch N-Cadherin (**Abb. 20B**) und Cadherin-11 (nicht gezeigt) waren in allen Zellen positiv, VE-Cadherin (**Abb. 20C**) dagegen nur in etwa 10% der Zellen. Plakophilin 2 (**Abb. 20D**), Protein ZO-1 (**Abb. 20E**), Ponsin (**Abb. 20F**), Afadin, α - und β -Catenin und Protein p120^{ctn} waren ebenfalls durchweg positiv (nicht gezeigt).

Alle Ergebnisse wurden in Immunblot-Analysen bestätigt (siehe auch **Abb. 4**). Das Vorhandensein von Ponsin, einem Mitglied der Nectin-Afadin-Ponsin-Gruppe, war besonders interessant, da hier nur ein Antikörper zur Verfügung stand, der Maus-spezifisch war.

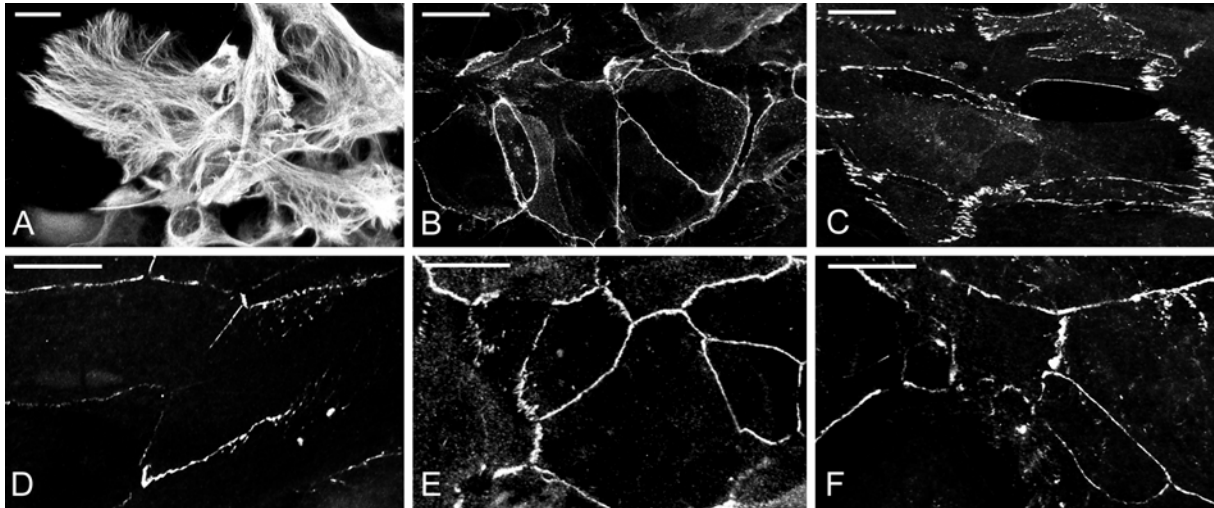


Abb. 20. Immunfluoreszenzmikroskopie von Cytoskelett-Filament- und AJ-Proteinen in primären Mäuse- (Balb/c) Astrocyten-Kulturen. Die Zellen zeigten eine positive Reaktion mit Antikörpern gegen GFAP (A) und N-Cadherin (B), so ihre astrocytäre Herkunft und Differenzierung bestätigend. AJ in diesen Zellen enthielten unter anderem auch - in einem Teil der Zellen - VE-Cadherin (C), Plakophilin 2 (D), Protein ZO-1 (E) und Ponsin (F). *Eichstriche:* 20 μm .

4.1.10 Klonierung der U333 Glioma-Zell-Sublinien

Zur Klärung der Frage, ob die molekulare Diversität der Cadherin-Ausstattung eine Eigenschaft der Glioma-Zellen selbst ist, die stabil ist bzw. sich reproduzieren lässt, oder ein seltenes, spontanes klonales Ereignis, das zu keiner einheitlichen Nachkommenschaft führt, wurden U333 Glioma-Zellen nach großer Verdünnung kloniert wie für andere Zelltypen ausführlich beschrieben (Knapp und Franke, 1989; Franke et al., 1989), und die Klone auf das Vorkommen von N-Cadherin, VE-Cadherin, Cadherin-11, GFAP und die diversen Plaque-Proteine untersucht.

50 von 60 untersuchten Zellklonen wiesen so eine positive Reaktion für alle drei Cadherine auf, und zwar in einem ähnlichen Muster wie die Ausgangs-Zelllinie: Alle Klone waren z.B. GFAP- und N-Cadherin-positiv (**Abb. 21A; 22**), in etwa 70% der Zellen wurde Cadherin-11 nachgewiesen (**Abb. 22**) und etwa 20% der Zellen waren durch AJ mit VE-Cadherin verbunden (**Abb. 21B**). Es war anscheinend nicht möglich, einen „reinrassigen“, d. h. nur einen Cadherin-Typ bildenden Klon zu erhalten. Diese „Heterogenität“ ist also ein sich immer wieder einstellendes Ereignis der U333 Glioma-Zellen selbst.

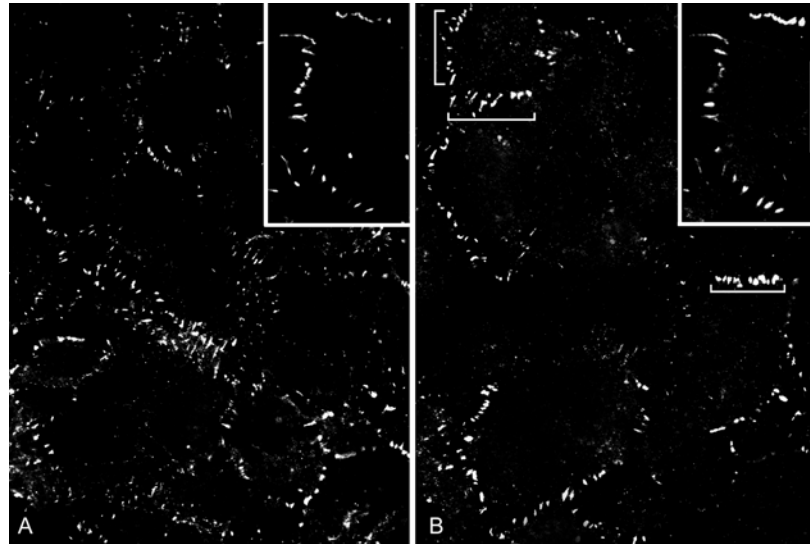


Abb. 21. Spontanes Wiedererscheinen (Doppelimmunmarkierung) der Komplexität und Heterogenität der Glioma-Zellverbindungen (AJ) in einem Klon (Nr. 43), untersucht mit Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie. Alle Zellen bilden AJ mit N-Cadherin (A), einige Zellen bilden aber auch VE-Cadherin-positive Zellverbindungen (B). Die höhere Vergrößerung in den Insertionsbildern (rechts oben) beweist eine weitgehende Kolokalisierung. Die Klammern (in B) weisen hier auf Zellverbindungsstrukturen hin, die weitgehend nur VE- aber kein N-Cadherin enthalten. *Eichstrich:* 20 µm.

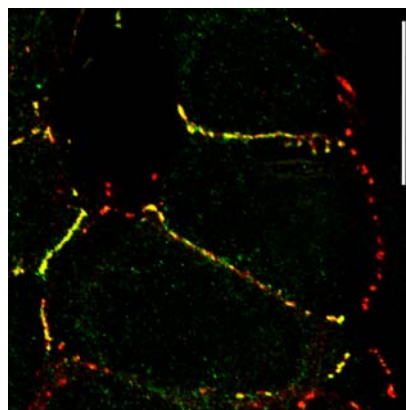


Abb. 22. Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie: Kolokalisierung (gelb) und separates Vorkommen von Cadherin-11 (grün) und N-Cadherin (rot) in einem U333 Glioma-Zell-Klon (Nr. 20). Nur die Misch-Aufnahme ist hier vorgestellt. Die gelbe Farbe beweist das Vorkommen von Kolokalisierungen neben einer Vielzahl von reinen N-Cadherin-haltigen AJ (rot). *Eichstrich:* 20 µm.

4.1.11 Bildung heterotypischer Zell-Zell-Verbindungen von Glioma-Zellen in Mischkulturen

In situ können Astrocyten bzw. Astrocytom-Zellen heterotypische Kontakte mit Endothelzellen und Neuronen bilden (vgl. z.B. Literatur bei Duan et al., 2004; Hamm et al., 2004; siehe auch „Diskussion“). Somit erhob sich die Frage, ob die Glioma-Zellen auch in Ko-Kultur mit anderen Zelltypen - wie z.B. Endothelzellen - heterotypische Junctions bilden können. Deshalb wurden Mischkulturen von Glioma- und Rinderendothel (CPAE) -Zellen angesetzt und mit Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie untersucht.

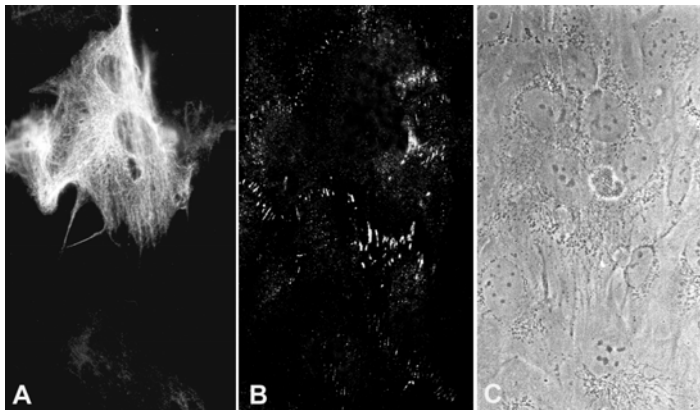


Abb. 23. Immunfluoreszenzmikroskopie von Mischkulturen aus menschlichen Glioma U333- und CPAE-Rinderendothel-Zellen nach Reaktion mit Antikörpern gegen GFAP (**A**) und VE-Cadherin (**B**; Phasenkontrastbild **C**). Die Glioma-Zellen sind durch ihre positive Reaktion mit Antikörpern gegen GFAP zu erkennen, und einige grenzen direkt an VE-Cadherin-positive, GFAP-negative Rinderendothel-Zellen. *Eichstrich*, 20 μm .

Einige Glioma-Zellen bildeten auch in diesem Modell-Versuch VE-Cadherin-haltige AJ-Verbindungen mit CPAE-Zellen aus (**Abb. 23**): Man beachte, dass hier GFAP-IF-Bündel-positive Zellen (**A**) auch durch VE-Cadherin-positive Zellverbindungen mit GFAP-negativen Rinder-Nachbarzellen gekoppelt erscheinen (vgl. z.B. **B** und **C**), was zumindest in Bezug auf den Zelltyp heterotypische Kopplung anzeigt.

4.1.12 Zur molekularen Zusammensetzung der Zell-Zell-Adhärenz-Verbindungen in humanen Glia-Tumoren

Bestimmte von Astrocyten abgeleitete Gliome gehören zu den häufigsten und bösartigsten Primärtumoren des zentralen Nervensystems. Sie werden gemeinhin nach histopathologischen Kriterien in die in der **Tabelle 7** aufgeführten Gruppen eingeteilt (Kleihues und Cavenee, 1997, 2002).

Die WHO („World Health Organisation“)-Klassifizierung (Grad I-IV, hoch-/ niedrig-gradig) teilt solche Tumoren nach ihrer Wachstumsrate sowie noch neuropathologischen Merkmalen (Zahl der Mitosen, Atypie der Zellkerne, mikrovaskuläre Proliferation und Nekrosen) ein. Die pathologische Erkennung, Abgrenzung und Differentialdiagnose von Gliomen beruht bisher wesentlich auf etablierten molekularen bzw. immunhistochemischen Merkmalen („Markern“) wie den Intermediärfilament-Proteinen GFAP und Vimentin, mehreren neuroendokrinen Proteinen wie z.B. S100, Neuronen-spezifischer Enolase (NSE), Synaptophysin und Chromogranin und allgemeinen „Tumor-Markern“ wie Mib-1, Ki67, EMA („Epithelial Membrane Antigen“; Synonyme: MUC-1, Episialin, CD227) und Protein p53. Strukturell differenziert erscheinende astrocytäre und oligodendrogliale Tumoren sind dabei meist

histologisch-diagnostisch gut abgrenzbar. Die Unterscheidung jedoch - etwa zwischen einem anaplastischen Oligodendrogliom, einem anaplastischen Astrocytom oder einem Glioblastom - kann derzeit wegen des Mangels an histologischen Kriterien und „Marker“-Proteinen für oligodendrogliale Komponenten Probleme bereiten (vgl. z.B. Cairncross und Macdonald, 1988; Ino et al., 2001; Kleihues et al., 2002). Für solche und andere differentialdiagnostische Probleme braucht man daher weitere zuverlässige molekularbiologische Marker.

Tab. 7. Die aktuelle WHO („World Health Organisation“-)Einteilung von Tumoren glialer Herkunft (Kleihues und Cavane, 1997).

<p>1. Astrocytäre Tumoren</p> <p>a) Diffuses Astrocytom (WHO Grad II) fibrillär/ protoplasmisch/ gemistocytisch</p> <p>b) Anaplastisches Astrocytom (WHO Grad III)</p> <p>c) Glioblastom (WHO Grad IV) - Riesenzell-Glioblastom - Gliosarkom</p> <p>d) Pilocytisches Astrocytom (WHO Grad I)</p> <p>e) Pleomorphes Xantho-Astrocytom</p> <p>f) Subependymales Riesenzell-Astrocytom (<i>Sclerosis tuberosa</i>)</p> <p>2. Oligodendrogliale Tumoren</p> <p>a) Oligodendrogliom</p> <p>b) Anaplastisches Oligodendrogliom</p> <p>3. Gemischte Tumoren</p> <p>a) Oligoastrocytom</p> <p>b) Anaplastisches Oligoastrocytom</p>
--

Bisher wurden bei der pathologischen Diagnose von Gliomen praktisch keine Antikörper gegen „Junction“-Proteine benutzt, in Gegensatz etwa zu Hirntumoren meningeothelialer Herkunft („Meningiome“; vgl. z.B. Kartenbeck et al., 1984; Scheckheiner et al., 1984; Schweckheiner, 1990; Akat et al., 2003). Es fehlte bisher auch eine grundlegende Charakterisierung der Adhärenz-Verbindungen von verschiedenen Glioma-Tumoren. Deshalb wurden in einer ersten kurzen Orientierungsarbeit, ausgehend von den vorstehend geschilderten Ergebnissen zur Zusammensetzung der Zell-Zell-Verbindungen von Glioma-Kulturzellen, die Zellverbindungsproteine von Glioma-Tumoren an Gewebeschnitten mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht, auch um so eventuell diagnostisch relevante molekulare Leitmerkmale für verschiedene Glia-Tumor-Gruppen zu finden. Dazu wurden Tumorschnittpräparate verschiedener Herkunft (von Prof. Dr. György Csécséi[†] und

Dr. Àmos Klekner, Neurochirurgische Klinik, Universität Debrecen, Ungarn, bzw. von Herrn Prof. Dr. Markku Miettinen, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, USA) an Kryostatschnitten wie an Schnitten durch Formaldehyd-fixiertes, in Paraffin eingebettetes Tumorgewebe untersucht. Hier sollen beispielhaft nur einige erste Ergebnisse kurz vorgestellt werden; eine ausführlichere spezielle Darstellung mit Fach-Pathologen als Ko-Autoren wird an anderer Stelle erfolgen.

4.1.12.1 Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Gewebeschnitten

Da die tiefgefrorenen Tumorgewebeproben sehr klein waren, konnten nur bei wenigen Kryostatschnitte angefertigt werden. Als Beispiel ist in **Abb. 24** ein solcher Tumor („high grade“ *Glioblastoma multiforme*) vorgestellt, der sich einerseits als GFAP-positiver Tumor darstellte (Tumor Nr. D9; **Abb. 24A**), andererseits aber auch sowohl mit Antikörpern gegen N-Cadherin (**Abb. 24B**) und VE-Cadherin (**Abb. 24C**) als auch mit solchen gegen α - und β -Catenin, Protein p120^{ctn}, Protein ZO-1, Cingulin und Afadin reagierte, hier aber nicht mit solchen gegen Plakophilin 2 und Neurojungin. Antikörper gegen VE-Cadherin reagierten in diesem Tumor also nicht nur mit Blutgefäßen sondern auch mit Zell-Zell-Grenzen der astrocytär abgeleiteten Tumorzellen. Der endotheliale Faktor VIII war dabei nur in den Gefäßen innerhalb des Tumors, nicht jedoch in den Tumorzellen positiv (nicht gezeigt). Dies beweist, dass Zellverbindungen des in Zellkultur beschriebenen Typs, d.h. mit einem verbreiteten Vorkommen von N- wie VE-Cadherin, aber auch solche mit Cadherin-11 (hier nicht gezeigt), in Tumorgeweben vorkommen können und dass solche Kriterien folglich zur Diagnose herangezogen werden können.

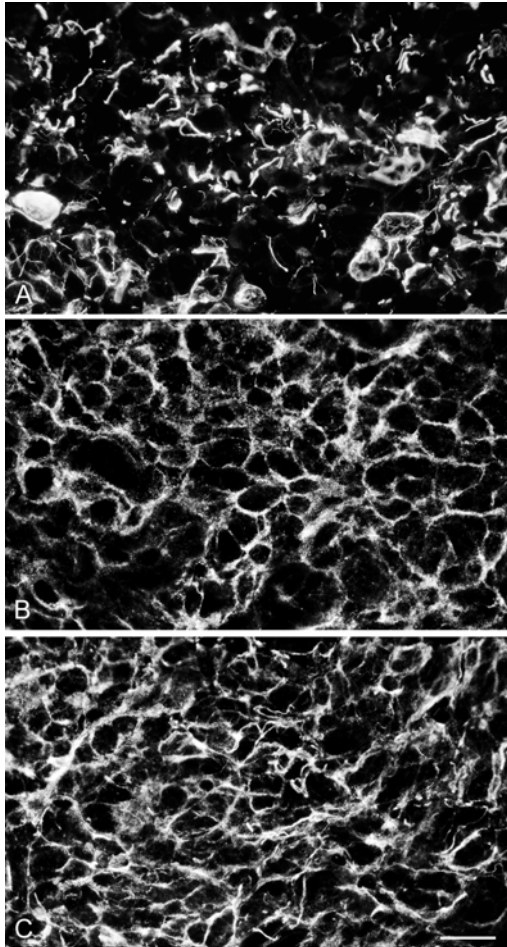


Abb. 24. Immunfluoreszenzmikroskopie von Kryostat-Schnitten eines humanen Gliomas („high grade“ *Glioblastoma multiforme* „grade IV“; Tumor Nr. D9). Fast alle Zellen dieses Tumors sind stark GFAP-positiv (A), ebenso reagieren sie mit Antikörpern gegen N-Cadherin (B) und VE-Cadherin (C).

Eichstrich: 20 µm.

Die Ergebnisse einer ersten umfangreicheren histochemischen Untersuchung an Schnitten durch Formaldehyd-fixierte, in Paraffin eingebettete Tumorgewebebeobachten, die nach der „Antigen Retrieval“-Methode aufbereitet wurden, sind in **Tabelle 8** zusammengefasst.

Unter diesen Glioma-Tumoren, die mit der „Antigen Retrieval“-Methode behandelt und in der Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht worden waren, wiesen Antikörper gegen VE-Cadherin ausschließlich in einem *Glioblastoma multiforme* (Tumor Nr. 3223) eine positive Reaktion auf. N-Cadherin dagegen wurde in 6 von 7 dieser Tumore sowie in beiden Glioblastom-Rezidiven, aber nicht in Oligodendrogliomen oder in dem untersuchten *Glioma mixtum* gefunden. Cadherin-11 wurde in einem *Glioblastoma multiforme* und in einem Rezidiv eines *Glioblastoma multiforme* nachgewiesen, α -Catenin in 6 von 7 Glioblastom, in beiden Rezidivtumoren und in keinem der Oligodendrogliome oder in dem *Glioma mixtum*.

Tab. 8. Zusammenfassung der Ergebnisse immunfluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen nach „Antigen Retrieval“ an einer kleinen Reihe humaner mit Formaldehyd fixierter, in Paraffin eingebetteter Gliome. **Abkürzungen:** GBM: *Glioblastoma multiforme*, ODG: Oligodendrogliom, Nr.: Nummer, P.D.: pathologische Diagnose, VE-Cad: VE-Cadherin, N-Cad: N-Cadherin, Cad 11: Cadherin-11, α -Cat: α -Catenin, β -Cat: β -Catenin, p120: Protein p120^{ctn}, PKP2: Plakophilin 2, ZO-1: Protein ZO-1, AF: Afadin, Vim: Vimentin.

Tumor-Art	Proben-Nr.	P. D.	VE-Cad	N-Cad	Cad 11	α -Cat	β -Cat	p120	PKP2	ZO-1	AF	GFAP	Vim
GBM	9097/01	GBM	-	(+)	-	(+)	+	(+)	-	-	-	+	+
	127/00	GBM IV	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
	3223	GBM	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
	2995/00	GBM III	-	(+)	-	-	+	-	-	-	-	+	+
	7341/00	GBM IV	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	8329/00	GBM	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
	4034/00	GBM	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
GBM Rezidiv	5092/01	Rezidiv	-	+	+	+	+	(+)	+	-	+	(+)	++
	14275/00	Rezidiv	-	+	-	+	(+)	-	-	-	-	+	+
ODG	2726/00	ODG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	9096/01	ODG	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Glioma mixtum	4592/00	Glioma mixtum	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

-: negative Reaktion
Reaktion

+: positive Reaktion

(+): teilweise oder schwach positive

Die Reaktion auf β -Catenin entsprach im Vorkommen dem α -Catenin (Positivität in 5 von 7 Glioblastomen und in beiden Rezidivtumoren; beide Oligodendrogliome und das *Glioma mixtum* waren negativ). Protein p120^{ctn} dagegen wurde hier nur in 2 von 7 Glioblastomen und in dem einzigen Rezidivtumor nachgewiesen. PKP 2 wurde nur im Rezidiv eines Glioblastoma angetroffen, Protein ZO-1 nur in 2 von 7 Glioblastomen. Vimentin war in 5 von 7 Glioblastomen, beiden Rezidivtumoren, einem der beiden Oligodendrogliome und dem *Glioma mixtum* leicht nachzuweisen.

4.2 *Processus adhaerentes*: Neuartige Zellverbindungsstrukturen von mesenchymalen Stammzellen (MSC) in Kultur

Aus Säugetier-Knochenmark können mindestens zwei Arten von sog. Stammzellen gewonnen und in Zellkultur gehalten werden: die „hämatopoetischen Stammzellen“ (HSC) und die „mesenchymalen Stammzellen“ (MSC). Ähnliche Zellkulturen lassen sich auch aus bestimmten anderen Zelltypen gewinnen, so z.B. vom Nabelschnur-Blut (vgl. Friedenstein et al., 1976; Wexler et al., 2003).

MSC aus menschlichem Knochenmark - meist als Aspirat gewonnen - können *in vitro* über mehrere Passagen ohne merkliche Einschränkung ihrer Differenzierungsfähigkeit vermehrt und zur Differenzierung bestimmter Zell- und Gewebetypen veranlasst werden (u. a. Jaiswal et al., 1997; Ferrari et al., 1998; Yoo et al., 1998; Pittenger et al., 1999; Sanchez-Ramos et al., 2000; Fukuda, 2002; Herzog et al., 2003; Verfaillie et al., 2003; Jiang et al., 2005). Die zell- und molekularbiologischen Eigenschaften dieser - in jüngster Zeit bis in die Tagespresse hinein hoffnungsvoll diskutierten - Zellen sind aber noch weitgehend unbekannt. Insbesondere die Zell-Zell-Verbindungen der MSC sind nicht einmal ansatzweise charakterisiert. Während die in dieser Arbeit entdeckte und molekular definierte *Colligatio permixta* einen - wie schon der Name sagt - besonderen Mischtypus darstellt, fiel bei Parallelversuchen an anderen, nicht-epithelialen Zellkulturen eine beeindruckend z.T. große und komplexe Struktur mit besonderen, oft sehr kleinen Junctions einer recht einfachen Zusammensetzung auf: verschieden lange, villi- oder vermiforme Zellfortsätze (*Processus adhaerentes*), die mit *Puncta adhaerentia* bzw. längeren, daraus wohl durch Fusion hervorgegangenen, manschettenartigen, Zellen verzahnenden Strukturen (*Manubria penita*) besetzt sind. Wegen der grundsätzlichen Bedeutung dieser Strukturen und der offensichtlichen Fähigkeit der *Processus*, eben nicht nur benachbarte, sondern auch z.T. sehr entfernte Zellen miteinander zu verbinden, wurden diese Fortsätze und ihre Zellverbindungsstrukturen ebenfalls zell- und molekularbiologisch charakterisiert.

4.2.1 MSC-Kulturen

In der Phasenkontrastmikroskopie (**Abb. 25**) wiesen die MSC-Kulturen aus menschlichem Knochenmark eine spindelförmige bzw. fibroblastoide Morphologie des Zellkörpers auf. Viele der Zellen bildeten aber auch neuriten-artige lange Fortsätze, die besonders gut in den

Zell-Zwischenräumen spärlicher Kulturen zu beobachten (**Abb. 25A**), jedoch in konfluent gewachsenen Kulturen (**Abb. 25B**) kaum mehr zu erkennen waren.

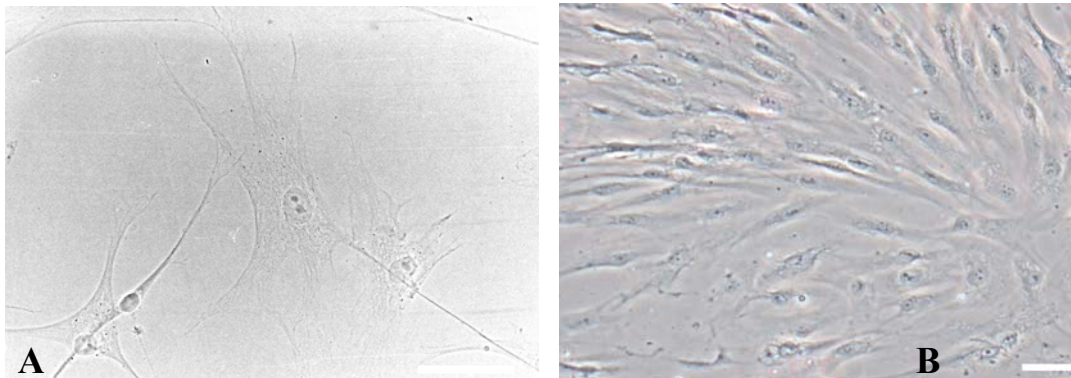


Abb. 25. Phasenkontrastmikroskopie von humanen MSC-Kulturen. **(A)** Große, fibroblastoide Zellen mit langen Zellfortsätzen. **(B)** Dichte MSC-Kultur mit eng anliegenden, länglichen Zellen. *Eichstriche:* **(A)** 50 μm ; **(B)** 150 μm .

Auffällig war dabei, dass solche Ausläufer („*Processus adhaerentes*“) oft auf andere Zellen zuliefen – sowohl auf deren Ausläufer als auch auf deren Zellkörper - und dort jeweils durch stabil erscheinende Strukturen verankert zu sein schienen (z.B. **Abb. 25A**).

4.2.2 Biochemischer Analyse der Zell-Adhäsionsmoleküle in MSC-Kulturen

Um die Cytoskelett- und Zell-Adhäsionsmoleküle humaner MSC-Kulturen zu charakterisieren, wurden zunächst die Proteine der Gesamtzell-Lysate mit SDS-PAGE getrennt und auf das Vorkommen von Cytoskelett-Proteinen bzw. der für die hier relevanten Adhärenz-Verbindungen typischen Zellverbindungs-Proteine untersucht.

In der **Abb. 26** sind die Ergebnisse an drei verschiedenen MSC-Kulturen (MSC-209, -185 und -179) von drei verschiedenen Donoren vorgestellt, wobei als Kontrollzellen humane U333 Glioma- und HaCaT-Keratinocyten eingesetzt wurden. Unter den diversen IF-Proteinen wurde nur für Vimentin (**Abb. 26J**) eine durchgängig starke Reaktion erhalten. Antikörper gegen andere IF-Proteine wie z.B. GFAP zeigten bei den MSC keine Reaktion. Antikörper gegen nicht-muskuläres Actin und Myosin waren ebenfalls positiv (nicht gezeigt).

Von den Mitgliedern der Cadherin-Familie wurden N-Cadherin (**Abb. 26A**), das mesenchymale Typ II-Cadherin Cadherin-11 (**Abb. 26B**) und – mit deutlich geringerer Reaktion – z.T. auch das mit „Lipid-Rafts“ in Verbindung gebrachtes T-Cadherin (Angst et al., 2001; Zhou et al., 2002) im Immunblot-Verfahren nachgewiesen. Alle anderen geprüften Cadherine wie E-Cadherin (**Abb. 26C**), Cadherin-8 und -6,

LI-Cadherin sowie M-, P-, R- und VE-Cadherin waren nicht nachweisbar (nicht gezeigt). Mit Antikörpern gegen α -Catenin (**Abb. 26F**) und die *arm*-Proteine β -Catenin (**Abb. 26G**), Protein ARVCF (nicht gezeigt) und p120^{ctn} (**Abb. 26H**) wurden positive Reaktionen erhalten, dabei war die Reaktion auf das ARVCF-Protein allerdings sehr schwach, und in ihrer Signifikanz nicht abzusichern.

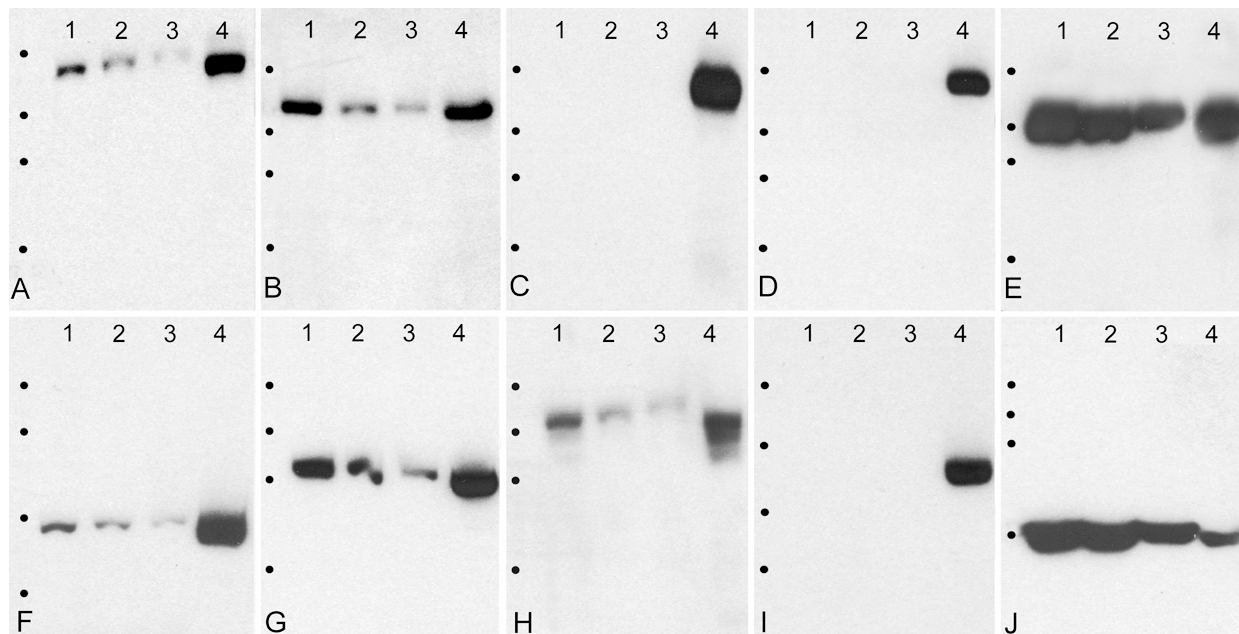


Abb. 26. Biochemische Charakterisierung der Proteine in den Zell-Zell-Verbindungen von humanen mesenchymalen Stammzellen (MSC). Immunblot-Analyse der durch SDS-PAGE aufgetrennten Polypeptide der Gesamtzell-Lysate von (*Spur 1*) MSC-209, (*Spur 2*) MSC-185, (*Spur 3*) MSC-179, (*Spur 4* in jeweils **A-B**) U333 Glioma- bzw. (*Spur 4* in **C-J**) HaCaT-Zellen. Die Reaktionen mit Antikörpern gegen (**A**) N-Cadherin, (**B**) Cadherin-11, (**C**) E-Cadherin, (**D**) Desmoglein, (**E**) Vinculin, (**F**) α -Catenin, (**G**) β -Catenin, (**H**) Protein p120^{ctn}, (**I**) Plakophilin 2 und (**J**) Vimentin sind ebenfalls vorgestellt. Ein Größenstandard für Molekulargewichte ist durch die Punktmarkern am der linken Rand angegeben (von oben nach unten): 158, 116, 97.2, 66.4 kDa.

Plakoglobin wurde in MSC mit mehreren Antikörpern untersucht, war aber auch nicht mit Sicherheit nachweisbar. Auch in Cytoskelett-Präparationen zeigten Antikörper gegen Plakoglobin keine bestätigte signifikante Reaktion. Von den Mitgliedern der Proteine des Nectin-Afadin-Ponsin (NAP)-Komplexes wurde nur Afadin identifiziert (nicht gezeigt).

Antikörper-Reaktionen auf desmosomale Transmembran- und Plaque-Proteine wie die Desmogleine 1-3 (**Abb. 26D**), die Desmocolline 1-3, Desmoplakin I und II (nicht gezeigt), und die Plakophiline 1-3 (Plakophilin 2: **Abb. 26I**) waren in solchen MSC-Immunblot-Analysen durchgehend negativ. Protein p0071 konnte biochemisch mangels geeigneter Antikörper nicht nachgewiesen werden. Die Antikörper gegen desmosomale Proteine gaben auch in Immunblot-Experimenten mit Cytoskelett-Präparationen keine positive Reaktion

(nicht gezeigt). Die TJ-Transmembran-Proteine Occludin, Claudin-1-5 und JAM-1 waren in Immunblot-Analysen von MSC-Proteine ebenfalls durchgehend negativ. Von den TJ-Plaue-Komponenten waren nur Protein ZO-1 und Symplekin nachweisbar (nicht gezeigt).

Antikörper gegen die Actin-bindenden Proteine α -Actinin, Drebrin (nicht gezeigt) und Vinculin (**Abb. 26E**) zeigten im Immunblot-Verfahren ebenso stark positive Reaktionen wie in der Immunfluoreszenzmikroskopie (siehe dort), ebenso Antikörper gegen Mitglieder der ERM-Familie (Ezrin, Moesin und Merlin; nicht gezeigt).

Die MSC verfügen aber auch über „Gap Junctions“, wie durch die positive Reaktion des GJ-Proteins Connexin-43 deutlich wurde (nicht gezeigt) und auch elektronenmikroskopisch demonstriert werden konnte (vgl. **Abb. 35J**). Die Ergebnisse der Immunblot-Analysen nach SDS-PAGE-Auftrennung sind in **Tabelle 9** zusammengefasst.

Tab. 9. Adhaerens Junction-Komponenten in MSC

Transmembran	Plaue
N-Cadherin Cadherin-11 (T-Cadherin)*	α -Catenin
	β -Catenin
	Protein p120 ^{ctn}
	Afadin
	Vinculin
	α -Actinin
	Ezrin
	Drebrin
	Protein ZO-1

* nur in Spuren (signifikant nicht bewiesen)

4.2.3 Vorkommen verschiedener Zelltyp-Differenzierungsproteine in MSC

Da bekanntlich MSC zu Knochen-, Knorpel- und Fettzellen (Jaiswal et al., 1997; Yoo et al., 1998; Pittenger et al., 1999), nach anderen Berichten sogar zu Endothelzellen, Neuronen, Astrocyten, Kardiomyocyten und Muskelzellen (Ferrari et al., 1998; Kopen et al., 1999; Sanches-Ramos et al., 2000; Orlic et al., 2001a,b; Fukuda et al., 2002; Jiang et al., 2005) differenzieren können, wurden etablierte Marker-Proteine für diese Zelltypen in Immunblot- und in Immunfluoreszenz-Analysen geprüft. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 10** zusammengefasst.

Tab. 10. Molekularbiologische „Marker“ für verschiedene Differenzierungsrichtungen von MSC untersucht mit Immunblot-Verfahren (IB) und Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM): Alle bzw. wenigstens Gruppen von Zellen erschienen positiv.

Zelltyp	„Marker“-Protein	Reaktion (IB/IFM)
Neuron	Nestin	-
	Neurofilament	-
Gliazelle	GFAP	-
Adipocyt	Perilipin	+
	Adipophilin	+
Endothelzelle	Faktor VIII	-
	von-Willebrand-Faktor	-
	VE-Cadherin	-
	JAM-1	-
	Claudin-5	-
Kardiomyocyt	kardiales α -Actin	-
	Desmoplakin I und II	-
Myocyt	Desmin	-
	Glattmuskel- α -Actin (SMA)	+ (in manchen Zellen)
Fibroblast	Vimentin	+
Epitheliale Zelle	Cytokeratin 8 bzw. 18, 19	+ (in wenigen Kolonien)

+ : positive Reaktion in IB oder IF

- : negative Reaktion in IB oder IF

Die MSC befanden sich also insgesamt in einem relativ undifferenzierten, d.h. vermeintlich pluripotenten Zustand, der noch keiner bestimmten Differenzierungsrichtung zugeordnet werden konnte, waren aber nicht homogen. Besonders nach längerer Kultur traten auch ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren - zusätzliche Cytoskelett-Proteine (Cytokeratine, Glattmuskel-Actin (SMA); zu SMA in Zellkulturen siehe auch Franke et al., 1980; Kinner et al., 2002; in normalen und pathologisch veränderten Knochenmark-Zellen siehe auch Schmitt-Gräff et al., 1989) in einigen der Zellen bzw. Zellkolonien auf. Antikörper gegen kardiales Actin und Desmoplakin waren dagegen negativ. Das Cytoplasma war in allen Zellen voller Vimentin-IF (**Abb. 27**), wie für mesenchymale Zellen allgemein charakteristisch ist. Jedoch wurden zusätzliche „epitheliale“ Marker wie z.B. Cytokeratin-IF in manchen Zellkolonien ebenfalls als typische IF-Bündel erkannt (**Abb. 29B, 30**). Man muss daraus schließen, dass solche MSC eine sich dynamisch ändernde, teilweise heterogene Zellpopulation ist. Ob sich bei solchen einzelnen SMA- oder Cytokeratin-positive, Zellen um Teile eines Differenzierungsprogramms oder nur um „spontane“, zufallsverteilte Kontrollverluste einzelner Gene handelt (vgl. z.B. Knapp und Franke, 1989; Knapp et al., 1989), muss dabei noch offen bleiben.

Systematisch jedoch bilden solche MSC-Kulturen keine Proteine, die auf eine gliale (GFAP), neuronale (Neurofilamente, Nestin) oder endotheliale (Faktor VIII, von-Willebrand-Faktor, VE-Cadherin, JAM-1, Claudin-5) Differenzierung hinweisen würden. Mit Antikörpern gegen adipocytäre „Marker“-Proteine wie Perilipin und Adipophilin erhält man jedoch auf Formaldehyd-fixierten Zellen in der Immunfluoreszenzmikroskopie nicht selten eine positive Reaktion in Form von kleinen cytoplasmatischen Lipid-Tröpfchen. Inwieweit solche Reaktionen aber auf „echte“ Adipogenese oder nur auf das bekannte Phänomen der Fetttropfen-Bildung bei Zellalterung („Verfettung“) zurückzuführen sind (vgl. Jarasch et al., 1977, 1981; Londos et al., 1999; Heid et al., 1998) ist ohne weitere spezifische Untersuchungen nicht zu entscheiden.

4.2.4 Nachweis von Cadherin-Komplexen in MSC in Immunpräzipitationsversuchen

Um die Cadherin-haltigen Zell-Zell-Verbindungskomplexe in MSC weiter zu analysieren, wurden die Zellen mit IP-Puffer lysiert. Aus den so erhaltenen Zentrifugationsüberständen wurden jeweils spezifisch N-Cadherin und Cadherin-11 immunpräzipitiert und die so erhaltenen Immunpräzipitate jeweils zusammen mit Positiv- und Negativ-Kontrollen (siehe 4.1.3) auf mögliche Bindungspartner analysiert.

N-Cadherin kopräzipitierte dabei α -Catenin, β -Catenin und Protein p120^{ctn}, nicht aber Cadherin-11, Afadin, Drebrin und α -Actinin. Cadherin-11 kopräzipitierte α -Catenin, β -Catenin, Protein p120^{ctn} und in geringerem Umfang Vinculin, aber nicht N-Cadherin, Ezrin, Drebrin, α -Actinin und Protein ZO-1. Die zwei verschiedenen Cadherine traten also - genau wie in U333 Glioma-Zellen (siehe 4.1.3) - nicht in „Über-Kreuz-Immunpräzipitationen“ auf. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 11** zusammengefasst.

Tab. 11. Ergebnisse der Immunpräzipitationen von Proteinen der MSC-Adhärenz-Verbindungen

Nachweis von	N-Cadherin-Präzipitat	Cadherin-11-Präzipitat
Cadherin-11	-	+
N-Cadherin	+	-
α -Catenin	+	+
β -Catenin	+	+
Protein p120 ^{ctn}	+	+
Afadin	-	-
Drebrin	-	-
α -Actinin	-	-
Ezrin	-	-

4.2.5 Darstellung von Cytoskelett- und Zellverbindungsproteinen in der Immunfluoreszenzmikroskopie

Intermediärfilament-Proteine, Adhäsionsmoleküle und Differenzierungs-Marker wurden auch mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Ergebnisse bestätigten und erweiterten die mit SDS-PAGE und Immunblot-Verfahren erhaltenen Befunde.

Vimentin (**Abb. 27**) reagierte in allen Zellen stark positiv und erschien in Form von cytoplasmatischen Filamentbündeln. Andere IF-Proteine wie z.B. GFAP, Nestin und Desmin waren negativ.

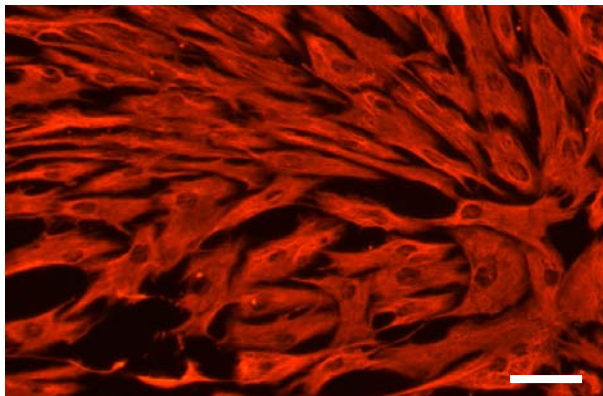


Abb. 27. Immunfluoreszenzmikroskopie von humanen MSC mit einem Antikörper gegen Vimentin. Alle Zellen zeigen eine starke positive Reaktion in Form von cytoplasmatischen Filamentbündeln.

Eichstrich: 150 µm.

Die MSC-Zellen wiesen aber eine überraschend große Heterogenität in Bezug auf ihre IF-Protein- und Mikrofilament-Ausstattung auf. Neben der Synthese von β - und γ -Nichtmuskel-Actin traten in etwa 10% der Zellen massive Bündel („Kabel“) auf, die - auch - Glattnuskel- α -Actin (SMA) enthielten (**Abb. 27, 28A**), eine Beobachtung, die kürzlich auch von einer anderen Arbeitsgruppe mitgeteilt worden ist (Kinner et al., 2002). Solche einzelnen SMA Actin-Filamentbündel-positiven Zellen (**Abb. 27A**) traten dabei mittels zwischen Vimentin-positiven Zellen (**Abb. 27B**) sei es als Einzelzellen oder klonal, waren dabei aber durch vielfache Junction-Kontakte mit den SMA-negativen Zellen eng und vielfach verbunden (**Abb. 28A**).

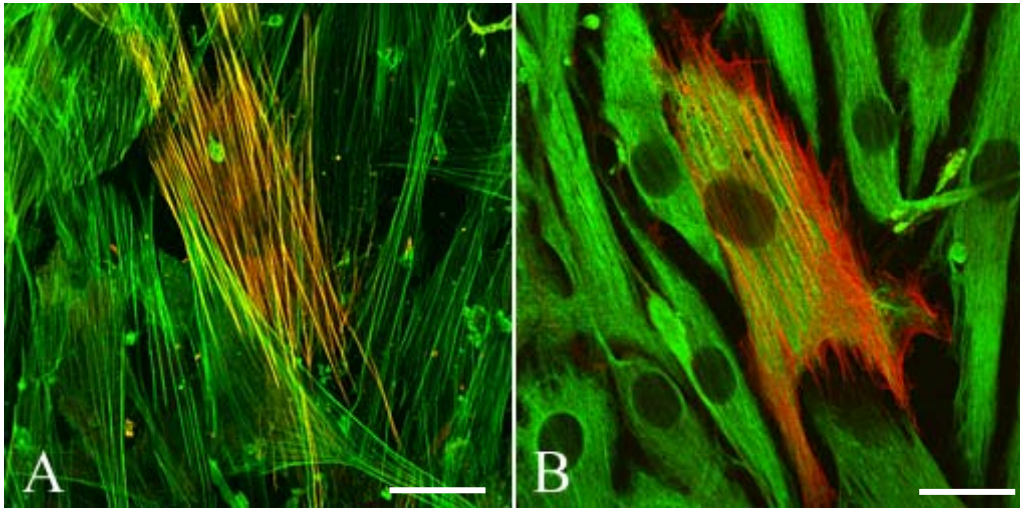


Abb. 28. Humane MSC weisen eine überraschende Heterogenität in ihren Cytoskelett-Elementen auf, wie hier in der Doppelfluoreszenzmikroskopie (LSM) dargestellt. Nur etwa 10-20% der Zellen sind Glattmuskel- α -Actin (SMA)-positiv (rot, **A**; **B**). Die gezeigten SMA-positiven-Zellen liegen neben Zellen, die negativ für diese Actin-Isoform sind. Die grün erscheinenden Strukturen enthalten Actin (**A**, markiert mit Alexa-488-gekoppelten Phalloidin) bzw. reagieren mit einem Antikörper gegen Vimentin (**B**). *Eichstriche*: 50 μ m.

Zusätzlich zu Vimentin wies ein kleiner Anteil (<10%) der Zellen auch IF-Bündel-Strukturen auf, die mit Antikörpern gegen Cytokeratine (CK 8 und 18) positiv reagierten (siehe **Abb. 29B**), wobei teilweise verschiedene Typen von Cytokeratin-Antikörpern durchaus wie verschieden erscheinende IF-Strukturen darstellten (vgl. **Abb. 29B** und **30**).

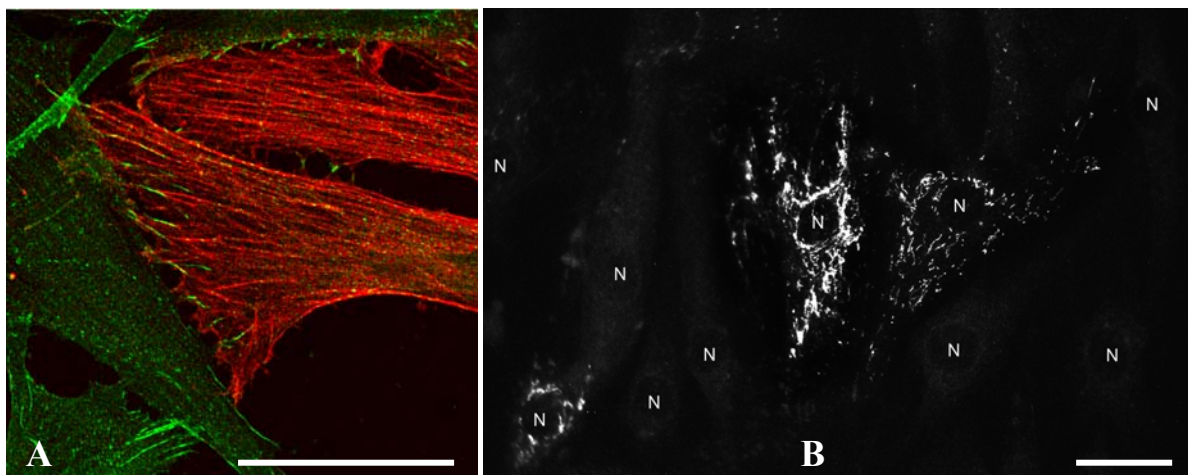


Abb. 29. Humane MSC zeigen sind heterogen in ihrer Ausstattung mit Cytoskelett-Filamenten, wie hier in einer Doppelfluoreszenzmikroskopie-Aufnahme (**A**) mit Antikörpern gegen Glattmuskel- α -Actin (SMA; rot) und β -Catenin (grün) demonstriert ist. (**B**) Immunfluoreszenzmikroskopie mit Antikörpern gegen die Cytokeratine 8 und 18, kann ebenfalls positiv reagierende Zellen nachweisen, in den die CK-Filamente hier kurz und stäbchenförmig erscheinen. In diesem Sichtfeld sind drei CK-positive Zellen zu sehen, an die CK-negative Zellen angrenzen. N: Zellkerne. *Eichstriche*: 50 μ m.

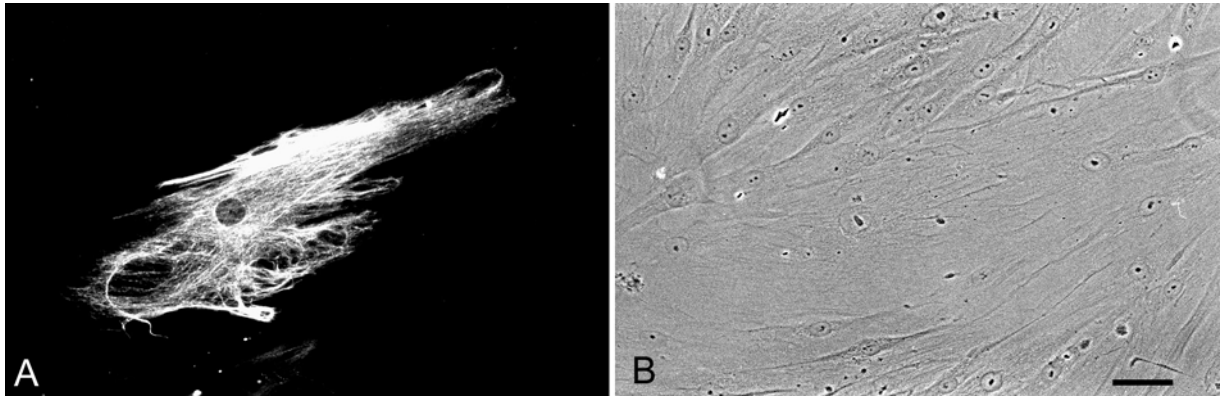


Abb. 30. Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung einer einzelnen Cytokeratin-IF-reichen MSC-Zelle nach Reaktion mit einem CK19-spezifischen Cytokeratin-Antikörper (A), umgeben von vielen CK-negativen Zellen (B, Phasenkontrast-Bild). *Eichstrich*, 25 μm .

Die Bedeutung dieser Beobachtungen bleibt zu klären. Die Bildung verschiedener Filament-Typen in Einzelzellen oder Zellgruppen beweist jedoch zumindest, dass MSC keine absolut homogene Zellpopulation darstellen. Diese überraschenden Heterogenitäten in MSC traten dabei spontan – z.B. ohne Einfluss von Wachstumsfaktor-Zugaben oder anderen Zellen - auf.

Die Ergebnisse der Einzelfluoreszenz-Experimente von „Junction-Proteine“ bestätigten - mit der Ausnahme von T-Cadherin - die der Immunblot-Analysen (nicht gezeigt). Antikörper gegen T-Cadherin reagierten in der Immunfluoreszenzmikroskopie auf MSC nicht.

Alle AJ-Proteine wie z.B. N-Cadherin, Cadherin-11, α -Catenin, β -Catenin und Protein p120^{ctn} zeigten an den Zellgrenzen ausgeprägt starke Reaktionen, meist in „brückenartig“ lang gezogenen Kontaktstegen oder als Komma-artige Strukturen, morphologisch etwa *Zonulae/Fasciae adhaerentes* entsprechend. Die Zell-Verbindungen begrenzten sich dabei eben nicht auf die Zell-Zell-Kontakte, sondern reichten oft tief in das Cytoplasma der anderen Zelle „hinein“ (Abb. 31A, 32). Durch diese *Villus*-artigen Fortsätze (*Processus*) wurden offenbar benachbarte Zellen stark ineinander verzahnt wobei meist positive Reaktionen mit Antikörpern gegen AJ-Proteine über die gesamte Länge der in die jeweilige Nachbarzelle hineinreichende Fortsätze erschienen.

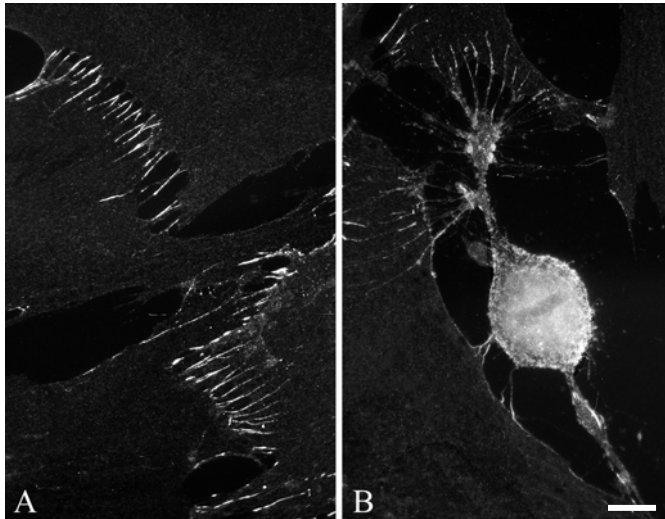


Abb. 31. Immunfluoreszenzmikroskopie von humanen MSC-Kulturen mit einem Antikörper gegen β -Catenin.

(A) β -Catenin in der Interphase. Zwischen zwei Zellen entstehen lange, ineinander eindringende Fortsätze die oft über die gesamte Länge mit Antikörper gegen β -Catenin reagieren.

(B) β -Catenin in einer mitotischen Zelle. Die mitotische Zelle behält durchaus viele Zell-Zell-Verbindungen zu ihren Nachbarzellen.

Eichstrich: 20 μ m.

Die Zellen wurden auch während der Zellteilung untersucht (**Abb. 31B**). Während in der Interphase MSC durch verschieden lange, ineinander eindringende Kontaktstrukturen verbunden waren, die z.B. mit Antikörpern gegen β -Catenin dargestellt werden konnten (**Abb. 31A**), rundeten sich die Zellen in Mitose – wie typisch – ab und wiesen weniger Zell-Zell-Verbindungen auf. Sie behielten aber stets eine Reihe von brückenartigen *Processus adhaerentes*, über die sie auch während der Zellteilung mit Nachbarzellen in Kontakt blieben und sich so in der Telophase in den jeweiligen topologischen Zusammenhang mit den Nachbarzellen abflachend zurückbildeten (**Abb. 31B**).

4.2.6 Analyse der MSC-„Junctions“ mit Doppelimmunfluoreszenz-LSM

Um die Adhäsionsmoleküle genauer zu lokalisieren, auch in Bezug untereinander, wurden die MSC auch mit LSM und Doppelmarkierungen untersucht. N-Cadherin (**Abb. 32A, B**, grün) erschien dabei in einer nahezu vollständigen Kolo-kalisierung mit α -Catenin (**Abb. 32A, B**, rot) sowohl an den *Punctum*-artigen Kontaktstellen der Zellkörper als auch in den *Processus adhaerentes*, wie anhand der gelben Misch-Farbe in den entsprechenden Aufnahmen ersichtlich wurde. N-Cadherin (**Abb. 32C**, grün) kolo-kalisierte so z.B. ebenfalls mit Protein p120^{ctn} (**Abb. 32C**, rot) und β -Catenin (**Abb. 32D**). dabei wurde außerdem eine weitgehende Kolo-kalisierung von β -Catenin und Afadin festgestellt (**Abb. 32D**). Auch die transmembranproteine N-Cadherin und Cadherin-11 schienen in derselben Verteilung vorzukommen (nicht gezeigt).

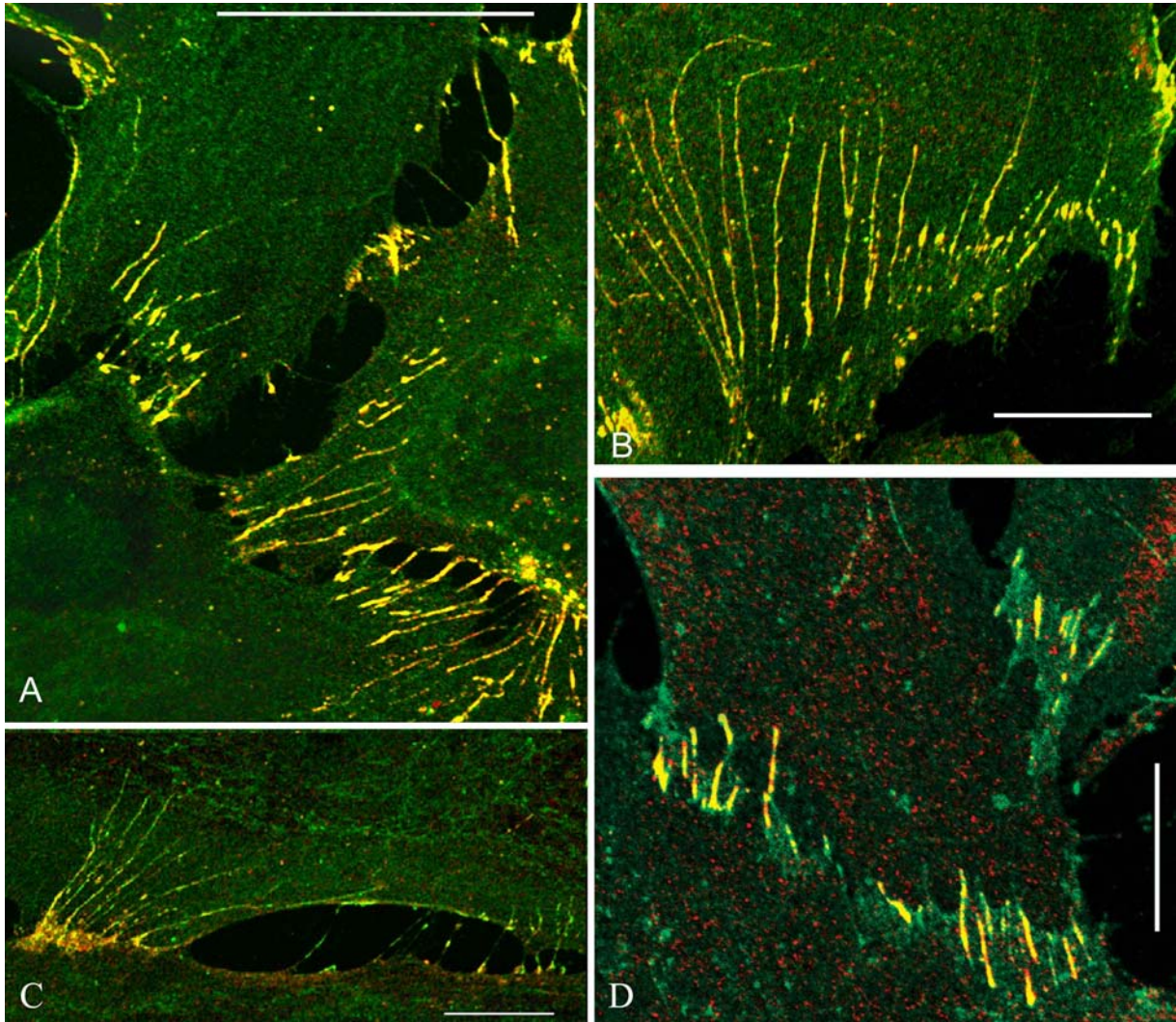


Abb. 32. Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie (LSM) von humanen MSC. Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen N-Cadherin (**A, B, C** grün), α -Catenin (**A, B** rot), β -Catenin (**D**, rot) bzw. Protein p120^{ctn} (**C**, rot) und Afadin (**D**, rot). Nur die Misch-Aufnahmen sind gezeigt; die jeweilige gelbe bzw. orange Färbung demonstriert die Kolokalisierung, so z.B. die nahezu vollständige Kolokalisierung von N-Cadherin mit α -Catenin (**A, B**) bzw. mit Protein p120^{ctn} (**C**) oder von β -Catenin mit Afadin (vgl. **D**). Lange Ausläufer (*Processus adhaerentes*) dringen u. a. auch tief in das Innere benachbarter Zelle ein, d.h. in meist als enge Invaginationen ausbildende *Recessus* und verknüpfen die Zellen vielfach, manchmal in fast periodischen Anordnungen („Batterien“ z.B. **B**), manchmal in über Längen bis zu 40 μ m. N-Cadherin, α -Catenin und Protein p120^{ctn} kolokalisieren dabei eng miteinander und erscheinen oft an den Zell-Kontakt-Zonen und entlang den langen *Processus adhaerentes*.
Eichstriche: (**A**) 50 μ m; (**B-D**) 20 μ m.

Die Zellausläufer (*Processus adhaerentes*) waren generell sehr reich an Aktin-Filamenten, was sowohl durch Antikörper- als auch durch Phalloidin-Reaktionen dargestellt werden konnte. Entsprechendes galt auch für Myosin – und α -Actinin-Antikörper. Letztere erlaubten auch die gesamte Darstellung der weitgehend geordneten –teilweise periodischen– α -Actinin-haltigen „Dense bodies“ längs der Actin-Mikrofilament-Bündel sowohl in den MSC-Zellkörpern als auch in den Ausläufern (**Abb. 33A-E**), wobei die mittleren Abstände

der α -Actinin haltigen Strukturen zwischen 0.7 und 1.2 μm variieren konnten (**Abb. 33D, E**), also durchaus in einem Bereich, der auch bei einigen anderen Nichtmuskel-Zelltypen angegeben wurde (vgl. u.a. Sanger et al., 1983; Geiger et al., 1984; Übersicht über die α -Actinin Isoformen bei Blauchard et al., 1989).

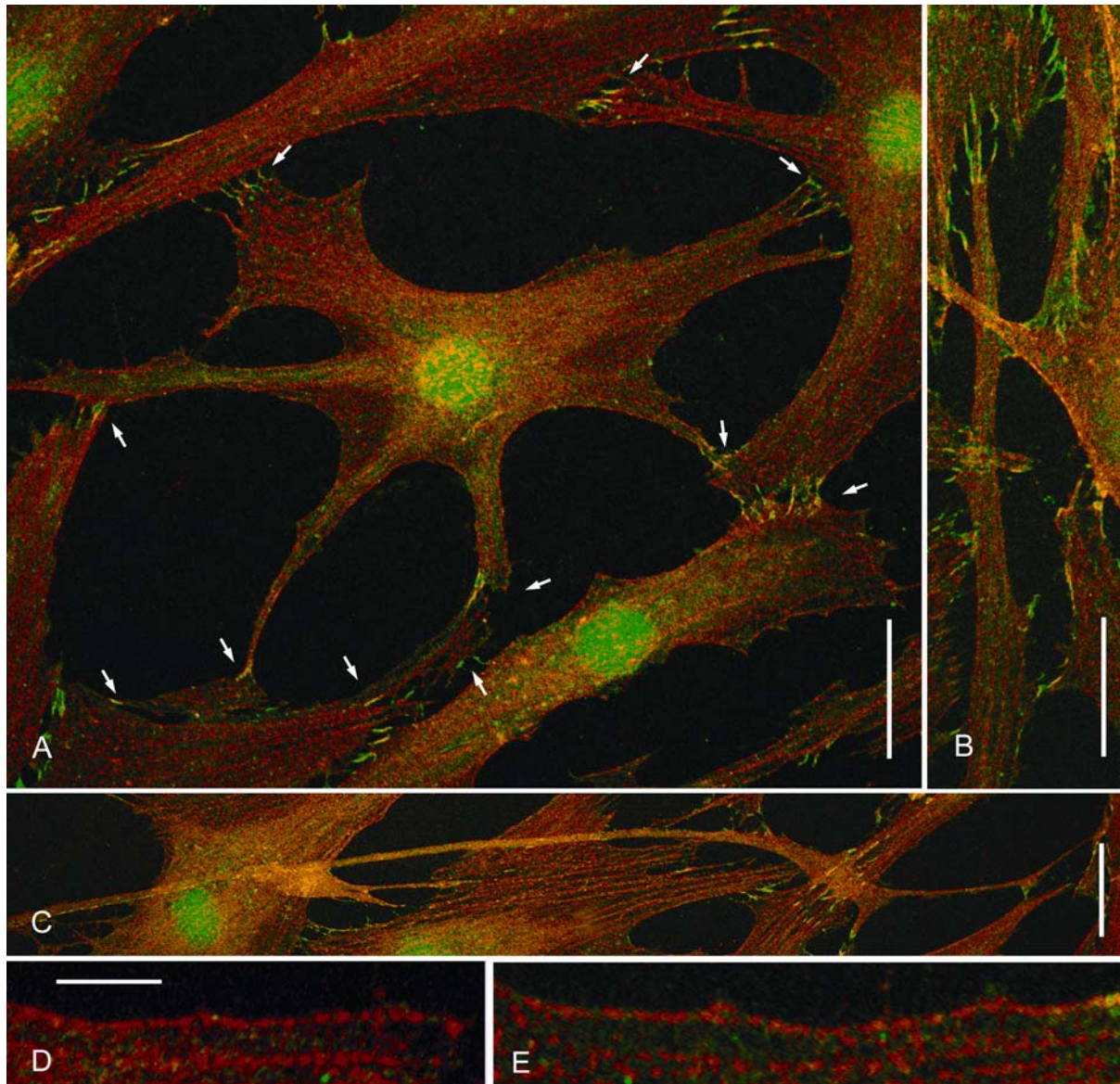


Abb. 33. Doppelmarkierungs-Immunfluoreszenz-LSM von MSC-Kulturen nach Reaktion mit Antikörpern gegen α -Actinin (Mäuse mAk, rot), und β -Catenin (Kaninchen Ak, grün). Das β -Catenin ist an den interzellulären, oft brückenartig erscheinenden Zell-Zell-Verbindungen (einige davon sind in A durch Pfeile gekennzeichnet) - ebenso wie in den Zellkernen - angereichert. Man beachte u.a., dass hier – durchaus typisch – eine die – die zentral positionierte- Zelle mit fünf anderen Zellen über viele Zellausläufer verbunden ist (A) und dass der eine Zellausläufer (in „Nord-Süd“-Richtung sich erstreckend) mit insgesamt mindestens fünf Zellen „Junction“-Kontakte ausgebildet hat. Ein besonders langer Ausläufer ist in C dargestellt („ost-west“ Strecke in Bild über 300 μm). Die beiden Teilvergrößerungen (D, E) stellen Beispiele der recht regelmäßigen Anordnungen von α -Actinin-haltigen „Dense bodies“ längs der Mikrofilament-Bündel in den Ausläufern dar. *Eichstriche:* (A-C) 25 μm ; (D, E) 5 μm .

Die Actin-bindenden Proteine der ERM-Familie Ezrin, Merlin und Moesin erschienen dagegen mehr diffus, dabei anscheinend oft in Korrelation mit der Verteilung der Actin-Mikrofilamente (z.B. **Abb. 34**), Ezrin dabei auffällig dicht in den Microvilli und den *Processus* der Zellen. Drebrin war oft an den Zellausläufern und Lamellipodien nachzuweisen (nicht gezeigt).

Das „Gap Junction“-Protein Connexin 43 reagierte - wie erwartet - entlang den Zell-Grenzen in punkt- bzw. strichförmigen Muster (nicht gezeigt).

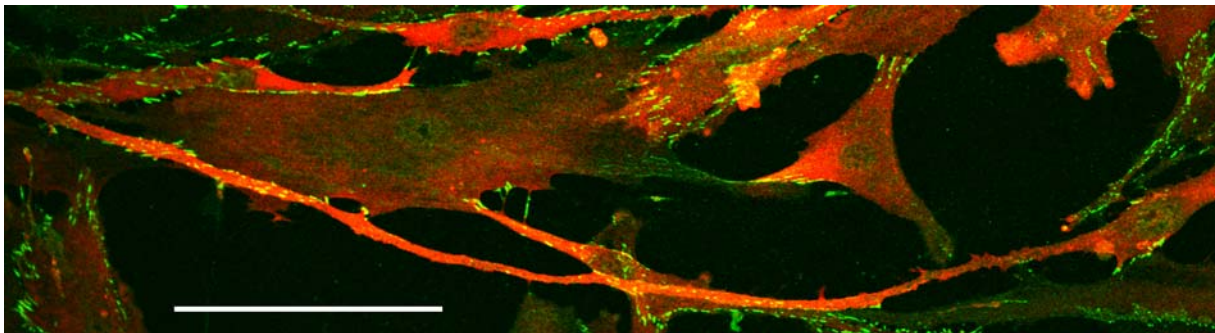


Abb. 34. Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie (LSM) einer MSC-Kultur mit Darstellung von β -Catenin-haltigen *Puncta adhaerentia* oder *Fasciae adhaerentes* (grün) und durch den Ezrin-Gehalt (rot) sichtbaren Zellkörper und *Processus adhaerens*-Strukturen, von denen ein besonders langer (Nord-Süd-Richtung) sich allein hier im Bild über 480 μ m erstreckt und zahlreiche Adhärenz-Kontakte mit anderen, z.T. sehr entfernten Zellen bildet. *Eichstrich*, 100 μ m.

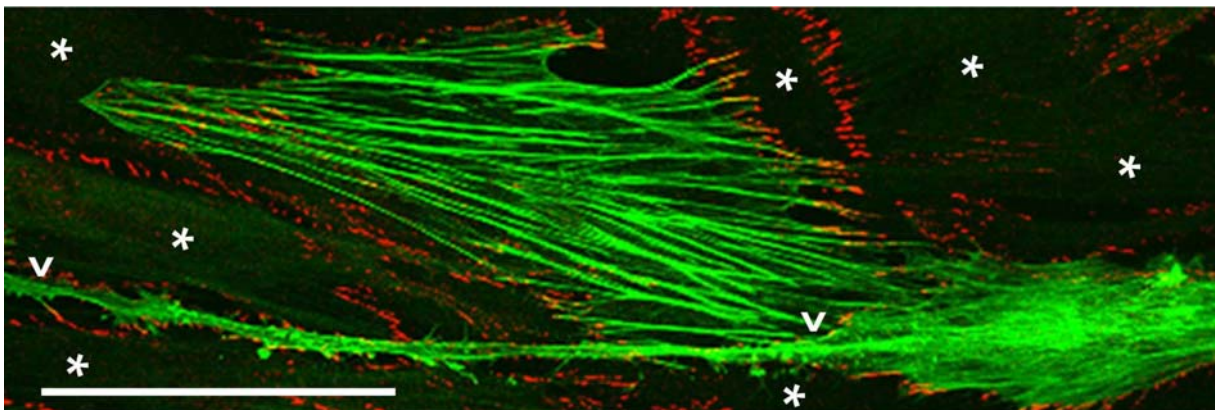


Abb. 35. Doppelimmunfluoreszenzmikroskopische (LSM) Aufnahme einer MSC-Kultur, in der zwei der Zellen durch Mikrofilament-Bündel ausgewiesen sind, die α -Glattmuskel-Actin enthalten (grün), während alle plaque-tragenden Zell-Zell-Verbindungen durch ihren β -Catenin-Gehalt rot bzw. teilweise gelb-orange (Mischfarbe) erscheinen. *Eichstrich*, 50 μ m.

Die z.T. sehr langen, Adhärenz-Verbindungsstrukturen bildenden *Processus adhaerentes* konnten auch von der MSC-Minderheit mit besonderen Differenzierungsmerkmalen gebildet werden. Typische Beispiele solcher sehr langer Zellfortsätze sind in der Abbildungen **34** und

35 (α -Glattmuskel-Actin-haltiger Subtyp) vorgestellt. Bei dem langen in **Abb. 34** gezeigten Fortsatz ist allein der im Bild gezeigte – hier durch Reaktion mit dem Actin-assoziiertem Ezrin dargestellte Abschnitt des Ausläufers länger als 480 μ m und weist saugnapfenartige Verbindungen mit mindestens fünf anderen Zellen auf. Entsprechendes gilt auch für den sehr langen α -Glattmuskel-Actin-haltigen Zellausläufer der **Abb. 35**, in der zum Vergleich eine weitere Glattmuskel-Actin-positive MSC mit ausgesprochenen Actinfilament-Bündel („Kabel“-)Strukturen und Catenin-haltigen Verankerungsstrukturen, auch mit „normalen“ Nachbarzellen (*), die nur Nichtmuskelaktin besitzen. Dass diese verschieden langen, z.T. Neurit-artig erscheinenden Fortsätze auch Mikrotubuli enthalten, ist in der **Abb. 36** dargestellt.

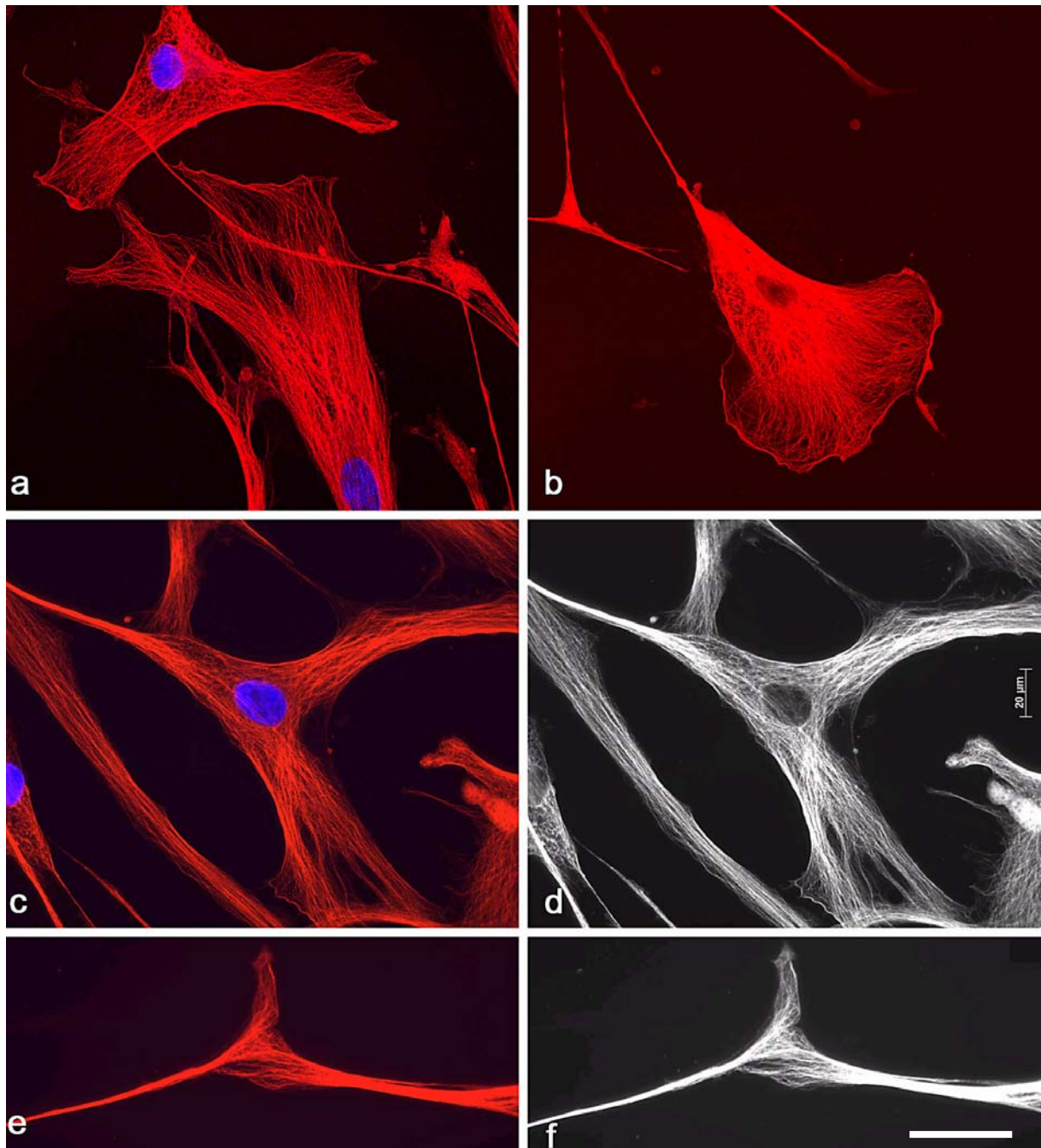


Abb. 36. (A-F) Immunfloreszenzmikroskopische Darstellung von Mikrotubuli – mit Antikörpern gegen α -Tubulin – in Ausläufern von MSC-Zellen, wobei an manchen Stellen einzelne Tubuli aufgelöst werden können (A, B, C, E, farbige (rot) Darstellung; D und F, wegen z.T. besserer Darstellung die schwarz-weiß Aufnahmen von C bzw. E). *Eichstrich*, 20 μm .

4.2.7 Elektronenmikroskopie der MSC-Zellverbindungen

Um die Feinstruktur der lichtmikroskopisch beobachteten Zellkontakte und tentakelartigen Zellfortsätze (*Processus adhaerentes*) darzustellen, wurde sowohl Transmissions-Elektronenmikroskopie an optimal fixierten Zellkulturen als auch Immun-elektronenmikroskopie der MSC-Kulturen durchgeführt. Ultradünnschnitte von Zellkörper-Kontakten der MSC zeigten in der Regel ausgeprägt lange, dicht anliegende Zell-Zell-Kontakt-Zonen, die morphologisch etwa dem *Fascia adhaerens*-Typ entsprachen und dabei einen deutlichen elektronendichten Plaque mit ansitzenden Mikrofilament-Bündeln aufwiesen (**Abb. 37A**; vgl. auch **Abb. 37J**).

Die in dünn besiedelten Kulturschalen auffälligen, zahlreichen, z.B. tentakelartig langen Zellausläufer (*Processus adhaerentes*), z.B. mit Berührungen ihrer Endabschnitte („ET-Touches“), konnten in günstigen Ultradünnschnitten als einander terminal oder subterminal über „Junctions“ berührende dünne Strukturen z.T. über große Strecken erkannt werden (**Abb. 37 B,C**). An diesen Berührungsstellen waren noppenartig, kleine plaque-tragende Haftstrukturen zu erkennen, die morphologisch *Puncta adhaerentia* entsprachen (**Abb. 37 B,C**). Um die Zusammensetzung dieser meist recht kleinen (30-200 nm Durchmesser) „Junctions“ zu charakterisieren, wurden solche Zellen auch immunelektronenmikroskopisch untersucht: Immungold-Lokalisierung mit Silber-Verstärkung bestätigte die lichtmikroskopische Befunde, dass, all diese kleinen plaque-tragenden *Puncta*-Strukturen typische *Puncta adhaerentia*-Proteine enthielten (**Abb. 37 D** stellt ein Beispiel mit β -Catenin vor).

Die *Processus*-Ausläufer und ihre *Puncta*-tragenden Anheftungsstrukturen erschienen in verschiedenen morphologischen Varianten, von denen einige Typen, in **Abb. 37 E-G** vorgestellt sind.

An vielen Stellen sah man auch, dass solche Zellausläufer in entsprechende Invaginationen der Plasmamembran einer Nachbarzelle (*Recessus peniti*) eingedrungen waren, die sie in engem, manschettenartigen Junction-Kontakt ausfüllten, wobei den beiden beteiligten Membranen meist ausgedehnte cytoplasmatische Plaques aufsaßen (**Abb. 37 H, I**). Solche verschieden langen „Verwurzelungen“ von meist relativ dünnen (Durchmesser 0.1-0.4 μm) Ausläufern (*Processus*) konnten an vielen Stellen sehr tief in die Nachbarzelle-Invaginationen eindringen, wobei sie lichtmikroskopisch bis zu etwa 40 nm Länge verfolgt werden konnten (vgl. z.B. **Abb. 32**). An vielen Stellen schienen die jeweilige Plaque-Strukturen kontinuierlich, jedenfalls ohne erkennbare Unterbrechung durch Plaque-lose

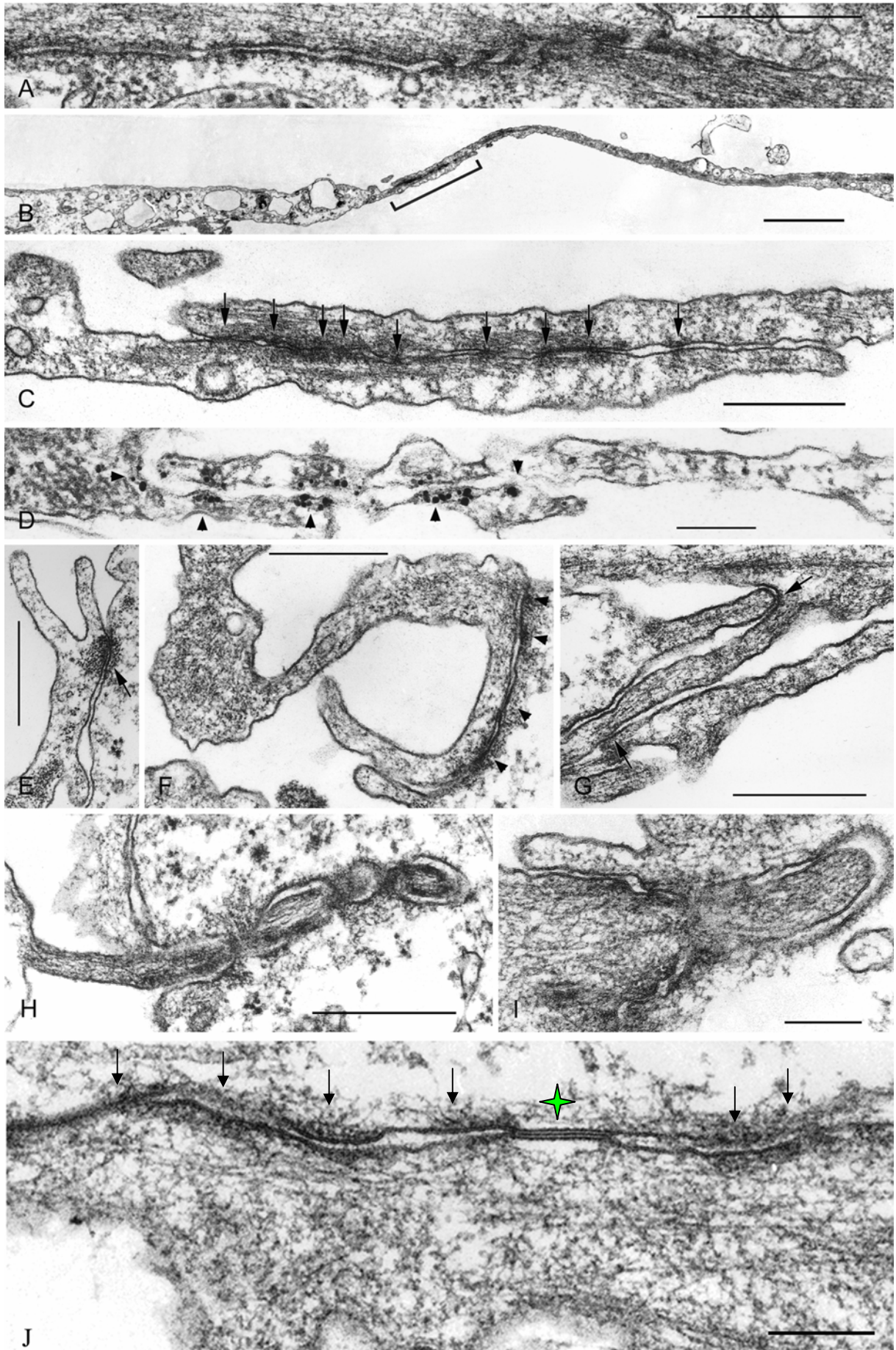
Zonen, zu sein, was auch zu der in der im Immunfluoreszenzmikroskop beobachteten durchlaufenden Plaque-Protein-Positivität passt (vgl. u.A. auch **Abb. 32-34**) und die Erklärung einer Entstehung solcher Haftungen durch Fusion von vielen *Puncta adhaerentia*-Strukturen nahe legt.

Die häufig auffällige, eng parallele, gewissermaßen Batterie-artige *Manubria* - mit lateralen Abständen bis zu etwa 2 µm hinunter – unterstricht den regulären Charakter dieser Verankerungen und deutet auf eine funktionelle Rolle hin. An Zellausläufer wie auch – dies anscheinend seltener – an den *Processus* konnten zwischen den *Puncta adhaerentia* eingesprengt auch einzelne *Nexus* („Gap Junctions“), beobachtet werden (Abb. 35J).

Die zellbiologische Dynamik dieser *Manubrium*-Verwurzelungen, besonders ihre Bildung und Abbau, wird derzeit licht- und elektronenmikroskopisch untersucht (C. Grund, C. Kuhn und W.W. Franke, Abteilung Zellbiologie des DKFZ).

Abb. 37. Elektronenmikroskopische Darstellungen der Zell-Zell-Verbindungen und Zellausläuferkontakte von MSC. (A-C) Transmissionselektronenmikroskopische Abbildungen: Lange, dicht anliegende Zell-Zell-Verbindungen (vom *Fascia adhaerens*-Typ) sind mit elektronendichten cytoplasmatischen Plaques assoziiert, die Cytoskelett-Filamente verankern. (B) Zwei Zellen bilden lange tentakelartige Zellausläufer („ET-Touches“), die sich gegenseitig berühren (Kontaktstelle mit Klammer bezeichnet). (C) Vergrößerte Abbildung der durch Klammer bezeichnete Stelle in (B). Die langen Ausläufer („ET-Touches“) zweier Zellen bilden ausgedehnte „Junction“-Zonen vom *Puncta adhaerentia*-Typ (Pfeile). (D) Immunelektronenmikroskopie mit durch Silberreaktion verstärkter Immungold-Lokalisierung von β -Catenin an einer ähnlichen wie der in B und C bezeichneten Struktur. β -Catenin (Gold-Granula) lokalisiert an den von Zellausläufern gebildeten noppenartigen *Puncta*-Kontaktzonen (Pfeilköpfe). (E-G) Verschiedene Erscheinungen der „ET-Berührungen“: In (E) bildet ein Zellausläufer eine einzelne, kräftige, viele Mikrofilamente verankernde Plaque-tragende (Pfeil) Struktur mit einer anderen Zelle. In (F) sind in einer ähnlichen Situation mehrere ausgedehnte „Junction“-Plaques beobachtbar (Pfeile). In (G) bilden zwei benachbarte Zellen lange Zellausläufer, die sich - ineinander verschachtelt - eng berühren. Hier sind nur Ansätze von Zell-Zell-Kontaktstellen, aber noch keine definierten Plaque-tragenden Strukturen beobachtbar (siehe Pfeile). (H-I) Zellausläufer, die eng in die entsprechenden Invaginationen (*Recessus*) einer anderen Zelle eingepasst sind (*Manubrium penitum*) und damit die zwei benachbarten Zellen miteinander verankern, wobei eine Art „Manschette“ mit einem großen ununterbrochenen Plaque-besetzten „Junction“ entsteht, wahrscheinlich als Folge einer Art Fusion vieler *Puncta adhaerentia*. (J) *Puncta adhaerentia* (Pfeile) und eine „Gap Junction“ (grüner Stern).

Eichstriche: (A, C-J) 0,5 µm; (B) 2 µm.



4.2.8 Quantitative und dynamische Aspekte

Häufigkeit (hier: Anzahl pro Zelle) und Länge der *Processus Adhaerentes* und ihrer Zell-Zell-Haftstrukturen (*Puncta adhaerentia*) variieren stark in den MSC-Kulturen. Während sehr lange (50-500 μ m) Fortsätze, vor allem auch solche, die Kontakte mit anderen Zellen bilden, in relativ spärlich besiedelten Kulturschalen häufiger vorkamen, waren diese in subkonfluenten Kulturen, d.h. nach wenigen Tagen schon selten, und in konfluenten bzw. postkonfluenten Kulturen gab es dann fast nur noch relativ kurze (Brücken-Typ), jedoch häufige Zell-Zell-Verbindungen. Dabei konnten Häufigkeiten von mehr als 70 Adhärenzverbindungen pro Zelle und laterale „Packungsdichten“ von über 5-7 pro μ m festgestellt werden. Abb. **38A** und **B** geben einen Eindruck davon, wie MSC – auch als mesenchymale Zelle – durch ganze Serien solchen benachbarter Haftstrukturen verknüpft sind.

Die Mechanismen der Bildung und Veränderung der Fortsätze, vor allem auch der Reduktion der besonders langen *Processus*, soll nun in gezielten molekularbiologischen Experimenten und kinematographischen Analysen untersucht werden, auch in siRNA-Experimenten zur Aufklärung einzelner Komponenten.

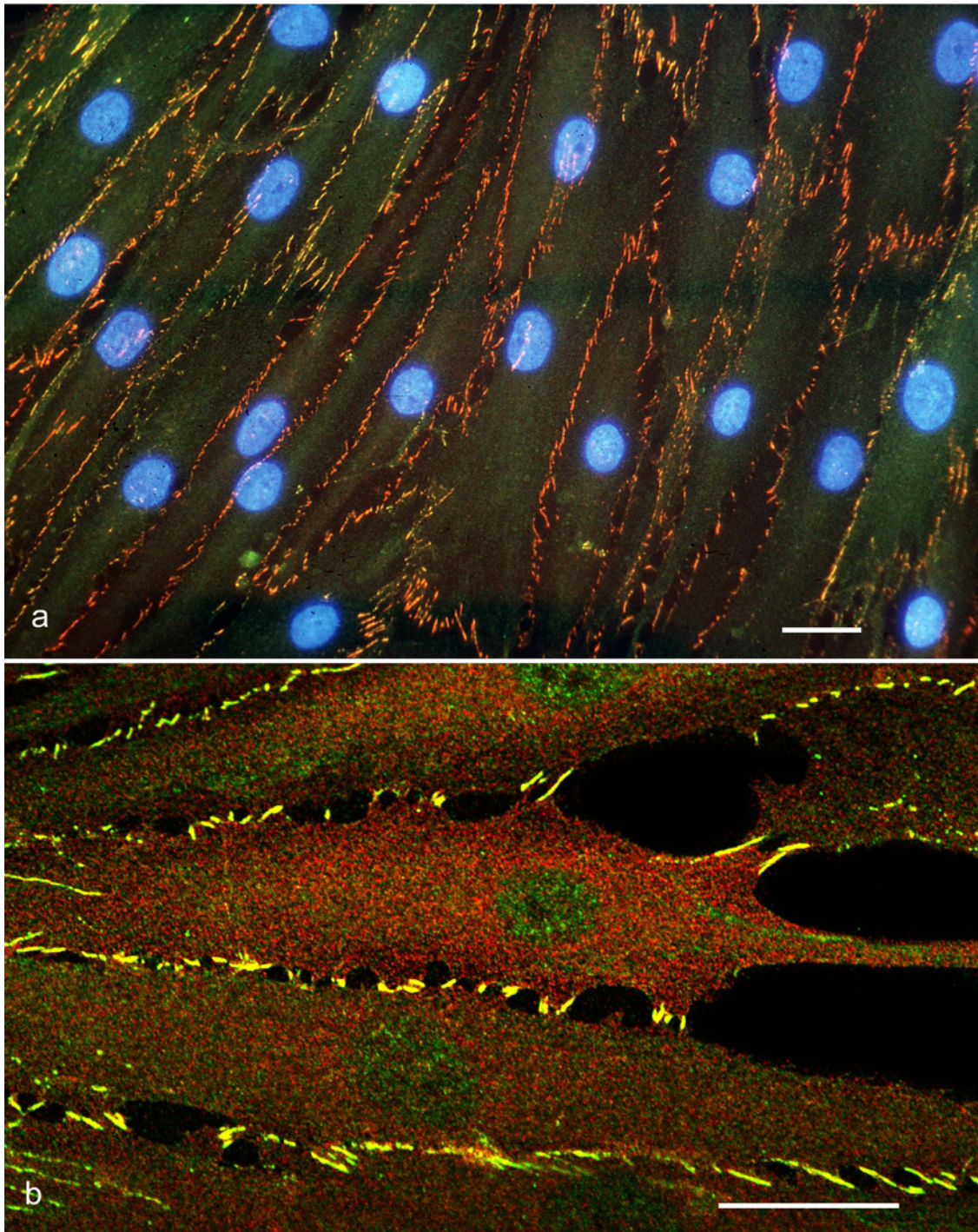


Abb. 38. Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie (LSM) zu hoher Zelldichte – d.h. nahezu konfluent gewachsene – Kulturen humaner MSC, in denen die sehr häufigen Zellfortsätze bzw. Zell-Zell-Verbindungen durchweg relativ kürzer erscheinen, aber noch die gleichen molekularen Komponenten enthalten wie in den weniger dicht gewachsenen Kulturen (vgl. frühere Abbildungen). Diese Verbindungsstrukturen sind hier durch Kolokalisierung von β -Catenin (grün) mit N-cadherin (rot, **A**), bzw. mit Cadherin-11 (rot, **B**) in orange (**A**) bzw. gelber (**B**) Mischfarbe dargestellt. In **A** sind die Zellkerne mit DAPI gefärbt. *Eichstriche*; **A**, **B**, 25 μ m.

4.2.9 Nachweise verschiedener Cadherin-mRNAs

Die fragliche Expression der Gene des Protein p0071 und verschiedener Cadherinen wurde auch mit der RT-PCR-Methode untersucht. Gesamt-RNA wurde aus MSC und diversen Kontrollzellen (A431-, U333 Glioma- und HUVEC-Zellen) extrahiert und spezifische „Primer“ benutzt, um ihre mRNAs nachzuweisen. Für VE- und T-Cadherin wurden HUVEC-, für P-Cadherin A431-, für N-Cadherin U333 Glioma-Zellen, und für Protein p0071 humanes Herzgewebe als Positivkontrolle verwendet. Bei allen RT-PCR-Untersuchungen entstand auch in MSC ein cDNA-Produkt (P-Cadherin: **Abb. 39**; T-Cadherin: **Abb. 40**, andere Cadherine nicht gezeigt).

Das P-Cadherin-Transcript wurde in A431-Zellen (**Abb. 39**, *Spur 2*) in großen Mengen; und in MSC (*Spur 1*) und T98G-Glioblastoma-Zellen (*Spur 6*) in sehr kleinen Mengen nachgewiesen; . Negativ blieben die Ansätze bei HUVEC- (*Spur 3*), PLC- (*Spur 4*), U333 Glioma- (*Spur 5*) und U373MG Glioma-Zellen (*Spur 7*) sowie bei Astrocyten-Primärkulturen der Maus (*Spur 8*).

Das T-Cadherin-Transcript wurde in HUVEC- (**Abb. 40**, *Spur 5*), MSC (*Spur 6*) und U333 Glioma-Zellen (*Spur 7*) nachgewiesen, während die Negativkontroll-Ansätze (*Spuren 2-4*) negativ waren.

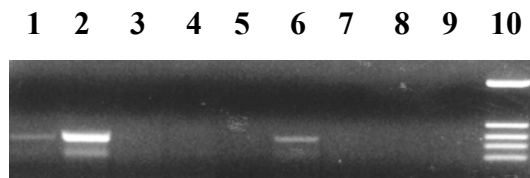


Abb. 39. RT-PCR Nachweis der mRNA von P-Cadherin in MSC

Ein P-Cadherin entsprechendes Produkt war in MSC-Material schwach erkennbar, jedoch nicht notwendigerweise signifikant (*Spur 1*). Als Positivkontrolle dienten A431-Zellen, die zum Erscheinen einer starken Bande führten (*Spur 2*). In HUVEC- (*Spur 3*), PLC- (*Spur 4*), U333 Glioma- (*Spur 5*) und U373 Glioblastoma- (*Spur 7*) Zellen sowie in primäre Balb/c Astrocyten-Kulturen (*Spur 8*) war keine Bande nachweisbar. Ein schwaches Signal wurde auch in T98G-Glioblastoma-Zellen (*Spur 6*) beobachtet aber hier gilt das gleich wie für die MSC-Zellen (s.o.). Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne „Template“ (*Spur 9*). In *Spur 10* wurde ein Größenstandard (Bluescribe Vector, mit Hinf I verdaut) aufgetragen.

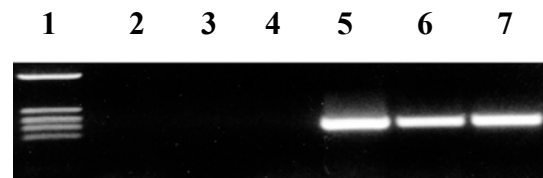


Abb. 40. RT-PCR-Nachweis der mRNA von T-Cadherin in MSC

Ein T-Cadherin entsprechendes Produkt war in HUVEC- (*Spur 5*), MSC- (*Spur 6*) und U333 Glioma-Zellen (*Spur 7*) nachweisbar. Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne „Sense-Primer“ (*Spur 2*), ohne „Antisense-Primer“ (*Spur 3*) und ohne „Template“ (*Spur 4*). In *Spur 1* wurde ein Größenstandard (Bluescribe Vector, mit Hinf I verdaut) aufgetragen.

Die cDNA von Protein p0071 wurde in MSC als eine deutliche Bande nachgewiesen was auf die Synthese dieses Plaque-Proteins hinweist. Da die mRNAs von T-, VE-, N- und P-Cadherin deutlich nachweisbar waren, muss gefolgert werden, dass in MSC das Expressionsmuster der Gene von „Junction“-Proteinkodierenden Gene auf mRNA-Ebene deutlich vielfältiger als auf Protein-Ebene ist.

4.2.10 Abwesenheit von Syndecan-1 in MSC-Zell-Zell-Verbindungen

Syndecane sind an Zelloberflächen-Glykoproteine (u.a. Bernfield et al., 1992; Elenius und Jalkanen, 1994; Rapraeger, 2000), die aber bisher nicht mit Sicherheit als konstitutiver Bestandteil von Adhärenz-Verbindungen nachgewiesen worden waren. Vor allem für Syndecan-1 war aber eine Assoziation mit dem Cadherin-Catenin-System - vor allem in Epithelzellen - auch durch einige Immunlokalisierungsergebnisse nahegelegt worden (vgl. z.B. Zimmermann et al., 2001). Außerdem war berichtet worden, dass Syndecan-2 Ezrin

binde und damit generell als Transmembran-Partner von ERM-Proteine in Frage käme (Bretscher et al., 2002; Granés et al., 2003).

Da ein konstitutiv Transmembranpartner von Ezrin - bzw. allgemein ERM-Proteinen in verschiedenen Zellen und Geweben bisher nicht identifiziert werden konnte - auch in U333 Glioma-Zellen und MSC nicht -, (zur Augenlinse siehe auch Straub et al., 2003), wurde versucht, mit Antikörpern gegen Ezrin aus MSC-Lysaten erhaltene Immunpräzipitate auf das Vorhandensein von möglichen Bindungspartnern zu prüfen. Proteine des Immunpräzipitats wurden daher durch SDS-PAGE aufgetrennt, mit kolloidalem Coomassie-Blau angefärbt, die sichtbaren Polypeptidbanden ausgeschnitten und mit MALDI-MS analysiert.

In solchen Analysen wurde u.a. als möglicher Bindungspartner von Ezrin das sog. „Syndecan-binding-Protein“ gefunden, welches wohl dem Syntenin entspricht (Zimmermann et al., 2001). Syntenine sind Proteine, die in Epithelzellen sowohl mit E-Cadherin als auch mit Syndecan-1 Komplexe bilden können. Das musste als Hinweis auf das grundsätzliche Vorkommen von Syndecanen in MSC-Zellverbindungen angesehen werden, und daher wurde versucht, mit kommerziell erhältlichen Antikörpern gegen die Syndecane-1 bis -4 in MSC und U333 Glioma-Zellen, die jeweilige Bindungspartner zu identifizieren.

Überraschenderweise reagierten dabei Syndecan-1-Antikörper der Firma Zymed in MSC an Zell-Zell-Verbindungsstellen. Andere kommerziell erhältliche Antikörper gegen Syndecan-1 wie auch selbst hergestellte Meerschweinchen-Antikörper (vgl. Material und Methoden) dagegen reagierten nur diffus an der Zelloberfläche und nicht bevorzugt an Junctions.

Die Zymed-Antikörper gegen Syndecan-1 reagierten jedoch im Immunblot-Verfahren hauptsächlich mit einer Polypeptid-Bande, die einem Molekulargewicht von 90 kDa entsprach, dazu gelegentliche schwachen Banden bei 36, 55 und 200 kDa.

Durch 2D-SDS-PAGE-Kontroll-Experimente von Frau Dr. Wiebke Peitsch hat sich dann aber herausgestellt, dass die Kaninchen-Antikörper-Präparation der Firma Zymed mit β -Catenin kreuzreagiert. Daher muss die Reaktion an Zell-Zell-Verbindungsstrukturen als Reaktion mit dem dort bekanntlich angereicherte β -Catenin angesehen werden. Diese wirkliche Identität des Antigens wurde auch dadurch bestätigt, dass alle Zell-Zell-Adhärenz-Reaktionen, die mit diesem Zymed-Antikörper-Präparat erzielt waren, mit authentischen Cadherin- bzw. Catenin-Antikörpern reproduziert wurden. Ergebnisse, die mit dem besagten Zymed-Präparat erhalten worden waren, wurden daher dem nachgewiesenen β -Catenin zugeschrieben.

Antikörper gegen Syndecan-2, -3 und -4 zeigten eine diffuse Lokalisierung an der Zelloberflächen, färbten aber nicht die Zell-Zellgrenzen.

5 DISKUSSION

5.1 Mesenchymale Zellen und Tumore

Als "Mesenchym" wird in der Regel eine Anordnung, vor allem ein locker gefügtes - vor allem embryonales - Gewebe verschiedengestalter, oft spindelförmiger Zellen bezeichnet. Primäre mesenchymale Zellen entstehen aus Epithelgewebe, insbesondere aus dem Epiblast bzw. Ektoderm (Dye, 2002), und sind - im Gegensatz zu den Zellen der Epithelien - nicht obligatorisch und einer bestimmten - flächig angelegten - Gewebeordnung folgend miteinander verbunden (zu embryonalem Mesenchym siehe u.a. Franke et al., 1982a, 1983; Tam und Beddington, 1987; Hashimoto und Nakatsuji, 1989; Lawson et al., 1991; Hogan et al., 1994; Papaioannou, 2004). Epithelzellen dagegen sind miteinander durch verschiedene "Junctions" zu einem Zellschichten-System in einem bestimmten Gewebetyp-Muster vielfach gekoppelt (vgl. Farquhar und Palade, 1963), begrenzen meist die Oberfläche des Körpers oder die Lumina innerer Organe (zu Epithelzellformationen ohne Lumen siehe z.B. Literatur bei Langbein et al., 2003). Während die molekulare Zusammensetzung der Junctions von Epithelien inzwischen als weitgehend aufgeklärt gelten kann (siehe Einleitung und dort zitierte Artikel) sind mesenchymale Zellverbindungen - abgesehen von bestimmten Endothel-, Herzmuskel- und Nervenstrukturen - in ihrer molekularen Architektur noch immer weitgehend unbekannt, sowohl was normale Zellen und Gewebe als auch die davon abgeleiteten Tumorformen betrifft (Übersichten zu mesenchymal abgeleiteten Tumoren finden sich in der Pathologie-Literatur u.a. bei Henderson et al., 1986; Ghadially, 1988; Katenkamp und Stiller, 1990; Enzinger und Weiss, 1995; Damjanov und Linder, 1996; Dickersin, 2000; Weiss und Goldblum, 2001).

Bereits zu Beginn der Arbeiten zu dieser Dissertation fielen mehrere sowohl ultrastrukturell als auch molekular ungewöhnliche Zell-Zell-Verbindungstypen auf, die nicht unter die bisher klassifizierten Adhärenz-Zellverbindungen (vgl. Einleitung, **Tab. 2**) subsumiert werden konnten und offensichtlich Strukturen eigener Art waren. Wegen ihrer besonderen biologischen Bedeutung wurden dann zwei von ihnen in das Zentrum der weiteren Untersuchungen gestellt: Einmal die höchst komplexen - und oft ausgedehnten - Junctions zwischen Astrocytomzellen, vor allem in Kulturen, die in der Zellbiologie schon vielfach als besondere "Referenz-Linien" dienten, etwa bei der Erforschung des Cytoskeletts (vgl. u.a. Angaben und Übersichten bei Pontén et al., 1969; Bignami und Dahl, 1985; Dahl, 1981; Dahl et al., 1981; Osborn et al., 1980, 1981, 1984, 1989; Schnitzer et al., 1981;

Yokoyama et al., 1981; Huber und Matus, 1984; Eng et al., 1985; Sarker und Cowan, 1989; Trojanowski, 1989; Schwechheimer, 1990; Pekny und Pekna, 2004), und zum anderen die in ihrer molekularen Zusammensetzung recht schlichten "Adhering Junctions" (AJ), die mesenchymale Stammzellen miteinander verbinden, sei es als kleine *Puncta adhaerentia* oder als verschieden lange Adhärenz-"Pfahlwurzeln" (*Manubria adhaerentia*; "Adherens Interlocks"). Diese beiden Zelltypen und ihre Junction-Strukturen sind auch deshalb von Anfang an zusammen betrachtet worden, weil - wie sich bald herausstellte - beide verschieden lange, teils verzweigte Kontakt-suchende, Tentakel-artige Fortsätze bilden können.

5.2 Bedeutung der Glia-Zellen in Biologie und Medizin

Gliazellen sind nicht-neuronale Zellen des Nervensystems, die Neuronen unterstützen und gemeinhin in Mikroglia ("Gehirnmakrophagen") und Makroglia unterteilt werden können. Letztere (Astrocyten und Oligodendrocyten) stammen ursprünglich aus dem Ektoderm (eine neuere Übersicht z.B. bei Panicker und Rao, 2001). Astrocyten nehmen am Stoffwechsel der Neuronen teil, zeigen eine vielfältige Morphologie und in vielen Fällen eine gewisse polare Anordnung: Ein Teil ist den Gehirnkapillaren zugewandt, der andere den Neuronen. In meisterlicher Klarheit ist diese typische Konstellation zum Beispiel bereits 1981 als Titelbild (Abb. 41) der einschlägigen Anthologie, die unter dem Titel "Glial-Neurone Interactions" von J.E. Treherne herausgegeben worden ist und erstmalig im "Journal of Experimental Biology" erschienen war.

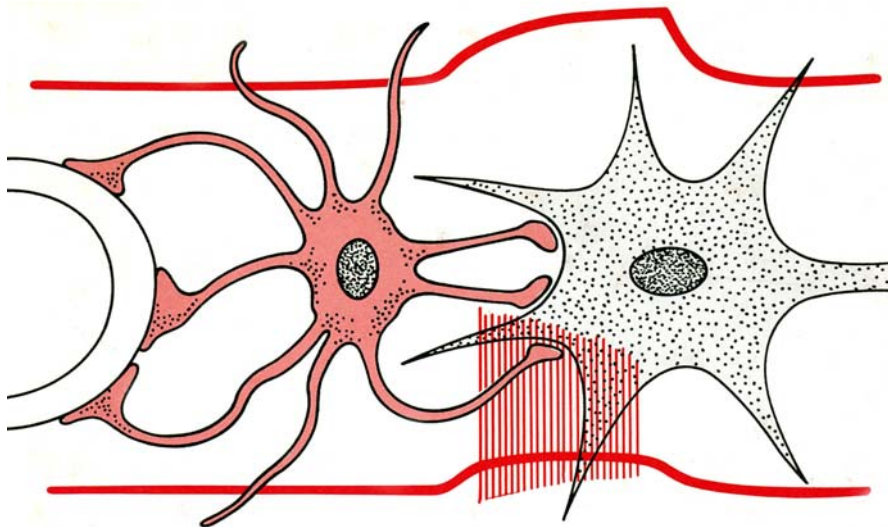


Abb. 41. Skizze als Titelbild der Anthologie "Glial-Neurone Interactions" (J.E. Treherne, Hrsg., 1981), in der die "krakenartige" Position des Astrozyten mit seinen typischen Zellfortsätzen dargestellt ist, die mit ihren Saugnapf-artigen "End-feet" sowohl mit den Kapillaren (links) als auch den Neuronen (rechts) in vielfachem Kontakt stehen.

Somit befinden sich Astrocyten oft in einer Position, die eine Bildung von heterotypischen Zellverbindungen begünstigt, ja geradezu erzwingt, nämlich mit Neuronen einerseits und mit Endothelzellen oder auch Pericyten andererseits, die aber auch homotypische Kontakte mit anderen Astrocyten erlaubt (Literatur und Übersichten u.a.: Phelps, 1972; Bloom und Fawcett, 1975; Peters et al., 1976; Weiss und Greep, 1977; Treherne, 1981; Landis und Reese, 1981; Bär, 1983; Zenker, 1994; Jones und Cowan, 1997; zur Evolution vgl. auch Lane, 1981; Orkand et al., 1981). Die eigentliche Blut-Hirn-Schranke bilden mit Hilfe der "Tight Junctions" (TJ) aber die Endothelzellen, Astrocyten sind hier nur zusätzlich mit der Umhüllung und Unterstützung der Hirnkapillaren beteiligt (vgl. Kapitel 4.1.11). Das Cytoskelett der Astrocyten, besonders der sog. fibrillären Astrocyten, ist sind meist reich an zelltypischen Intermediärfilamenten (IF; "Gliafilamente"); sie können aber auch - oft - zusätzlich Vimentin-IF enthalten (Schnitzer et al., 1981; weitere Literaturangaben im vorigen Abschnitt).

Obwohl Glia-Zellen die Mehrheit der Zellen im zentralen Nervensystem repräsentieren, haben sich bisher nur relativ wenige Arbeiten damit beschäftigt, ihre interzellulären Verbindungen zu charakterisieren, sowohl in normalen als auch in maligne transformierten Zellen (vgl. z.B. Liu und Bahu, 1975; Nabeshima et al., 1975; Landis und Reese, 1982; Hirose et al., 2001). Was insbesondere die Plaque-tragenden *Adhaerens*-Verbindungen angeht, wurde das Vorkommen N-Cadherin-haltiger AJ von verschiedenen Glia-Zelltypen berichtet, so von primären Astrocyten-Kulturen (u.a. Neugebauer et al., 1988; Tomaselli et al., 1988; Perego et al., 2000, 2002), Glioma- bzw. Oligodendrocyten-Kulturen (Payne et al., 1996; Gerhardt et al., 2000a,b) und auch bestimmten Gliazellen *in situ* (u.a. auch Schwann-Zellen; Dermietzel, 1974; Mugnaini und Schnapp, 1974; Reale et al., 1975; zu Angaben und Literaturzitate zu TJ bzw. Claudinen in Myelinscheiden bei Morita et al., 1999, und in der jüngst erschienenen Arbeit von Miyamoto et al., 2005; zu AJ siehe u.a. Bixby et al., 1988; Hasegawa et al., 1996; Vázquez-Chona und Geisert, 1999; eine umfangreiche Literatur-Übersicht findet sich bei Redies, 2000). Das *arm*-Protein Neurojungin (δ -Catenin/NPRAP; vgl. Paffenholz et al., 1997) kommt z.B. außer in AJ von Neuronen auch in bestimmten Gliazellen vor (z. B. Müller-Glia-Zellen der Retina; vgl. Paffenholz et al., 1999). Das Vorkommen der TJ-Proteine Occludin (Bauer et al., 1999) und Protein ZO-1 (Howarth et al., 1992) in primären und sekundären Astrocyten-Kulturen wurde ebenfalls berichtet.

Wegen ihrer besonderen anatomischen und histologischen Position sind Makroglia- bzw. Glioma-Zellen daher ein geeignetes Untersuchungsobjekt für die Aufklärung homo- wie

heterotypischer Zell-Zell-Verbindungen. Dabei sollten die auffälligen Zellverbindungen in bestimmten Glioma-Kulturzellen zunächst untersucht werden, auch als Voraussetzung für spätere Untersuchungen an Zellen normaler und maligne transformierter Gewebe.

5.2.1 Ein neuer Typ von Adhering Junctions: Die *Colligatio permixta* von Glioma- und Glia-Zellen

Zunächst in den untersuchten Zellkulturen von Astrocytom-Linien (z.B. U333), dann aber auch in anderen Glioma-Linien, in entsprechenden Tumoren *in situ* und in primären Zellkulturen von Astrocyten aus Mäuse-Gehirn, wurden verschieden große und gestaltete Zell-Zell-Verbindungen beobachtet, die offenbar eine neuartige Struktur, gewiss aber ein neuartiges Struktur-Ensemble von Junction-Proteinen darstellten. Deshalb sind sie als neuer komplexer Typus von Zellverbindungen klassifiziert und bezeichnet worden: *Colligatio permixta* (CP).

Das Auftreten solcher häufiger und ausgeprägter Zellverbindungen in Astrocyten und davon abgeleiteten Tumoren ist eigentlich nicht erwartet worden, da in der ausgedehnten Fachliteratur zu diesen Zelltypen nur selten - und meist nur wage - Hinweise auf Junctions dieser Kategorie zu finden sind, immunhistochemische Lokalisierungen anscheinend gar nicht. So findet man in der immer noch ausführlichsten elektronenmikroskopischen Übersicht "The Fine Structure of the Nervous System" von Peters, Palay und Webster (1976) neben Bildern von durchaus auffälligen und klaren "Gap Junctions" nur wenige und in der Beschreibung recht unklare Hinweise auf nicht-synaptische, plaque-tragende Strukturen, so am deutlichsten noch auf Seite 240-241 (auch dort aber ohne Bildbeispiel):

"Also occurring between the plasma membranes of adjacent astrocytes are punctate adhesions that have some features in common with *zonulae adhaerentes* (Farquhar and Palade, 1963), and are therefore called *puncta adhaerentia* ... At such *puncta* the distance between adjacent membranes increases to about 25 to 30 nm, and the two plasma membranes come to lie exactly parallel to each other. No central line is apparent in the interval between the adjacent membranes, but these adhesions are characterized by some increase in electron density both within the gap and in the cytoplasm immediately on each side of the adhesions."

Ähnlich spärlich und unklar, was Gliatumore betrifft, sind Angaben in entsprechenden Pathologie-Anthologien, wie z.B. die von Ghadially (1988; vgl. dort Angaben über "desmosome-like structures" in some "Schwannomas"), Henderson et al. (1986; dort z.B.

"small intermediate junctions, Fig. 17.4) oder Dickersin (2000; dort z.B. S. 499, ohne jedes Bildbeispiel: "Intercellular junctions are found in astrocytomas but they are ususally infrequent and small.").

Das generelle Vorkommen von N-Cadherin in Nervengewebe, und zwar in Neuronen wie in Glia-Zellen, auch in Astrocytomen und Glioblastomen, war zwar schon lange bekannt (Hatta und Takeichi, 1986; Hatta et al., 1987; Hirano et al., 1987; Takeichi, 1988, 1993; Tomaselli et al., 1988; Redies et al., 1992, 1993a, b; Redies und Takeichi, 1993a, b; Shinoura et al., 1995; Literatur-Übersichten bei Okada, 1996; Redies, 2000), ebenso das Vorkommen von α -Catenin (Shinoura et al., 1995). Kürzlich haben Perego et al. (2002) das generelle Vorkommen von N-Cadherin in primären Ratten-Astrocyten-Kulturen wie in diversen Menschen-Astrocytoma- bzw. -Glioblastoma-Zellkultur-Linien, zusammen mit den Plaque-Proteinen α - und β -Catenin und dem AJ-Protein LIN-7, nachgewiesen, verbunden mit der Aussage, dass eine relativ geringe Stabilität und AJ-"Ordnung" zu einem erhöhten Motilitäts- und Invasionsverhalten solcher Tumorzellen führen würde.

Umso mehr hat die Häufigkeit und morphologische Vielfalt der *Colligationes permixtae* in Glioma-Zellkulturen überrascht, wobei die Möglichkeit der immuncytochemischen Ansprache und Differenzierung besonders sicher hilfreich war. Die molekulare Ausstattung des CP-Grundtypus ist in der **Tabelle 12** zusammengefasst.

Tab. 12. Proteine, die immunfluoreszenz-mikroskopisch und biochemisch in der *Colligatio permixta* menschlicher Glia- und Gliom-Zellen nachgewiesen werden konnten (vgl. auch Tab. 4 und 5).

Transmembran-Proteine	Plaque-Proteine
N-Cadherin	α -Catenin
Cadherin-11	β -Catenin
(VE-Cadherin)*	Protein p120 ^{ctn}
	Protein ARVCF
	Plakoglobin
	Plakophilin 2
	Protein ZO-1
	Protein ZO-2
	Cingulin
	Afadin
	Vinculin

*In manchen Zellen deutlich, in vielen aber nicht nachzuweisen.

5.2.1.1 Die Cadherine der *Colligatio permixta*

Die *Colligatio permixta* (CP) von Glioma-Zellen ist durch ein typisches Ensemble von drei Cadherinen charakterisiert, wobei diese nicht alle in allen Zellverbindungen vorzukommen scheinen. Grundsätzlich können in Astrocytomzell-Kulturen drei Cadherine nebeneinander angetroffen werden: N-Cadherin, Cadherin-11 und VE-Cadherin.

Das Vorhandensein von N-Cadherin-haltigen Adhärenzverbindungen überrascht nicht, da dieses Typ-I-Cadherin bereits in AJ von normalen wie pathologisch entarteten Astrocyten *in situ* wie in primären Astrocyten- bzw. Glioma-Kulturen (z.B. Hatta et al., 1987; Hirano et al., 1987; Bixby et al., 1988; Neugebauer et al., 1988; Matsunaga et al., 1998; Takeichi, 1988, 1993; Tomaselli et al., 1988; Redies und Takeichi, 1993a, b; Shinoura et al., 1995; Vázquez-Chona und Geisert, 1999; Gerhardt et al., 2000a, b; Perego et al., 2000, 2002), übrigens auch in Oligodendrocyten-Kulturen (Payne et al., 1996), beschrieben worden war (weitere Literaturangaben bei Redies, 2000). Insbesondere ist schon recht früh eine stimulierende und induzierende Wirkung von N-Cadherin - auf welchem Träger auch immer, also auch von Glia-Zellen und anderen Neuronen - aufgefallen (u.a. Bixby et al., 1988; Matsunaga et al., 1988; Tomaselli et al., 1988; weitere Literatur-Angaben bei Colman, 1997; Redies, 1997, 2000; vgl. auch Hazan et al., 2000), und Cadherine - vor allem das N-Cadherin - sind wohl auch regulatorisch an der Bildung von "Spines" und Synapsen beteiligt (neuere Literaturübersichten bei Togashi et al., 2002; Takeichi und Abe, 2005).

Cadherin-11 ist ein Typ-II-Cadherin, welches in vielen Geweben mesenchymalen Ursprungs vorkommt, oft gemeinsam mit N-Cadherin (Okazaki et al., 1994; Hoffmann und Balling, 1995; Kimura et al., 1995; Simonneau et al., 1995; Suzuki, 1996; Cheng et al., 1998; Simonneau und Thiery, 1998; Kashima et al., 1999; Schulz, 1999; Kawaguchi et al., 1999, 2001; Shin et al., 2000; De Wever et al., 2004; Hinz et al., 2004; zum Auftreten von Cadherin-11 im Endometrium und einigen embryonalen Epithelgeweben siehe McCalman et al., 1996). Einige der Immunlokalisierungsbefunde dieser Arbeiten könnten so interpretiert werden, dass Cadherin-11 nicht in allen N-Cadherin-haltigen CPs vorkommt (vgl. z.B. **Abb. 14**), doch kann derzeit auch eine lokale Unzugänglichkeit als Ursache einzelner negativer Reaktionen nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Besonders überraschend und entwicklungsbiologisch interessant ist aber das Auftreten von VE-Cadherin, einem bisher ausschließlich in Endothelzellen beschriebenen Cadherin (Lampugnani et al., 1992, 1995, 2002; Schulze und Firth, 1993; Breviario et al., 1995; Dejana et al., 1999; Übersichtsartikel: Dejana, 1996, 2004; zu funktionellen Aspekten

und möglichen Bindungspartner siehe auch Hordijk et al., 1999, sowie Calkins et al., 2003; was die besondere Situation der endovaskulären Trophoblastzellen betrifft, siehe Bulla et al., 2005, und dort zitierte weitere Literatur). Eine endotheliale Kontamination der Glioma-Zellkulturen konnte dabei mit mehreren "Markern" wie Faktor-VIII, von-Willebrand-Faktor und Claudin-5 ausgeschlossen werden. Entsprechend wurde auch hier die Glia-Herkunft dieser Zellen durch den Nachweis von Gliafilament-Protein in allen Zellen nachgewiesen (vgl. dazu Zitate in 5.1; ferner u.a. Goldmuntz et al., 1986; Rood et al., 2000; zu Schwann-Zellen siehe auch Hasegawa et al., 1996). Schließlich ist eine Kontamination der benutzten - seit Jahrzehnten etablierten und in unserem Laboratorium mehrfach, so auch im Rahmen dieser Arbeit klonierten - Astrocytom-Kulturzell-Linien ebenso ausgeschlossen, wie die Signifikanz der VE-Cadherin-haltigen Junctions durch regionale Segregation (Regionen mit und ohne erkennbares N-Cadherin in derselben Zelle) demonstriert werden kann (z.B. **Abb. 21**). Denn während N-Cadherin und Cadherin-11 in den Kulturen meist in vergleichbaren Mengen und in Kolokalisierung vorzukommen scheinen, was mit dem Vorliegen isostöchiometrischer Heterokomplexe vereinbar wäre (zu verschiedenen Struktur-Vorstellungen von Cadherinen siehe z.B. Shapiro et al., 1995; Steinberg und McNutt, 1999; Leckband und Sivasankar, 2000; Ahrens et al., 2003), ist das VE-Cadherin meist nur auf eine Gruppe von Zellen oder sogar nur auf einen Teil der Oberfläche einer bestimmten Zelle begrenzt (vgl. z.B. **Abb. 10, 14**). Aber auch das schließt die Existenz bestimmter Hetero-Cadherin-Komplexe - *cis* wie *trans* - in diesen Junctions natürlich nicht aus.

Dabei erschien sowohl das VE- als auch das N-Cadherin durchaus in Junctions konzentriert, ob allein oder zusammen oder in Kolokalisierung mit Cadherin-11. Das war zunächst besonders bemerkenswert, da die herrschende Lehrmeinung besagte, dass zwar das VE-Cadherin, nicht aber das N-Cadherin in Junctions von Endothel-Zellen konzentriert sei; letzteres käme vielmehr relativ diffus über die allgemeine Zelloberfläche verteilt vor (Salomon et al., 1992; Navarro et al., 1998; Gerhardt und Betsholt, 2003; Jaggi et al., 2002; vgl. auch Übersichten von Dejana, 2004; siehe aber auch Alexander et al., 1993; Schulze und Firth, 1993). In der vorliegenden Arbeit konnte das aber sehr bald als Artefakt demonstriert werden: In immunocytochemischen Versuchen an Kulturen von Endothelzellen - wie etwa humanen HUVEC- und Astrocytom-Zellen - erschien das N-Cadherin an den Zell-Zell-Adhärenz-Strukturen konzentriert, wenn nicht sogar überwiegend darauf beschränkt, so lange nur die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration hoch genug war, d.h. $>22 \mu\text{M}$. Entsprechende Beobachtungen wurden dann nach Fertigstellung dieser Arbeit auch von Luo und Radice (2005) berichtet, und zwar sowohl ein Vorkommen von N-Cadherin angereichert in der

Zonula adhaerens von Blutgefäßen in Geweben wie in Kulturzellen (vgl. Schulze und Firth, 1993) als auch - diffus - auf der Oberfläche von Endothelzellen in Kultur. Luo und Radice (2005) schließen in ihren Experimenten bemerkenswerterweise auf eine regulatorische Beeinflussung des VE-Cadherin-Gens durch N-Cadherin.

Direkte Komplexe der drei Cadherine in den Glioma-Zellen durch "Über-Kreuz-Immunpräzipitationen" waren bisher nicht nachweisbar, auch keine "Paar-Komplexe" von jeweils zwei Cadherinen, obwohl in der Doppel-Antikörper-Immunlokalisierung durchaus häufig Kolokalisierungen, besonders von N-Cadherin und Cadherin-11, festgestellt wurden (vgl. **Abb. 14**). Auf der anderen Seite entspräche, was die Existenz interzellulärer Komplexe angeht, das Auftreten von homotypischen Cadherin-Komplexen der dominierenden "Homotypischen Cadherin-Adhäsions-Hypothese" (vgl. „Besondere Definitionen und Terminologie“; betr. heterotypischer, *trans*- wie *cis*-Komplexe siehe u.a. auch Niessen und Gumbiner, 2002; Straub et al., 2003).

Regionale bzw. auf einen Subtypus beschränkte Teilpopulation ist kürzlich auch für N-Cadherin - großenteils aber außerhalb von Junctions - in den E-Cadherin-dominierten Epithelzellkulturen der Linie MDCK berichtet worden (Youn et al., 2005), wobei jedoch vor allem eine Art Unvereinbarkeit der Bildung von AJ mit beiden Cadherinen (E/N) und ein negativer Effekt auf die normale epitheliale MDCK-Ordnung behauptet wurde.

5.2.1.2 Zur Bedeutung der Cadherin-Komplexe beim Aufbau von Endothel-Glia-Zell-Verbänden

In ihrer natürlichen histologischen Position ist es für Astrocyten möglich und typisch - besonders über ihre typischen Zellausläufer mit "Endfüßchen" ("End feet") -, außer homotypische Junctions untereinander auch heterotypische Kontakte mit anderen Zelltypen bilden zu können, so z.B. mit Neuronen und Endothelzellen (vgl. u.a. Phelps, 1972; Roots, 1981; Treherne, 1981; Bär, 1983; Wolburg et al., 1994, 2002; Brillaut et al., 2002; Duan et al., 2004; Hamm et al., 2004). Sei es durch heterotypische Kontakte oder durch sezernierte Faktoren, Astrocyten scheinen sowohl zur Bildung von semistabilen Neuronen-Kontakten als auch von Verbindungen mit Endothelzellen - besonders beim Aufbau der Blut-Gehirn-Schranke - beizutragen (Wolburg et al., 1994; Engelhardt, 2003; Hirakawa et al., 2003; Duan et al., 2004; dort weitere Literaturangaben). Die Barriere-Funktion bleibt dabei natürlich vornehmlich durch die TJ der Endothelzellen - mit Beiträgen der AJ - bestimmt (vgl. Übersichten bei Kniesel et al., 1996; Kevil et al., 1998; Liebner et al., 2000c; Wolburg und

Lippoldt, 2002; Engelhardt, 2003; Hirakawa et al., 2003; zu AJ und Cadherinen siehe u.a. auch Alexander et al., 1993; Breviario et al., 1995; Hordijk et al., 1999; zu menschlichen Hirnkapillaren *in situ* siehe u.a. auch Vorbrodts und Dobrogowska, 2004), andererseits ist deren enge Wechselwirkung mit den Glia-Zellen aber wohl zur Herstellung und Stabilisierung eines stabilen Gewebeverbandes und eines typischen "Microenvironment" erforderlich (zu Gen-Defekt- bzw. -Ausschaltungs-Experimenten und zum Einsatz von Endothelzell-Astrocyten-Ko-Kulturen siehe auch Rubin et al., 1991; Wolburg et al., 1994; Cecchelli et al., 1999; Liebner et al. 2000a-c; Brillault et al., 2002; Nico et al., 2003; Dejana, 2004; Hamm et al., 2004; Luo und Radice, 2005; zu entsprechenden pathologischen Beobachtungen siehe auch Liebner et al., 2000a; Wolburg et al., 2003). Bei den bisherigen Analysen nach Ausschaltung des Gens für VE-Cadherin sind allerdings außer den - frühlethalen - Hemmungen der Gefäßbildung spezifische Glia-Effekte noch nicht beobachtet worden (Carmeliet et al., 1996, 1999; Vittet et al., 1997; zu Zell-Transfektions- und Inhibitionsversuchen siehe auch Ali et al., 1997; Bach et al., 1998; van Buul et al., 2002); hierzu wären aber wohl auch besondere experimentelle Strategien vonnöten.

Auch in Ko-Kultur-Experimenten von U333-Glioma-Zellen mit Endothel-Zellen hat sich bei Versuchen im Rahmen dieser Arbeit herausgestellt, dass Glioma-Zellen durchaus fähig sind, auch *in vitro* mit Endothelzellen *trans*-heterotypische AJ-Strukturen zu bilden (siehe z.B. **Abb. 23**).

5.2.1.3 Plaque-Komponenten der *Colligatio permixta*

Die in nennenswerten Konzentrationen festgestellten molekularen Komponenten der Plaques dieser Junctions sind die *Arm*-Proteine β -Catenin, Protein p120^{ctn}, Plakoglobin, Plakophilin 2 und Protein ARVCF, aber auch die Nicht-*Arm*-Proteine α -Catenin, Vinculin (zum generellen Vorkommen von Komplexen der beiden teilverwandten Proteine α -Catenin und Vinculin in AJ-Plaques siehe auch Hazan et al., 1997; Weiss et al., 1998) und Afadin, außerdem die als TJ-Komponenten bekannten Proteine ZO-1 und ZO-2 sowie Cingulin kommen regelmäßig in diesen Strukturen vor (zur unterschiedlichen Verteilung von Plakoglobin und β -Catenin am N-Cadherin von Hühnchen-Hirn-Endothel siehe Liebner et al., 2000b). Die besondere Cadherin-Komplex-Bildung der Plaque-Proteine ist - auch für N- und VE-Cadherin - in der jüngeren Fachliteratur ausführlich dargestellt worden (Anastasiadis und Reynolds, 2000; Iyer et al., 2004; Wheelock und Johnson, 2003; Perez und Nelson, 2004; Hatzfeld, 2005; Schmidt und Jäger, 2005). Die vorliegende Arbeit beweist andererseits jedoch

schlagend, dass die für E-Cadherin gemachte Aussage von Mariner et al. (2000), die Proteine ARVCP und p120^{ctn} würden sich gegenseitig als Bindungspartner ausschließen, für die N-Cadherin-haltige CP nicht zutrifft.

Es wurden also neben den identifizierten Adhärenz-Verbindungs-Plaques-Proteinen (beide Catenine, Plakoglobin, p120^{ctn}, Protein ARVCF) überraschenderweise auch TJ-Proteine in diesen Zellen gefunden, nämlich ZO-1, ZO-2 und Cingulin. Die Proteine ZO-1 und ZO-2 sind allerdings nicht auf TJ beschränkt, sondern wurden auch schon in AJ-Plaques von diversen nicht-epithelialen Zellen (u.a. Jesaitis und Goodenough, 1994; Howarth und Stevenson, 1995; transiente "dynamische" Komplexe mit Cateninen sind von Rajasekaran et al., 1996, beschrieben worden) und in Verbindung mit Connexinen in "Gap Junctions" (Giepmans und Molenaar, 1998; Toyofuku et al., 1998, 2001; Ai et al., 2000; Laing et al., 2001; Singh und Lampe, 2003) beschrieben. Allerdings wurde in den Glioma-Zellkulturen eine weitgehende Kolo-kalisierung der ZO-Proteine nur mit CP-Proteinen, nicht aber mit Gap-Junction-Connexinen beobachtet. Das Vorhandensein von Cingulin in CP war dabei ebenfalls unerwartet. Dagegen waren die sonst in TJ vorhandenen Transmembran-Proteine Occludin, JAM und diverse Claudine (siehe "Ergebnisse" sowie "Material und Methoden") in CP-Strukturen nicht nachweisbar. Bemerkenswerterweise wurden jüngst ein Claudin (Claudin-19) sowie weitere TJ-Proteine und TJ-ähnliche Strukturen in den Schwannschen Myelinscheiden peripherer Axone nachgewiesen und mit einer elektrophysiologischen Isolierungsfunktion in Verbindung gebracht (Miyamoto et al., 2005).

Ebenfalls war das desmosomale Protein Plakophilin 2, ein Protein mit "dualem" Vorkommen in Desmosomen und im Zellkern (Mertens et al., 1996, 1999, 2001; Mertens, 1999), regelmäßig in den CP nachweisbar, wogegen andere desmosomale Komponenten wie desmosomale Cadherine, Desmoplakin und andere Plakophiline fehlten. Die CP-spezifische Kombination des desmosomalen Plaques-Proteins Plakophilin 2 mit der TJ-Plaques-Komponente Cingulin und den Plaques-Proteinen von AJ ist ungewöhnlich, vor allem auch bei gleichzeitiger Abwesenheit desmosomaler Cadherine. Plakophilin 2 wurde allerdings auch in den Glanzstreifen des Herzens in nicht-desmosomalen Zell-Zell-Verbindungsstrukturen lokalisiert (Mertens et al., 1996, 1999; Mertens, 1999; Borrmann, 2000; Grossmann et al., 2004). Ebenfalls kommt Plakophilin 2 in den heterotypischen Zellverbindungen der *Zona limitans externa* der Retina - zusammen mit den Plaques-Proteinen Neurojungin, α - und β -Catenin, Vinculin, α -Actinin, Symplekin und Protein ZO-1 - vor (Paffenholz et al., 1999), auch in Zell-Zell-Verbindungsstrukturen desmosomen-freier Zellkulturen nicht-epithelialer

Herkunft (humane SV80 Fibroblasten und RD Rhabdomyosarkomzellen, 3T3 Maus-Fibroblasten und RV Rattenzellen aus der glatten Gefäßmuskulatur; vgl. Mertens, 1999).

An welche anderen CP-Proteine Plakophilin 2 und Cingulin binden, ist bisher unklar, ebenso der Mechanismus, durch den Plakophilin 2 und Cingulin in die CP-Plaques integriert und dort angereichert werden. In der Literatur ist berichtet worden, dass in Desmosomen-Strukturen Plakophilin 2 mit seinem Kopf-Teil direkt an β -Catenin und Plakoglobin binden kann (Chen et al., 2002), grundsätzlich auch eine Möglichkeit in CP-Plaques. Da außerdem auch eine Bindung von Cingulin an Protein ZO-1 berichtet worden ist (Cordenosi et al., 1999; D'Atri et al., 2002), ebenso wie eine Protein-ZO-1-Bindung an α - und β -Catenin (vgl. u.a. Rajasekaran et al., 1996; Itoh et al., 1997; Imamura et al., 1999; was α -Catenin-unabhängige ZO-1-Bindungen betrifft, siehe auch Yokoyama et al., 2001) und so indirekt auch an E-Cadherin (u.a. Ohsugi et al. 1997), sind für eine Bindung des CP-ZO-1 sowohl Cingulin als auch beide Catenine als Partner vorstellbar. Diese Interaktionen müssen in Zukunft im Detail - etwa mit "Yeast-two-hybrid Assays", Immunpräzipitationen und "Crosslinking"-Experimenten - aufgeklärt werden.

Der Nachweis von Afadin in CP-Strukturen ist ebenfalls bemerkenswert, da es bisher wohl in epithelialen und nicht-epithelialen AJ-Strukturen beschrieben wurde, u.a. den Glanzstreifen des Herzens (Takahashi et al., 1999), Endothelien (Bazzoni und Dejana, 2004) und Synapsen-Strukturen von Neuronen beschrieben (Übersichten bei Takai und Nakanishi, 2003; Tanaka et al., 2003; Mandai et al., 1997), nicht aber in Junctions von Astrocyten bzw. Astrocytomzellen.

5.2.1.4 Zur Signifikanz von Doppelimmunlokalisierungen in CP und anderen komplexen Strukturen und zur möglichen histopathologischen Bedeutung von CP

Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie-Untersuchungen in dieser Arbeit haben ergeben, dass die drei Cadherine und die oben erwähnten Plaque-Proteine topologisch koexistieren, d.h. an einem Ort eng beieinander liegen, wo sie - zumindest z.T. - nicht als getrennt aufgelöst werden. Das Auftreten einer entsprechenden - hier in der Regel gelben - Mischfarbe wird allgemein dahingehend interpretiert, dass diese Proteine als Bestandteil einer größeren Struktur - hier also einer CP bzw. des CP-Plaques - vorkommen. Die Kolokalisierung dieser Proteine war jedoch an vielen Stellen nicht vollkommen, d.h. neben "gelben" Mischfarben-Strukturen waren auch noch "grüne" und "rote" Teilstrukturen erkennbar. Auch grundsätzlich

bedeutet eine "gelbe" Mischfarbe ja nicht, dass die Proteine Teil derselben molekularen Struktur sind, sondern nur dass sie sich räumlich sehr nahe sind.

Ultrastrukturell stellten die CP verschieden große Zell-Zell-Verbindungen, in der Regel mit einem elektronendichten cytoplasmatischen Plaque, dar, z.T. mit einer als punktierte Linie erscheinende "Midline"-Struktur (vgl. **Abb. 18**). Desmosomen oder TJ-ähnliche Strukturen waren nicht nachweisbar. Dieser CP-Typ ist - z.T. mit kleinen Abweichungen - auch in anderen Glioblastoma-Zellkultur-Linien wie T98G und U373MG sowie in primären Astrocyten der Maus und in bestimmten menschlichen Glioblastom-Gewebeproben nachweisbar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, die zelltypische molekulare Ausstattung der CP auch bei der immunhistodiagnostischen Ansprache von entsprechenden Tumoren einzusetzen. Eine diesbezügliche diagnostisch-pathologische Veröffentlichung ist in Vorbereitung, wobei auch auf die Ergebnisse derzeitiger Subtyp-Klassifizierungsversuche nach Genexpressionsmustern zu achten sein wird (vgl. z.B. Godard et al., 2003; Kelley et al., 2005; zu Untersuchungen im biologischen Verhalten tierischer Modell-Glioma-Typen siehe auch Grobbs et al., 2002). Dabei ist die in dieser Arbeit erstmals gemachte Beobachtung eines Gliatumor-Subtypus, dessen CP zusätzlich VE-Cadherin enthalten, also eines Zelladhäsions-Glykoproteins, das bisher nur in Endothelzellen gefunden worden war, von besonderer Bedeutung und fordert eine ausgiebige Charakterisierung sowohl nach Zelltyp- als auch nach Tumor-Eigenschaften heraus (Kleihues und Cavenee, 1997, 2000; vgl. hierzu auch die Diskussion bei Perego et al., 2002, und Kleihues et al., 2002). Eine besonders große Herausforderung im Rahmen der herrschenden Lehrmeinungen zur Tumorgenese stellt dabei die Beobachtung innerhalb der geschilderten Klonierungsversuche dar, dass dabei keine "reinrassigen" Klone selektioniert werden, wie früher bei anderen - auch nichtepithelialen - Zellkulturen gezeigt worden ist (u.a. Knapp und Franke, 1989; Knapp et al., 1989), sondern dass die immer wieder neu, offenbar zeitlich und räumlich spontan auftretende Bildung etwa von VE-Cadherin-positiven Astrocytomzellen gewissermaßen eine inhärente Variabilitäts-Eigenschaft solcher Tumorzellen darstellt, eine Eigenschaft der Zelltyp-Änderung, die gerade auf der Basis der vom jeweiligen Cadherin-Muster abhängigen Zell-Zell-Wechselwirkung zu stets neuen Tumor-Subtypen mit veränderten Metastasierungs-, Andock- und Resistenzverhalten führen muss. Inwieweit solche molekularen Veränderungen mit erhöhter Mobilität und Invasivität von Gliomen korrelieren, wird nun auch in Zellkulturen, Modell-Tierversuchen und histodiagnostischen Vergleichen zu prüfen sein (vgl. z.B. auch Manning et al., 2000; Yap et al., 2005).

5.3 Mesenchymale Stammzellen bei Säugetieren - embryonale und adulte Formen: Definitionen und Hypothesen

Die Bezeichnung "mesenchymal" wird in jüngerer Zeit nicht mehr nur für die entsprechenden embryonalen Zellen und Gewebe verwandt, sondern auch für äquivalente, vom embryonalen Mesenchym abgeleitete postnatale Zellen und Gewebe, später auch mit der allgemeinen Zusatzbezeichnung "adulte" mesenchymale Zellen bzw. sogar "adulte mesenchymale Stammzellen", so z.B. üblicherweise für die aus Knochenmark bzw. Nabelschnurblut erhaltenen Zelltypen, die in Zellkultur propagiert und zu bestimmten Differenzierungsleistungen veranlasst werden können (jüngere Beispiele und Literatur-Übersichten: Prockop, 1997; Makino et al., 1999; Pittenger et al., 1999; Caplan und Bruder, 2001; Minguell et al., 2001; Orlic et al., 2001a, b, 2002; Reyes et al., 2001, 2002; Chedrawy et al., 2002; Fukuda, 2002; Jiang et al., 2002; LaBarge und Blau, 2002; Phinney, 2002; Verfaillie, 2002; Verfaillie et al., 2002; Ortiz et al., 2003; Harris et al., 2004; Hermann et al., 2004; Kucia et al., 2004; zur generell kontroversen Diskussion siehe z.B. auch Raff, 2003; Wagers und Weissman, 2004). Angesichts der grundsätzlichen Bedeutung und der vieldiskutierten Nutzungsmöglichkeiten sowohl der embryonalen als auch der adulten mesenchymalen Stammzellen zu regenerativen Therapien in der Medizin (siehe z.B. vorstehende Literaturangaben sowie für embryonale Stammzellen u.a. auch Brüstle et al., 1999; Smith, 2001; Boheler et al., 2002, und die jüngste Anthologie von Lanza et al., 2004, dort insbesondere Papaioannou, 2004) ist es überraschend, eigentlich unverständlich, wie gering das zell- und molekularbiologische Grundlagenwissen auf diesem Gebiet noch ist. Dies gilt in ganz besonderem Maße für die bei Zelldifferenzierungen und Gewebebildungen so wichtigen Zell-Zell-Wechselwirkungen und -Verbindungen, also das Gebiet der Junctions (siehe z.B. Takeichi, 1977; Steinberg, 1996; Niessen und Gumbiner, 2002; Duguay et al., 2003; Takeichi und Abe, 2005)

Bereits vor zwei Jahrzehnten war in der Abteilung für Zellbiologie am hiesigen Zentrum bei Arbeiten zur frühen Entwicklung der Maus aufgefallen, dass die primären Mesenchymzellen, die sich im sog. "Mesenchym-Spalt" ausbreiten, nicht nur die epithelialen Cytoskelett- und Zellverbindungsstrukturen ihrer Vorläufer in wenigen Stunden verlieren, sondern die entsprechenden typischen Strukturelemente mesenchymaler Zellen ausbilden (vgl. auch 5.1; Franke et al., 1982a, 1983; Hashimoto und Nakatsuji, 1989; Lawson et al., 1991, Tam et al., 1993). Dabei waren bereits damals elektronenmikroskopisch mehr oder weniger lange Zellfortsätze und viele kleine *Puncta adhaerentia*-artige Verbindungen

aufgefallen ("the frequency of small *punctum adhaerens*-like junctions" bzw. dazugehörige "interdigitations of processes of mesenchymal cells"; Franke et al., 1983). Auch Hashimoto und Nakatsuji (1989) hatten bemerkt und mit beeindruckenden "Surface Scanning"-Elektronenmikroskop-Aufnahmen belegt, dass solche Zellen - und zwar bereits die allerersten erkennbar nicht-epithelialen - sehr viele lange Fortsätze ausbildeten (z.B.

"... We observed a strikingly large number of filopodia which protruded from the mesoderm cells in the central primitive streak region. They consisted of two types: straight filopodia protruding from the cell body ...").

Als nun in orientierenden zellbiologischen Untersuchungen an Zellkulturen von aus menschlichem Knochenmark bzw. Nabelschnurblut gewonnenen adulten mesenchymalen Stammzellen grundsätzlich ähnliche, aber sowohl in Anzahl als auch in Länge noch viel stärker ausgeprägte Strukturen auffielen, war es offenbar geboten, diesen Beobachtungen nachzugehen und diese Strukturen molekularbiologisch aufzuklären. Die Haupt-Arbeitshypothese dabei war, dass solche z.T. sehr langen Fortsätze und die von ihnen gebildeten Junctions wesentliche Strukturen der Mesenchymbildung und davon ausgehender Gewebebildungen sind, diese Fortsätze (*Processus*) offenbar einen dynamisch-transienten Charakter haben, da sie sowohl *in situ* als auch in Zellkulturen sich in Länge und Häufigkeit relativ schnell verändern können und während der jeweiligen Zelldifferenzierungsprozesse bzw. Gewebebildungen auch in ihren molekularen Charakteristika rasch und zielgerichtet ändern können.

5.3.1 *Puncta et manubria adhaerentia*: Die beiden morphologischen Hauptformen der Adhärenz-Verbindungen mesenchymaler Stammzellen in Kultur

In sorgfältigen elektronenmikroskopischen Analysen von Ultradünnschnittpräparaten durch adhärent gewachsene Kulturen von mesenchymalen Stammzellen aus menschlichem Knochenmark wie aus Nabelschnurblut (siehe "Ergebnisse") war bald klar geworden, dass es zwei morphologisch - sowohl in ihrer Größe als auch ihrer Gestalt - sehr unterschiedliche Zell-Zell-Verbindungen gibt: Einmal waren relativ kleine, meist isodiametrisch erscheinende (Durchmesser: 30-200 nm) *Puncta adhaerentia* festzustellen, die in variabler, z.T. großer Häufigkeit sowohl am eigentlichen ("Perikaryon"-) Zellkörper als auch auf verschiedenen langen, z.T. verblüffend riesigen Tentakel-artigen Zellfortsätzen (*Processus adhaerentes*) gebildet wurden und diese Stellen mit entsprechenden Oberflächen-Arealen von anderen Zellen verbanden, bildlich gesprochen also etwa wie die Saugnäpfe von Tentakeln. Eine andere Zell-Zell-Verbindungsform bestand aus sehr verschieden langen Verzahnungen, in

denen jeweils ein recht dünner Zellfortsatz (*Processus*) tief und eng in eine entsprechende Invagination einer anderen (Rezeptor-)Zelle hineinragt (*Processus penitus*), so dass eine direkte Kontaktzone zwischen diesem zylindrischen Cytoplasma-Fortsatz und dem eingezogenen Plasmamembran-Areal der Rezeptor-Zelle entsteht, die auf beiden Seiten - also in beiden Zellen - mit einem meist dünnen, elektronenoptisch dicht erscheinenden Plaque-Besatz als AJ-Äquivalent zu erkennen und wegen dieser Struktur und ihrer offenkundigen Verbindungsfunktion *Manubrium adhaerens* ("adherens interlock") bezeichnet worden ist. Dabei kann die Länge dieser so engen wie tiefen *Manubria*-Verbindungen sehr variieren, sehr lange (10-40 μm) *Manubria adhaerentia* sind nicht selten. Auch ihre laterale Anordnungsdichte variiert; regelmäßig, manchmal batterie-artig periodisch angeordnete *Manubria* fallen häufig auf, wobei ihr seitlicher Abstand bis auf etwa 5 μm abnehmen kann. So können Nachbarzellen an manchen Stellen mit vielen (10-30) Manubrien sowohl eng als auch tief miteinander verbunden sein. Auch wurden gelegentlich Strukturen mit lokalen "Plaque-Unterbrechungen" angetroffen, so dass derzeit nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese Manubrien gewissermaßen als laterale Fusionen vieler *Puncta* entstehen. Es ist klar, dass sowohl die Dynamik der Entstehung all dieser Strukturen (*Processus* und *Recessus adhaerentes*, *Manubria* und *Puncta adhaerentia*) als auch eventuellen Bewegungsphänomene nun in weiterführenden, auch kinematographischen Experimenten untersucht werden muss. Dass mit zunehmender Zelldichte die "freien" *Processus adhaerentes* kürzer werden (vgl. z.B. **Abb. 38**), mag trivial erscheinen, aber auch dafür kann zur Zeit kein Mechanismus vorgeschlagen werden.

Während die z.T. recht kleinen *Puncta adhaerentia* morphologisch - und teilweise auch in ihrer molekularen Zusammensetzung - den von anderen Zelltypen bekannten Zell-Zell-Verbindungen dieses Typs entsprechen (vgl. z.B. für Epithelien: Geiger et al., 1983, 1985; Drenckhahn und Franz, 1986; Green et al., 1987; O'Keefe et al., 1987; Kaiser et al., 1993; Yonemura et al., 1995; Haftek et al., 1996; Lewis et al., 1997; Adams et al., 1998; Vasioukhin et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2003; für Fibroblasten und andere mesenchymal abgeleitete Zellen und Gewebe: Van Hoorde et al., 1999; Ko et al., 2000; El Sayegh et al., 2004; Hinz et al., 2004), müssen sowohl die tentakelartigen bis zu fast 500 μm langen *Processus adhaerentes*, die mehrere Zellen, oft über große Strecken, miteinander verbinden können, und erst recht die - ebenfalls oft durch ihre Länge und enge Verzahnung imponierenden - *Manubria adhaerentia* als neuartige Strukturen der Zellbiologie angesehen werden, die deshalb am Ende dieses Abschnitts ausführlich bewertet werden sollen (s. 5.3.1.3).

Die in diesen Zellen nachgewiesenen - und dabei in beiden Formen von AJ lokalisierten - Zell-Zell-Verbindungsproteine sind in der **Tabelle 13** zusammengefasst.

Tab. 13. Proteine, die immunfluoreszenz-mikroskopisch und biochemisch in den *Puncta adhaerentia* bzw. *Manubria adhaerentia* in Kulturen von mesenchymalen Stammzellen (MSC) des Menschen nachgewiesen werden konnten (vgl. auch Tab. 9 und 11).

Transmembran-Proteine	Plaque-Proteine
N-Cadherin	α -Catenin
Cadherin-11	β -Catenin
(T-Cadherin)*	Protein p120 ^{ctn}
	(Plakoglobin)*
	(Protein ZO-1)*
	Afadin
	Vinculin

*Nur biochemisch und in weit substöchiometrischen Anteilen ("Spuren") nachgewiesen, ohne Signifikanz-Anspruch.

5.3.1.1 Zur Cadherin-Ausstattung der *Puncta* und *Manubria adhaerentia* mesenchymaler Stammzellen in Kultur

Dass sowohl N-Cadherin als auch Cadherin-11 in den Zell-Zell-Verbindungsstrukturen der beschriebenen Kulturen menschlicher Knochenmarks- bzw. Nabelschnurzellen vorkommen - und das anscheinend auch in vergleichbaren Anteilen - ist einerseits neu, andererseits nicht unerwartet (zu N-Cadherin siehe Takeichi et al., 1986; Volk und Geiger, 1986a, b; Hirano et al., 1987; Takeichi, 1988, 1990, 1991, 1995, etwa auch Geiger et al., 1990; Knudsen et al., 1995; Matsuyoshi und Imamura, 1997; Ko et al., 2000; Mary et al., 2002; vgl. auch Shin et al., 2000; Orlandini und Oliviero, 2001), vor allem angesichts vor kurzem erschienener Arbeiten (De Wever et al., 2004; Hinz et al., 2004) über Zellkulturen von Fibroblasten und verwandten Zelltypen, die gegen Ende der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation erschienen (zum generellen Vorkommen von Cadherin-11 in mesenchymalen Zellen bzw. davon gebildeten Geweben siehe ferner Okazaki et al., 1994; Hoffmann und Balling, 1995; Kimura et al., 1995; Simmoneau et al., 1995; Simonneau und Thiery, 1998; Kashima et al., 1999, 2003; Kitajima et al., 1999; Schulz, 1999;

Manabe et al., 2000; Kawaguchi et al., 2001a, b; zum Vorkommen von Cadherin-11 in bestimmten Epithel- und Carcinom-Zellen sowie im Myokard auch MacCalman et al., 1996; Shibata et al., 1996). Auch hier deutet die weitgehende dominierende Kollokalisierung in der Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie darauf hin, dass beide Cadherine räumlich eng beieinander liegen, wenn auch bisher keine Überkreuz-Immunkopräzipitate erhalten worden sind (siehe "Ergebnisse"). Dass in anderen aus Knochenmark erhaltenen Zelltypen wie etwa in Kulturen normaler und maligne transformierter hämatopoietischer Zellen bisher nur N-Cadherin als Junction-Komponente beschrieben worden ist (vgl. z.B. Tsutsui et al., 1996; Puch et al., 2001; El Sayegh et al., 2004), mag nicht viel bedeuten, wenn von den betreffenden Autoren keine entsprechenden weiteren Kandidaten - wie etwa Cadherin-11, P- und T-Cadherin (vgl. auch Hinz und Gabbiani, 2003; Hinz et al., 2004) - geprüft worden sind. Die in den MSC-Kulturen vorkommenden α -Glattmuskel-Actin-haltigen Zellen (siehe "Ergebnisse", z.B. **Abb. 35**) unterschieden sich in unseren Experimenten nicht signifikant von denen ohne dieses Actin, wie wir auch sonst keine klaren Hinweise auf Unterschiede in Molekülmuster und Morphologie der AJ von Wachstumszustand fanden (siehe aber die für Fibroblasten bzw. Myofibroblasten beschriebenen Unterschiede: Hinz et al., 2004).

Ob auch in solchen "mesenchymalen" - und davon abgeleiteten - Zelltypen N-Cadherin auf andere Zellen bzw. Zelltypen eine Bildung von Zellfortsätzen und gewebeartigen Zellzusammenhängen fördert, wie für Neuriten berichtet wurde (zu Übersichtsartikeln und Literaturangaben siehe vorstehenden Abschnitt 5.2.1.2; ferner Neugebauer et al., 1988; Doherty und Walsh, 1991; Colman, 1997; Redies, 2000), muss noch in gezielten Experimenten geprüft werden. Die besondere funktionelle Bedeutung dieser beiden Cadherine ist grundsätzlich für N-Cadherin offenkundig, besonders durch Antikörper-Hemmversuche der Zell-Wechselwirkung und auch diverse Experimente zur generellen oder zelltyp-spezifischen Ausschaltung oder zur zelltyp-selektiven Anschaltung des Gens für N-Cadherin (Frenzel und Johnson, 1996; Radice et al., 1997; Gerhardt et al., 2000b; Luo et al., 2001; Kostetskii et al., 2005; Luo und Radice, 2005; vgl. auch Packer et al., 1997; zu weiteren mesenchym-spezifischen N-Cadherin-Wirkungen siehe u.a. auch Widelitz et al., 1993; Oberlender und Tuan, 1994a, b; Tavella et al., 1994; Goomer et al., 1998; Haas und Tuan, 1999; Yajima et al., 1999; DeLise und Tuan, 2002; Tuli et al., 2003; Blindt et al., 2004). Andererseits haben Versuche zur Ausschaltung des Gens für Cadherin-11 bisher nur relativ geringe bzw. sehr spezifische, z.T. marginal erscheinende Wirkungen aufgezeigt (Kawaguchi et al., 2001a, b; zu Entwicklungsstörungen bei der Somitenbildung in Mäusen mit N-Cadherin- und Cadherin-11-Defizienzen siehe Horikawa et al., 1999). So erscheint die jüngste

Vermutung von Luo et al. (2005), dass sich Cadherin-11 und N-Cadherin teilweise in bestimmten Funktionen komplementär verhalten und sich so gegenseitig ersetzen können und dass andererseits aber für bestimmte wichtige Funktionen beide Genprodukte - N-Cadherin und Cadherin-11 - erforderlich sind, zunächst durchaus plausibel.

4.1.11.1 Die Plaques der MSC-Zellverbindungen und die dort verankerten Cytoskelettelemente

Wie in **Tabelle 13** dargestellt, ist die molekulare Zusammensetzung der AJ-Plaques dieser Zellen- jedenfalls soweit in Zellkulturen bestimmter - besonders schlicht: Im wesentlichen findet man hier α - und β -Catenin in Verbindung mit Protein p120^{ctn}, dazu Afadin und weitere Actinfilament-Verankerungsproteine. Die manchmal in Spuren festgestellten Proteine Plakoglobin und ZO-1 sind wohl keine konstitutiven Bestandteile dieser Strukturen. Insofern ist die Zusammensetzung dieser AJ die einfachste bisher festgestellte, vergleichbar am ehesten noch den kürzlich von Hinz et al. (2004) bei Ratten-Fibroblasten bzw. -Myofibroblasten, z.T. experimentell modifizierten Strukturen (diese Autoren geben außer α - und β -Catenin in einer Abbildung - dort Abb. 6F - für experimentell veränderte Zellen auch Protein p120^{ctn} an). Die in dieser Arbeit vorgestellten Teil-Ko-Immunpräzipitationen deuten grundsätzlich auf das Vorliegen von Plaque-Komplexen hin, erlauben aber noch keine Schlüsse auf die wirklichen molekularen Wechselwirkungen oder Anordnungen in den jeweiligen *Puncta*- bzw. *Manubria*-Strukturen, noch erlauben sie Aussagen zur Bildungsweise und Abhängigkeit dieser Strukturen. Hierzu sind weitere hochauflösende Lokalisierungs- bzw. Quervernetzungs-("Chemical Crosslinking")-Experimente erforderlich. Auch muss nun geprüft werden, ob diese MSC-AJ mit den in embryonalen oder "adulten" MSC *in situ* vorkommenden (z.B. im Knochenmark) Strukturen oder mit entsprechenden *Puncta* pathologisch veränderter, mesenchym-abgeleiteter Zellen identisch sind.

Beide Arten von AJ, die in dieser Arbeit vorgestellt werden, haben nicht nur mehrere gemeinsame Hauptkomponenten, sondern beide gehören auch zum Cytoskelett-System von Mikrofilament-Bündeln, die vor allem aus Actin und Myosin, aber außerdem sowohl mit Vinculin - an den AJ wie an den Plaques der sog. "Focal Adhesions" der Plasmamembran der Zellunterseite (siehe z.B. **Abb. 33**) verankert sind, wobei in beiden Verankerungsstrukturen außerdem α -Actinin vorkommt (zum allgemeinen Vorkommen von α -Actinin und Vinculin in AJ siehe u.a. auch Knudsen et al., 1995; Hazan et al., 1997; Weiss et al., 1998; Otey und

Carpen, 2004; zu Vinculin-Gen-Defizienz-Phänomenen siehe Xu et al., 1998), das aber generell in den MSC - auch in den *Processus* - in den in fast regelmäßigen Abständen angeordneten "Dense Bodies" angereichert ist (z.B. **Abb. 33**). Außerdem sind die MSC-Fortsätze ungewöhnlich reich an Ezrin, einem Actin-bindenden Protein, das in verschiedenen Zelltypen, oft auch zusammen mit anderen Proteinen der sog. "ERM-Familie", an der Interaktion der Actin-Mikrofilamente mit der Plasmamembran beteiligt ist (zu Anordnungen und Funktionen von Ezrin siehe z.B. Saotome et al., 2004; Tamura et al., 2005; Übersichten bei Vaheri et al., 1997; Bretscher et al., 2000, 2002; Tsukita et al., 1997).

5.3.1.3 Die *Processus-adhaerens*-Strukturen als neue zellbiologische Entitäten

Im Folgenden soll geprüft werden, ob die beiden Arten von z.T. sehr langen Zellfortsätzen (*Processus adhaerentes* als "freie", interzelluläre Brücken oder als *Manubria adhaerentia*) mit anderen bei Säugetierzellen beschriebenen Zellfortsätzen im Grunde identisch oder vergleichbar sind oder ob sie eine Art neuer Zellstrukturen darstellen.

Mit AJ versehene Zellfortsätze verschiedener Länge sind bisher vor allem in Form der Neuriten* von Nervenzellen bekannt; nur von Neuriten waren bisher Längen von mehreren Hundert Mikrometer bekannt. Wie die freien *Processus adhaerentes* stellen auch diese im Grunde Plasmamembran-Ausläufer mit einem Inhalt dar, der im wesentlichen dem Cytoplasma des Perikaryon-Zellkörpers entspricht (Redies, 2000), wobei Neuriten in der Regel sehr lange und relativ dicht gepackte Mikrotubuli ("Neurotubuli") und IF-(Neurofilament)-Bündel von besonderen zelltyp-spezifischen molekularen Isoformen stabilisiert sind (Übersichten und Literatur bei Jones und Cowan, 1977; Zenker, 1994; Redies, 2000; Otero et al., 2004; Takeichi und Abe, 2005; Ye und Jan, 2005; zu Transportproblemen siehe u.a. auch He et al., 2005). Auch Mikrofilament-Bündel gehören zur Ausstattung der Neurite. Ferner sind für Dendrite bzw. Axone Bildungen bestimmter Strukturen wie vor allem der "Dornen" ("Spines") und Synapsen typisch. Die *Processus adhaerentes* der MSC weisen die letztgenannten Spezifika neuronaler Funktionen natürlich nicht auf, auch fehlen ihnen neuronale Proteine und Isoformen und ihre Ausstattung mit Mikrotubuli und IF - hier des Vimentin - erscheint meist deutlich spärlicher und weniger regelmäßig angeordnet. Auf der

* Der Terminus "Neurit" wird in der deutschen und englischsprachigen Fachliteratur nicht immer einheitlich bzw. gleichbedeutend benutzt. In dieser Arbeit soll er in seiner weitesten Bedeutung (Dye, 2002) für alle Grundcytoplasma-enthaltenden Zellfortsätze von Neuronalzellen verwandt werden, d.h. sowohl für Dendriten als auch für Axone.

anderen Seite sind die *Processus* durchweg durch eine große Dichte von Mikrofilamenten - z.T. sogar in lokaler parakristalliner Packungsordnung - ausgezeichnete, auffällig dicht besetzt mit den Actin-Membran-vernetzenden Cytoskelett-Proteinen Ezrin und α -Actinin, letzteres sogar mit "Dense Body"-artigen Aggregaten. Insofern erinnern die *Processus* eher an Filopodien anderer Kulturzellen, wobei diese in der Regel jedoch weder die Länge noch die Cytoskelett-Ordnung und die Stabilität der *Processus* erreichen und auch keine AJ bilden.

Die *Processus adhaerentes* der MSC unterschieden sich deutlich und in mehreren Eigenschaften von den recht regelmäßigen Anordnungen von Filopodien-artigen Fortsätzen, die Vasioukhin et al. (2000) bei verschiedenen Epithelzellkulturen, besonders ausgeprägt bei Keratinocyten, unmittelbar (≤ 3 Stunden) nach Wiederherstellung normaler Kalzium-Verhältnisse bei in erniedrigter Kalzium-Konzentration gewachsenen Zellen, beschrieben haben.

(1) Während die in dieser Arbeit vorgestellten *Processus adhaerentes* in mesenchymalen Stammzellkulturen - und wohl auch ähnliche Zellfortsätze der primären embryonalen Mesenchymzellen (vgl. Franke et al. 1983; Hashimoto und Nakatsuji, 1989) - äußerst unterschiedliche, z.T. sehr große Längen - bis über 400 μm - aufweisen, sind die von Vasioukhin et al. (2000) beschriebenen Fortsätze kurz (bis etwa 7 μm lang) und außerdem allesamt in einem relativ engen Längenbereich, so dass von Anfang an auffallend gleichmäßige seriale Strukturen entstehen, von den Autoren "Adhesion Zippers" genannt, die sich durch zwei Reihen von terminalen E-Cadherin *Puncta adhaerentia* auszeichnen, die jeweils an der Spitze eines Filopodiums gebildet werden ("double rows of *puncta*"; am klarsten wohl auf dem Titelbild der Ausgabe vom 21. Januar 2000 des betreffenden Heftes der Zeitschrift "Cell" dargestellt).

(2) Außerdem sind diese relativ "kurzen" Filopodien der Epithelzellkulturen alle von ähnlichem - relativ niedrigem - Durchmesser (<300 nm) und ähneln Microvilli nicht nur in Größe und Breite, sondern auch insofern, als ihr Inneres fast ausschließlich aus einem Bündel von Actin-Mikrofilamenten besteht ("Each filopodium was packed with cytoskeleton that was largely if not solely composed of actin filaments"; Vasioukhin et al., 2000), während die MSC-*Processus* sich nicht nur in der Länge, sondern auch in ihrem Durchmesser sehr unterschieden und außer Mikrofilament-Bündeln oft auch andere Zellstrukturen - z.B. auch Mikrotubuli - enthalten (siehe z.B. **Abb. 36**), hierin Neuriten vergleichbar (jüngere Literatur bei He et al., 2005).

(3) Die MSC-*Processus* weisen nicht nur jeweils eine E-Cadherin-haltige *Punctum adhaerens*-Kontaktstruktur an der Spitze auf, sondern meist sehr viele - auch mit

insgesamt mehreren Zellen -, und oft auch verstreut, grundsätzlich also anders als die von Vasioukhin et al. (2000) vorgestellten "Double-Row-Zippers".

(4) Während die besagten "Zipper"-Strukturen oft eng aneinander liegende antiparallele, lateral adhärierende Filopodien-Paare bildeten, kommen bei den MSC-*Processus* derartige Paarbildungen praktisch nicht vor.

Zusammenfassend muss also festgestellt werden, dass die regelmäßigen, serialen "Adhesion Zipper"-Strukturen sich in Größe wie in Inhalt und Anordnung vielfach von den *Processus adhaerentes* der MSC-Kulturen unterscheiden (siehe aber auch den nachstehenden Abschnitt zu Manubrien-Bildungen).

Bedeutende Unterschiede lassen sich auch - neben einigen Gemeinsamkeiten - zwischen den hier vorgestellten *Processus adhaerentes* der MSC-Kulturen einerseits und den Zellfortsätzen feststellen, die Yonemura et al. (1995) bei verschiedenen mesenchymal abgeleiteten Zellkultur-Linien als P-Cadherin-, α - und β -Catenin- sowie Protein ZO-1- und Vinculin-haltige *Puncta adhaerentia* beschrieben haben, darunter die aus Rattenniere stammende Fibroblasten-Linie NRK-49F, die aus Affenniere stammenden CV-1-Zellen und auch NIH-3T3-Zellen (Klon 5611) aus Mausembryonen. Die *Puncta* stellten ausnahmslos brückenartige Kontaktstellen relativ kurzer (2-7 μm) und dünner Ausläufer dar, welche jeweils Nachbarzellen verbinden und Actin-Mikrofilament-Bündel enthalten. Solche Strukturen stellen gewissermaßen eine - und nur eine - der vielen Unterformen der MSC-Fortsätze dar.

Seltsam anmutende, aber andererseits wegen der gewaltigen Flächenhaftungswerte, die sie erreichen können, sehr bemerkenswerte Strukturen sind die hier als *Manubria adhaerentia* bezeichneten Verzahnungen, in denen jeweils ein *Processus* - fast stets der dünnen Art, d.h. mit Durchmessern unter 500 nm, aber unterschiedlicher, oft sehr großer Länge (10-50 μm) - in eine entsprechende Invagination der Rezeptor-Nachbarzelle tief und eng - pfahlwurzelartig - hineinragt s. **Abb. 37**). Dabei erscheinen beide Plasmamembranen eng - Junction-artig - oft ohne größere Unterbrechungen - aneinander "geklebt", so dass eine sehr große schlank-zylindrische Junction-Struktur entsteht - mit Mantelflächen an die 50 μm^2 pro *Manubrium* heran. Da eine Zelle von ihrer Nachbarzelle oft aber 10-20 solcher *Processus* in Manubrien aufnimmt, erreicht die gesamte Zell-Zell-Haftungsfläche in solchen Zell-Zell-Interaktionen Werte im Bereich von 500-1000 μm^2 .

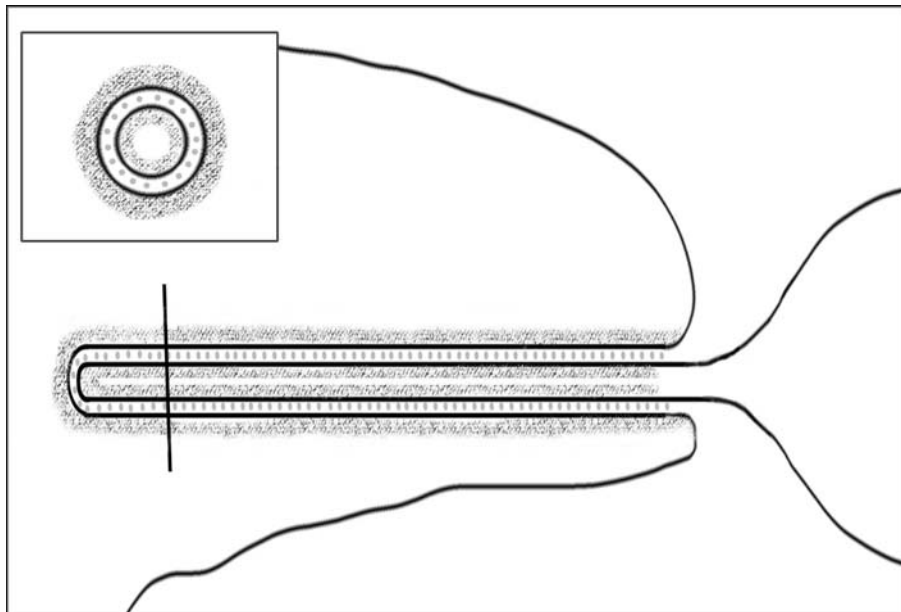


Abb. 42. Skizzenartige Darstellung eines *Manubrium adhaerens*, in dem jeweils ein *Processus adhaerens* (hier als Ausläufer der rechten Zelle) tief und eng passend in eine Invagination der "Empfängerzelle" (links) hineinragt, wobei der größte Teil der (manchmal anscheinend die ganze) Plasmamembran jeder der beiden Zellen von einem Plaque bedeckt ist und so das gesamte *Manubrium* mehr oder weniger ein einziges einheitliches Junction ist.

Dass Zellausläufer tief und eng in eine Nachbarzelle eindringen können, war auch Vasioukhin et al. (2000) bei ihren Untersuchungen zur Bildung der "Zipper"-Strukturen zwischen Epithelzellen aufgefallen. Sie beobachteten, dass manche der Filopodien in Invaginationen der Nachbarzelle hineinragten und dass an diesen Kontaktstellen Adhärenz-Verbindungen zu erkennen waren ("Intriguingly, filopodia making contact with neighboring cells appeared to physically embed into the neighboring cell membrane..."; "... filopodial membrane pockets"; Vasioukhin et al., 2000).

5.4 Schlussbemerkungen

Im Rahmen dieser Arbeit sind zwei im Grund neue Arten von Zell-Zell-Verbindungen (Junctions) in nicht-epithelialen Zellkulturen erkannt und strukturell wie in ihrer molekularbiologischen Zusammensetzung charakterisiert worden: Die sehr komplexe und variable *Colligatio permixta* von Astrocytomzellen und das *Punctum adhaerens* von mesenchymalen Stammzellen (siehe auch **Tabelle 14**). Im Fall der letzterwähnten Zellen fielen dabei noch besondere Strukturen auf, die z.T. riesigen, tentakel-artigen *Processus adhaerentes*, die als z.T. sehr lange Brückenstrukturen zwei und mehrere Zellen miteinander durch Junctions vom *Puncta*-Typ verbinden und die *Manubria adhaerentia*, in denen solche *Processus* tief und eng-passend in Invaginationen einer Nachbarzellen festgehalten werden, meist unter Ausbildung sehr großer Junction-Strukturen über fast das ganze *Manubrium* hin. Es ist klar, dass nun die Bildungsweisen und die biologischen Bedeutungen all dieser Junction-Strukturen aufgeklärt werden müssen, auch die Folgen der in den Astrocytom-Zellen beobachteten sich immer wieder herausbildenden in Kolonien auftretenden Heterogenitäten, vor allem in der Erscheinung von Zellen bzw. Zelloberflächen-Regionen mit VE-Cadherin. Andererseits muss die analytische Bestandsaufnahme der molekularen Zusammensetzung dieser Strukturen noch abgeschlossen werden, so etwa die Fragen nach dem möglichen Vorkommen von Plaque-assoziierten Proteinen wie VASP, ENA, Mena, Zyxin, p0071 und Cortactin oder die nach R- und P-Cadherin bzw. PECAM und dem Protocadherin 12 (VE-Cadherin 2; vgl. z.B. Telo et al., 1998; Vasioukhin et al., 2000; Vasioukhin und Fuchs, 2001; Krause et al., 2003; El Sayegh et al., 2004; Hinz et al., 2004; Biswas et al., 2005; Rampon et al., 2005; eine aktualisierte Liste der Actin-bindenden Proteine findet sich bei Winder und Ayscough, 2005).

Auch ist die Frage unausweichlich, ob - und eventuell in welchen Modifikationen - diese Strukturen und Moleküle auch *in situ* vorkommen und an welchen Funktionen sie beteiligt sind. Auch wird - allgemein, aber besonders bei den VE-Cadherin-bildenden Astrocytomzellen - die Frage nach den molekularen Mechanismen und der adhesiven Festigkeit trans-heterotypischer Junctions zu prüfen sein, nicht zuletzt auch wegen ihrer großen biologischen und onkologischen Bedeutung (vgl. hierzu Volk et al., 1987; Wheelock und Johnson, 2003, und dort diskutierte Literatur).

Tab. 14. Die in dieser Arbeit entdeckten bzw. definierten Zell-Zell-Verbindungstypen der Adhaerens-Kategorie (unten, Fettdruck) im Vergleich mit den bekannten Formen (vgl. Tab. 2)

Zelladhäsionstyp	Zelltyp und Gewebe	Transmembran-Proteine	Plaques-Proteine (bisher nachgewiesen)
Desmosom (DES) <i>Macula adhaerens</i>	Epithelien, Arachnoidea, dendritisches Reticulum	Desmosomale Cadherine: Desmocolline (Dsc 1-3) Desmogleine (Dsg 1-3)	Plakoglobin Desmoplakin I und II Plakophilin (1a, 1b, 2a, 2b, 3)
„Adherens Junction“ (AJ) <i>Zonula/Fascia/Punctum adhaerens</i>	Epithelien, Endothelien, mesenchymale Zelltypen	Klassische Cadherine (z.B. E-, N-, VE-, P- oder R-Cadherin) Nectin	Plakoglobin α -Catenin, β -Catenin Protein p120 ^{ctn} Protein ARVCF Protein p0071 Vinculin α -Actinin Afadin Ponsin
Complexus adhaerens	Lymphknoten-Sinus- Rethotel, Lymphgefäß-Endothel	VE-Cadherin	Plakoglobin α -Catenin, β -Catenin Protein p120 ^{ctn} Desmoplakin L-Afadin Protein ZO-1
Contactus adhaerens	Cerebellum (Neuriten der Körnerzellen)	M-Cadherin N-Cadherin	Plakoglobin α -Catenin, β -Catenin
Zona limitans externa	Retina	N-Cadherin	Neurojungin α -Catenin, β -Catenin Plakophilin 2 Vinculin α -Actinin Protein ZO-1
Cortex adhaerens	Augenlinse	Cadherin-11 N-Cadherin n.b.	α -Catenin, β -Catenin Plakoglobin Vinculin Protein p120 ^{ctn} Ezrin Periaxin Periplakin Desmoyokin
Area composita	Cardiomyocyten, Purkinje-Fasern	N-Cadherin Cadherin-11 Desmoglein 2 Desmocollin 2	Plakoglobin α -Catenin, β -Catenin Protein ARVCF Desmoplakin I Plakophilin 2 Vinculin
Colligatio permixta	Astrocytom- Zellkulturen Astrocytom-Gewebe	N-Cadherin Cadherin-11 (VE-Cadherin)	α-Catenin, β-Catenin Protein p120^{ctn} Protein ARVCF Plakoglobin Plakophilin 2 Protein ZO-1, Protein ZO-2 Cingulin Afadin Vinculin
Punctum adhaerens simplex	Zellkulturen von mesenchymalen Stammzellen, von (Myo-)Fibro- blasten	N-Cadherin Cadherin-11	α-Catenin, β-Catenin Protein p120^{ctn} Afadin Vinculin

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aberle, H., Butz, S., Stappert, J., Weissig, H., Kemler, R., Hoschuetzky, H. 1994. Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J. Cell Sci.* **107**, 3655-3663.
- Aberle, H., Schwartz, H., Kemler, R. 1996. Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J. Cell. Biochem.* **61**, 514-523.
- Achtstaetter, T., Hatzfeld, M., Quinlan, R.A., Parmelee, D.C., Franke, W.W. 1986a. Separation of cytokeratin polypeptides by gel electrophoretic and chromatographic techniques and their identification by immunoblotting. *Methods Enzymol.* **134**, 355-371.
- Achstätter, T., Moll, R., Anderson, A., Kuhn, C., Pitz, S., Schwechheimer, K., Franke, W.W. 1986b. Expression of glial filament protein (GFP) in nerve sheaths and non-neural cells re-examined using monoclonal antibodies, with special emphasis on the co-expression of GFP and cytokeratins in epithelial cells of human salivary gland and pleomorphic adenomas. *Differentiation* **31**, 206-227.
- Adams, C.L., Chen, Y.T., Smith, S.J., Nelson, W.J. 1998. Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein. *J. Cell Biol.* **142**, 1105-1119.
- Aghib, D.F., McCrea, P.D. 1995. The E-cadherin complex contains the src substrate p120. *Exp. Cell Res.* **218**, 359-369.
- Aho, S., Levansuo, L., Montonen, O., Kari, C., Rodeck, U., Uitto, J. 2002. Specific sequences in p120ctn determine subcellular distribution of its multiple isoforms involved in cellular adhesion of normal and malignant epithelial cells. *J. Cell Sci.* **115**, 1391-1402.
- Ahrens, T., Lambert, M., Pertz, O., Sasaki, T., Schulthess, T., Mège, R.-M., Timpl, R., Engel, J. 2003. Homoassociation of VE-cadherin follows a mechanism common to "classical" cadherins. *J. Mol. Biol.* **325**, 733-742.
- Ai, Z., Fischer, A., Spray, D.C., Brown, A.M.C., Fishman, G.I. 2000. Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. *J. Clin. Invest.* **105**, 161-171.
- Akat, K., Mennel, H.-D., Kremer, P., Gassler, N., Bleck, C.K.E., Kartenbeck, J. 2003. Molecular characterization of desmosomes in meningiomas and arachnoidal tissue. *Acta Neuropathol.* **106**, 337-347.
- Alexander, J.J., Bey, E.M., Geddes, E.W., Lecatsas, G. 1976. Establishment of a continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver. *S. Afr. Med. J.* **50**, 2124-2128.
- Alexander, J.S., Blaschuk, O.W., Haselton, F.R. 1993. An N-Cadherin-like protein contributes to solute barrier maintenance in cultured endothelium. *J. Cell. Physiol.* **156**, 610-618.
- Ali, J., Liao, F., Martens, E., Muller, W.A. 1997. Vascular endothelial cadherin (VE-cadherin): cloning and role in endothelial cell-cell adhesion. *Microcirculation* **4**, 267-277.
- Alison, M.R., Poulosom, R., Otto, W.R., Vig, P., Brittan, M., Direkze, N.C., Preston, S.L., Wright, N.A. 2003. Plastic adult stem cells: will they graduate from the school of hard knocks? *J. Cell Sci.* **116**, 599-603.
- Alvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J.M., Fike, J.R., Lee, H.O., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S.J., Alvarez-Buylla, A. 2003. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* **425**, 968-973.
- Anastasiadis, P.Z., Reynolds, A.B. 2000. The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J. Cell Sci.* **113**, 1319-1334.
- Anderson, J.M., Stevenson, B.R., Jesaitis, L.A., Goodenough, D.A., Mooseker, M.S. 1988. Characterization of ZO-1, a protein component of the tight junction from mouse liver and Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* **106**, 1141-1149.
- Angst, B.D., Marozzi, C., Magee, A.I. 2001. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J. Cell Sci.* **114**, 629-641.
- Aurrand-Lions, M., Duncan, L., Ballestrem, C., Imhof, B.A. 2001. JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 2733-2741.

- Bach, T.L., Barsigian, C., Chalupowicz, D.G., Busler, D., Yaen, C.H., Grant, D.S., Martinez, J. 1998. VE-cadherin mediates endothelial cell capillary tube formation in fibrin and collagen gels. *Exp. Cell Res.* **238**, 324-334.
- Bajhaoui-Bouhaddi, M., Padilla, F., Nicolet, M., Cifuentes-Diaz, C., Fellmann, D., Mege, R.M. 1997. Localized deposition of M-cadherin in the glomeruli of the granular layer during postnatal development of mouse cerebellum. *J. Comp. Neurol.* **38**, 180-195.
- Bär, T. 1983. Patterns of vascularization in the developing cerebral cortex. **In:** Development of the Vascular System (Ciba Found. Symp. 100). Pitman Books, London; pp. 20-36.
- Barry, F.P. 2003. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res. C Embryo Today* **69**, 250-256.
- Bauer, H., Stelzhammer, W., Fuchs, R., Weiger, T.M., Danninger, C., Probst, G., Krizbai, I.A. 1999. Astrocytes and neurons express the tight junction-specific protein occludin in vitro. *Exp. Cell Res.* **250**, 434-438.
- Bazzoni, G., Dejana, E. 2004. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol. Rev.* **84**, 869-901.
- Behrens, J. 1999. Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* **18**, 15-30.
- Behrens J., Nelson W.J. (Eds.) 2004. Cell Adhesion (*Handbook of Experimental Pharmacology* **165**) Springer, Berlin; 481 pp.
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., Birchmeier, W. 1996. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**, 638-642.
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., Sweet, W. 1968. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* **161**, 370-371.
- Bernfield, M., Kokenyesi, R., Kato, M., Hinkes, M.T., Spring, J., Gallo, R.L., Lose, E.J. 1992. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 365-393.
- Bianco, P., Boyde, A. 1993. Confocal images of marrow stromal (Weston-Bainton) cells. *Histochemistry* **100**, 93-99.
- Bierkamp, C., McLaughlin, K.J., Schwarz, H., Huber, O., Kemler, R. 1996. Embryonic heart and skin defects in mice lacking plakoglobin. *Dev. Biol.* **180**, 780-785.
- Bignami, A., Dahl, D. 1985. Glial filaments in brain differentiation and the transient expression of neurofilaments in Purkinje cell development. *Ann. NY Acad. Sci.* **455**, 561-574.
- Biswas, P., Zhang, J., Schoenfeld, J.D., Schoenfeld, D., Gratzinger, D., Canosa, S., Madri, J.A. 2005. Identification of the regions of PECAM-1 involved in β - and γ -catenin associations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**, 1225-1233.
- Bixby, J.L., Lilien, J., Reichardt, L.F. 1988. Identification of the major proteins that promote neuronal process outgrowth on Schwann cells in vitro. *J. Cell Biol.* **107**, 353-361.
- Blindt, R., Bosserhoff, A.-K., Dammers, J., Krott, N., Demircan, L., Hoffmann, R., Hanrath, P., Weber, C., Vogt, F. 2004. Downregulation of N-cadherin in the neointima stimulates migration of smooth muscle cells by RhoA deactivation. *Cardiovasc. Res.* **62**, 212-222.
- Bloom, W., Fawcett, D.W. 1975. A Textbook of Histology. 10. edn. W.B. Saunders Company, Philadelphia; 1033 pp.
- Boheler, K.R., Czyz, J., Tweedie, D., Yang, H.-T., Anisimov, S.V., Wobus, A.M. 2002. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ. Res.* **91**, 189-201.
- Bonilha, V.L., Finnemann, S.C., Rodriguez-Boulan, E. 1999. Ezrin promotes morphogenesis of apical microvilli and basal foldings in retinal pigment epithelium. *J. Cell Biol.* **147**, 1533-1548.
- Bonné, S., van Hengel, J., Nollet, F., Kools, P., van Roy, F. 1999. Plakophilin-3, a novel Armadillo-like protein present in nuclei and desmosomes of epithelial cells. *J. Cell Sci.* **112**, 2265-2276.

- Borrmann, C. 2002. Molekulare Charakterisierung der Adhärens-Zellverbindungen des Herzens: Identifizierung einer neuen Art, der Area composita. Dissertation. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Gesamtfakultät, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Borrmann, C.M., Mertens, C., Schmidt, A., Langbein, L., Kuhn, C., Franke, W.W. 2000. Molecular diversity of plaques of epithelial-adhering junctions. *Ann. NY Acad. Sci.* **915**, 144-150.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N.E. 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* **106**, 761-771.
- Brabletz T. 2004. In vivo functions of catenins. **In:** Cell Adhesion (Behrens, J., Nelson, W.J., eds.; *Handbook of Experimental Pharmacology* **165**) Springer-Verlag, Berlin; pp. 105-135.
- Brandner, J.M., Kief, S., Grund, C., Rendl, M., Houdek, P., Kuhn, C., Tschachler, E., Franke, W.W., Moll, I. 2002. Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur. J. Cell Biol.* **81**, 253-263.
- Bretscher, A., Chambers, D., Nguyen, R., Reczek, D. 2000. ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 113-143.
- Bretscher, A., Edwards, K., Fehon, R.G. 2002. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 586-599.
- Breviario, F., Caveda, L., Corada, M., Martin-Padura, I., Navarro, P., Golay, J., Introna, M., Gulino, D., Lampugnani, M.G., Dejana, E. 1995. Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 1229-1239.
- Brillault, J., Berezowski, V., Cecchelli, R., Dehouck, M.-P. 2002. Intercommunications between brain capillary endothelial cells and glial cells increase the transcellular permeability of the blood-brain barrier during ischaemia. *J. Neurochem.* **83**, 807-817.
- Brüstle, O., Jones, K.N., Learish, R.D., Karram, K., Choudhary, K., Wiestler, O.D., Duncan, I.D., McKay, R.D.G. 1999. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* **285**, 754-756.
- Bulla, R., Villa, A., Bossi, F., Cassetti, A., Radillo, O., Spessotto, P., De Seta, F., Guaschino, S., Tedesco, F. 2005. VE-cadherin is a critical molecule for trophoblast-endothelial cell interaction in decidual spiral arteries. *Exp. Cell Res.* **303**, 101-113.
- Burger, M.J., Tebay, M.A., Keith, P.A., Samaratunga, H.M., Clements, J., Lavin, M.F., Gardiner, R.A. 2002. Expression analysis of delta-catenin and prostate-specific membrane antigen: their potential as diagnostic markers for prostate cancer. *Int. J. Cancer* **100**, 228-237.
- Burudi, E.M., Riese, S., Stahl, P.D., Regnier-Vigouroux, A. 1999. Identification and functional characterization of the mannose receptor in astrocytes. *Glia* **25**, 44-55.
- Buxton, R.S., Cowin, P., Franke, W.W., Garrod, D.R., Green, K.J., King, I.A., Koch, P.J., Magee, A.I., Rees, D.A., Stanley, J.R., Steinberg, M.S. 1993. Nomenclature of the desmosomal cadherins. *J. Cell Biol.* **121**, 481-483.
- Cairncross, J.G., Macdonald, D.R. 1988. Successful chemotherapy for recurrent malignant oligodendroglioma. *Ann. Neurol.* **23**, 360-364.
- *Calkins, C.C., Hoepner, B.L., Law, C.M., Novak, M.R., Setzer, S.V., Hatzfeld, M., Kowalczyk, A.P. 2003. The Armadillo family protein p0071 is a VE-cadherin- and desmoplaking-binding protein. *J. Biol. Chem.* **278**, 1774-1783.
- Caplan, A.I., Bruder, S.P. 2001. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol. Med.* **7**, 259-264.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoecck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., Nagy, A. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**, 435-439.
- Carmeliet, P., Lampugnani, M.G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oostuyse, B., Dewerchin, M., Zanetti, A., Angellilo, A., Mattot, V., Nuyens, D., Lutgens, E., Clotman, F., de Ruiter, M.C., Gittenberger-de Groot, A., Poelmann, R., Lupu, F., Herbert, J.-M., Collen, D., Dejana, E. 1999. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* **98**, 147-157.

- Cecchelli, R., Dehouck, B., Descamps, L., Fenart, L., Buée-Scherrer, V., Duhem, C., Lundquist, S., Rentfel, M., Torpier, G., Dehouck, M.P. 1999. In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **36**, 165-178.
- Chedrawy, E.G., Wang, J.-S., Nguyen, D.M., Shum-Tim, D., Chiu, R.C.J. 2002. Incorporation and integration of implanted myogenic and stem cells into native myocardial fibers: Anatomic basis for functional improvements. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **124**, 584-590.
- Chen, X., Bonne, S., Hatzfeld, M., van Roy, F., Green, K.J. 2002. Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta-catenin signaling. *J. Biol. Chem.* **277**, 10512-10522.
- Cheng, S.L., Lecanda, F., Davidson, M.K., Warlow, P.M., Zhang, S.F., Zhang, L., Suzuki, S., St. John, T., Civitelli, R. 1998. Human osteoblasts express a repertoire of cadherins, which are critical for BMP-2-induced osteogenic differentiation. *J. Bone Miner. Res.* **13**, 633-644.
- Cheng, X., Koch, P.J. 2004. In vivo function of desmosomes. *J. Dermatol.* **31**, 171-187.
- Citi, S., Sabanay, H., Jakes, R., Geiger, B., Kendrick-Jones, J. 1988. Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. *Nature* **333**, 272-276.
- Collins, J.E., Legan, P.K., Kenny, T.P., MacGarvie, J., Holton, J.L., Garrod, D.R. 1991. Cloning and sequence analysis of desmosomal glycoproteins 2 and 3 (desmocollins): cadherin-like desmosomal adhesion molecules with heterogeneous cytoplasmic domains. *J. Cell. Biol.* **113**, 381-391.
- Colman, D.F. 1997. Neurites, synapses, and cadherins reconciled. *Mol. Cell. Neurosci.* **10**, 1-6.
- Conget, P.A., Minguell, J.J. 1999. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell. Physiol.* **181**, 67-73.
- Cordenosi, M., D'Atri, F., Hammar, E., Parry, D.A.D., Kendrick-Jones, J., Shore, D., Citi, S. 1999. Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J. Cell Biol.* **147**, 1569-1581.
- Coulombe, P.A., Ma, L., Yamada, S., Wawersik, M. 2001. Intermediate filaments at a glance. *J. Cell Sci.* **114**, 4345-4347.
- Cowin, P., Matthey, D., Garrod, D. 1984. Identification of desmosomal surface components (desmocollins) and inhibition of desmosome formation by specific Fab'. *J. Cell Sci.* **70**, 41-60.
- Cowin, P., Franke, W.W., Grund, C., Kapprell, H.-P., Kartenbeck, J. 1985a. The desmosome-intermediate filament complex. **In:** *The Cell in Contact* (G.M. Edelman, J.-P. Thiery, eds.) John Wiley & Sons, New York; pp. 427-460.
- Cowin, P., Kapprell, H.-P., Franke, W.W. 1985b. The complement of desmosomal plaque proteins in different cell types. *J. Cell Biol.* **101**, 1442-1454.
- Cowin, P., Kapprell, H.P., Franke, W.W., Tamkun, J., Hynes, R.O. 1986. Plakoglobin: a protein common to different kinds of intercellular adhering junctions. *Cell* **46**, 1063-1073.
- Dahl, D. 1981. The vimentin-GFA protein transition in rat neuroglia cytoskeleton occurs at the time of myelination. *J. Neurosci. Res.* **6**, 741-748.
- Dahl, D., Rueger, D.C., Bignami, A., Weber, K., Osborn, M. 1981. Vimentin, the 57,000 dalton protein of fibroblast filaments, is the major cytoskeletal component in immature glia. *Eur. J. Cell Biol.* **24**, 191-196.
- Damjanov, I., Linder, J. (Eds.) 1996. *Anderson's Pathology*, Vol. 1 & 2; 10. edn. Mosby, St. Louis; 2905 pp.
- Daniel, J.M., Reynolds, A.B. 1995. The tyrosine kinase substrate p120cas binds directly to E-cadherin but not to the adenomatous polyposis coli protein or alpha-catenin. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4819-4824.
- D'Atri, F., Nadalutti, F., Citi, S. 2002. Evidence for a functional interaction between cingulin and ZO-1 in cultured cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 27757-27764.
- Davis L.E. 1973. Differentiation of nervous elements in Hydra. **In:** *Biology of Hydra* (Burnett, A.L, ed.) Academic Press, New York; pp. 271-342
- de Ridder, L.I., Laerum, O.D., Mork, S.J., Bigner, D.D. 1987. Invasiveness of human glioma cell lines in vitro: relation to tumorigenicity in athymic mice. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **72**, 207-213.

- De Wever, O., Westbroek, W., Verloes, A., Bloemen, N., Bracke, M., Gespach, C., Bruyneel, E., Mareel, M. 2004. Critical role of N-cadherin in myofibroblast invasion and migration in vitro stimulated by colon-cancer-cell-derived TGF- β or wounding. *J. Cell Sci.* **117**, 3691-4703.
- Dejana, E. 1996. Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* **98**, 1949-1953.
- Dejana, E. 2004. Endothelial cell-cell junctions: Happy together. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 261-270.
- Dejana, E., Bazzoni, G., Lampugnani, M.G. 1999. Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Exp. Cell Res.* **252**, 13-19.
- DeLise, A.M., Tuan, R.S. 2002. Alterations in the spatiotemporal expression pattern and function of N-cadherin inhibit cellular condensation and chondrogenesis of limb mesenchymal cells in vitro. *J. Cell. Biochem.* **87**, 342-359.
- Demlehner, M.P., Schäfer, S., Grund, C., Franke, W.W. 1995. Continual assembly of half-desmosomal structures in the absence of cell contacts and their frustrated endocytosis: a coordinated Sisyphus cycle. *J. Cell Biol.* **131**, 745-760.
- Dermietzel, R. 1974. Junctions in the central nervous system of the cat. I. Membrane fusion in central myelin. *Cell Tissue Res.* **148**, 565-576.
- Dickersin, G.R. 2000. Diagnostic Electron Microscopy. A Text/Atlas. 2. edn. Springer-Verlag, New York; 1005 pp.
- Ding, S., Merkulova-Rainon, T., Han, Z.C., Tobelem, G. 2003. HGF receptor up-regulation contributes to the angiogenic phenotype of human endothelial cells and promotes angiogenesis in vitro. *Blood* **101**, 4816-4822.
- Doherty, P., Walsh, F.S. 1991. The contrasting roles of N-CAM and N-cadherin as neurite outgrowth-promoting molecules. *J. Cell Sci. Suppl.* **15**, 13-21.
- Donalies, M., Cramer, M., Ringwald, M., Starzinski-Powitz, A. 1991. Expression of M-cadherin, a member of the cadherin multigene family, correlates with differentiation of skeletal muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8024-8028.
- Drenckhahn, D., Franz, H. 1986. Identification of actin-, α -actinin-, and vinculin-containing plaques at the lateral membrane of epithelial cells. *J. Cell Biol.* **102**, 1843-1852.
- Drenckhahn, D., Zenker, W. (Eds.) 1994. Benninghoff Anatomie, Bd. 1 & 2. 15. edn. Urban & Schwarzenberg, München; 985 & 866 pp.
- Duan, L., Yuan, H., Su, C.J., Liu, Y.Y., Rao, Z.R. 2004. Ultrastructure of junction areas between neurons and astrocytes in rat supraoptic nuclei. *World J. Gastroenterol.* **10**, 117-121.
- Duden, R., Franke, W.W. 1988. Organization of desmosomal plaque proteins in cells growing at low calcium concentrations. *J. Cell Biol.* **107**, 1049-1063.
- Duguay, D., Foty, R.A., Steinberg, M.S. 2003. Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants. *Dev. Biol.* **253**, 309-323.
- Dye, F.J. 2002. Dictionary of Developmental Biology and Embryology. Wiley-Liss, Inc., New York; 165 pp.
- Ebata, N., Nodasaka, Y., Sawa, Y., Yamaoka, Y., Makino, S., Totsuka, Y., Yoshida, S. 2001a. Desmoplakin as a specific marker of lymphatic vessels. *Microvasc. Res.* **61**, 40-48.
- Ebata, N., Sawa, Y., Nodasaka, Y., Yamaoka, Y., Yoshida, S., Totsuka, Y. 2001b. Immunoelectron microscopic study of PECAM-1 expression on lymphatic endothelium of the human tongue. *Tissue Cell* **33**, 211-218.
- Edelman, G.M. 1993. A golden age for adhesion. *Cell Adhes. Commun.* **1**, 1-7.
- Edelman, G.M., Crossin, K.L. 1991. Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 155-190.
- Edelman, G.M., Thiery, J.-P. (Eds.) 1985. The Cell in Contact. John Wiley & Sons, New York; 507 pp.
- Edelman G.M., Cunningham B.A., Thiery J.P. (Eds.) 1990. Morphoregulatory Molecules. John Wiley & Sons, New York; 648 pp.

- El Sayegh, T.Y., Arora, P.D., Laschinger, C.A., Lee, W., Morrison, C., Overall, C.M., Kapus, A., McCulloch, C.A.G. 2004. Cortactin associates with N-cadherin adhesions and mediates intercellular adhesion strengthening in fibroblasts. *J. Cell Sci.* **117**, 5117-5131.
- Elenius, K., Jalkanen, M. 1994. Function of the syndecans - a family of cell surface proteoglycans. *J. Cell Sci.* **107**, 2975-2982.
- Eng, L.F., Smith, M.E., De Vellis, J., Skoff, R.P. 1985. Recent studies of the glial fibrillary acidic protein. *Ann. NY Acad. Sci. USA* **455**, 525-537.
- Engelhardt, B. 2003. Development of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res.* **314**, 119-129.
- Enzinger, F.M., Weiss, S.W. 1995. *Soft Tissue Tumors*. Mosby, St. Louis.
- Erlanson, R.A. 1981. *Diagnostic Transmission Electron Microscopy of Human Tumors. The Interpretation of Submicroscopic Structures in Human Neoplastic Cells*. Masson Publishing USA, Inc., New York; 193 pp.
- Eshkind, L., Tian, Q., Schmidt, A., Franke, W.W., Windoffer, R., Leube, R.E. 2002. Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells. *Eur. J. Cell Biol.* **81**, 592-598.
- Fabricant, R.N., De Larco, J.E., Todaro, G.J. 1977. Nerve growth factor receptors on human melanoma cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 565-569.
- Farquhar, M.G., Palade, G.E. 1963. Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.* **17**, 375-412.
- Fawcett, D.W. 1981. *The Cell*. 2 edn. W.B. Saunders Co., Philadelphia; 862 pp.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., Mavilio, F. 1998. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* **279**, 1528-1530.
- Fogh, J., Fogh, J.M., Orfeo, T. 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **59**, 221-226.
- Foty, R.A., Steinberg, M.S. 2005. The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation. *Dev. Biol.* **278**, 255-263.
- Fouquet, B., Zimbelmann, R., Franke, W.W. 1992. Identification of plakoglobin in oocytes and early embryos of *Xenopus laevis*: Maternal expression of a gene encoding a junctional plaque protein. *Differentiation* **51**, 187-194.
- Franke, W.W., Moll, R. 1987. Cytoskeletal components of lymphoid organs. I. Synthesis of cytokeratins 8 and 18 and desmin in subpopulations of extrafollicular reticulum cells of human lymph nodes, tonsils, and spleen. *Differentiation* **36**, 145-163.
- Franke, W.W., Krien, S., Brown Jr., R.M. 1969. Simultaneous glutaraldehyde-osmium tetroxide fixation with postosmication. An improved fixation procedure for electron microscopy of plant and animal cells. *Histochemie* **19**, 162-164.
- Franke, W.W., Lüder, M.R., Kartenbeck, J., Zerban, H., Keenan, T.W. 1976. Involvement of vesicle coat material in casein secretion and surface regeneration. *J. Cell Biol.* **69**, 173-195.
- Franke, W.W., Grund, C., Osborn, M., Weber, K. 1978a. The intermediate-sized filaments in rat kangaroo PtK2 cells. I. Morphology in situ. *Cytobiologie* **17**, 365-391.
- Franke, W.W., Schmid, E., Osborn, M., Weber, K. 1978b. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 5034-5038.
- Franke, W.W., Weber, K., Osborn, M., Schmid, E., Freudenstein, C. 1978c. Antibody to prekeratin. Decoration of tonofilament like arrays in various cells of epithelial character. *Exp. Cell Res.* **116**, 429-445.
- Franke, W.W., Schmid, E., Winter, S., Osborn, M., Weber, K. 1979. Widespread occurrence of intermediate-sized filaments of the vimentin-type in cultured cells from diverse vertebrates. *Exp. Cell Res.* **123**, 25-46.
- Franke, W.W., Schmid, E., Vandekerckhove, J., Weber, K. 1980. Permanently proliferating rat vascular smooth muscle cell with maintained expression of smooth muscle characteristics, including actin of the vascular smooth muscle type. *J. Cell Biol.* **87**, 594-600.

- Franke, W.W., Schmid, E., Grund, C., Müller, H., Engelbrecht, I., Moll, R., Stadler, J., Jarasch, E.D. 1981. Antibodies to high molecular weight polypeptides of desmosomes: specific localization of a class of junctional proteins in cells and tissue. *Differentiation* **20**, 217-241.
- Franke, W.W., Grund, C., Kuhn, C., Jackson, B.W., Illmensee, K. 1982a. Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. III. Primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments. *Differentiation* **23**, 43-59.
- Franke, W.W., Moll, R., Schiller, D.L., Schmid, E., Kartenbeck, J., Mueller, H. 1982b. Desmoplakins of epithelial and myocardial desmosomes are immunologically and biochemically related. *Differentiation* **23**, 115-127.
- Franke, W.W., Grund, C., Jackson, B.W., Illmensee, K. 1983. Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. IV. Ultrastructure of primary mesenchymal cells and their cell-cell interactions. *Differentiation* **25**, 121-141.
- Franke, W.W., Winter, S., von Overbeck, J., Gudat, F., Heitz, P.U., Stähli, C. 1987. Identification of the conserved, conformation-dependent cytokeratin epitope recognized by monoclonal antibody (lu-5). *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* **411**, 137-147.
- Franke, W.W., Goldschmidt, M.D., Zimbelmann, R., Mueller, H.M., Schiller, D.L., Cowin, P. 1989. Molecular cloning and amino acid sequence of human plakoglobin, the common junctional plaque protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4027-4031.
- Franke, W.W., Koch, P.J., Schäfer, S., Heid, H.W., Troyanovsky, S.M., Moll, I., Moll, R. 1994. The desmosome and the syndesmos: cell junctions in normal development and in malignancy. *Princess Takamatsu Symp.* **24**, 14-27.
- Frenzel, E.M., Johnson, R.G. 1996. Gap junction formation between cultured embryonic lens cells is inhibited by antibody to N-cadherin. *Dev. Biol.* **179**, 16-16.
- Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., Kulagina, N.N. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* **4**, 267-274.
- Frohman, M.A., Dush, M.K., Martin, G.R. 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8998-9002.
- Fruehauf, S., Srbic, K., Seggewiss, R., Topaly, J., Ho, A.D. 2002. Functional characterization of podia formation in normal and malignant hematopoietic cells. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 425-432.
- Fuchs, E., Weber, K. 1994. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 345-382.
- Fukuda, K. 2002. Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *C. R. Biol.* **325**, 1027-1038.
- Fukuhara, A., Irie, K., Yamada, A., Katata, T., Honda, T., Shimizu, K., Nakanishi, H., Takai, Y. 2002. Role of nectin in organization of tight junctions in epithelial cells. *Genes Cells* **7**, 1059-1072.
- Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., Tsukita, S. 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J. Cell Biol.* **156**, 1099-1111.
- Gallicano, G.I., Bauer, C., Fuchs, E. 2001. Rescuing desmoplakin function in extra-embryonic ectoderm reveals the importance of this protein in embryonic heart, neuroepithelium, skin and vasculature. *Development* **128**, 929-941.
- Garrod, D.R. 1993. Desmosomes and hemidesmosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 30-40.
- Geiger, B. 1983. Membrane-cytoskeleton interaction. *Biochim. Biophys. Acta* **737**, 305-341.
- Geiger, B., Tokuyasu, K.T., Dutton, A.H., Singer, S.J. 1980. Vinculin, an intracellular protein localized at specialized sites where microfilament bundles terminate at cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 4127-4131.
- Geiger, B., Schmid, E., Franke, W.W. 1983. Spatial distribution of proteins specific for desmosomes and adherens junctions in epithelial cells demonstrated by double immunofluorescence microscopy. *Differentiation* **23**, 189-205.
- Geiger, B., Avnur, Z., Rinnerthaler, G., Hinssen, H., Small, V.J. 1984. Microfilament-organizing centers in areas of cell contact: cytoskeletal interactions during cell attachment and locomotion. *J. Cell Biol.* **99**, 83s-91s.
- Geiger, B., Volk, T., Volberg, T. 1985. Molecular heterogeneity of adherens junctions. *J. Cell Biol.* **101**, 1523-1531.

- Geiger, B., Volberg, T., Ginsberg, D., Bitzur, S., Sabanay, I., Hynes, R.O. 1990. Broad spectrum pan-cadherin antibodies, reactive with the C-terminal 24 amino acid residues of N-cadherin. *J. Cell Sci.* **97**, 607-614.
- Gentil, B.J., Delphin, C., Benaud, C., Baudier, J. 2003. Expression of the giant protein AHNAK (desmoyokin) in muscle and lining epithelial cells. *J. Histochem. Cytochem.* **51**, 339-348.
- Gerhardt, H., Rascher, G., Schuck, J., Weigold, U., Redies, C., Wolburg, H. 2000a. R- and B-cadherin expression defines subpopulations of glial cells involved in axonal guidance in the optic nerve head of the chicken. *Glia* **31**, 131-143.
- Gerhardt, H., Wolburg, H., Redies, C. 2000b. N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken. *Dev. Dyn.* **218**, 472-479.
- Getsios, S., Huen, A.C., Green, K.J. 2004. Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 271-281.
- Ghadially F.N. 1988. Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix, Vol. II. 3. edn. Butterworths, London; pp. 589-1340.
- Giepmans, B.N., Moolenaar, W.H. 1998. The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. *Curr. Biol.* **8**, 931-934.
- Godard, S., Getz, G., Delorenzi, M., Farmer, P., Kobayashi, H., Desbaillets, I., Nozaki, M., Diserens, A.-C., Hamou, M.-F., Dietrich, P.-Y., Regli, L., Janzer, R.C., Bucher, P., Stupp, R., de Tribolet, N., Domany, E., Hegi, M.E. 2003. Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. *Cancer Res.* **63**, 6613-6625.
- Godsel, L.M., Getsios, S., Huen, A.C., Green, K.J. 2004. The molecular composition and function of desmosomes. **In:** Cell Adhesion (Behrens, J., Nelson, W.J., eds.; *Handbook of Experimental Pharmacology* **165**) Springer-Verlag, Berlin; pp. 137-193.
- Goldmuntz, E.A., Brosnan, C.F., Chiu, F.-C., Norton, W.T. 1986. Astrocytic reactivity and intermediate filament metabolism in experimental autoimmune encephalomyelitis: The effect of suppression with prazosin. *Brain Res.* **397**, 16-26.
- Goodenough, D.A., Paul, D.L. 2003. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 285-294.
- Gooding, J.M., Yap, K.L., Ikura, M. 2004. The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures. *Bioessays* **26**, 497-511.
- Goomer, R.S., Maris, T., Amiel, D. 1998. Age-related changes in the expression of cadherin-11, the mesenchyme specific calcium-dependent cell adhesion molecule. *Calcif. Tissue Int.* **62**, 532-537.
- Gory-Fauré, S., Prandini, M.H., Pointu, H., Rouillot, V., Pignot-Paintrand, I., Vernet, M., Huber, P. 1999. Role of vascular endothelial cadherin in vascular morphogenesis. *Development* **126**, 2093-2102.
- Granes, F., Berndt, C., Roy, C., Mangeat, P., Reina, M., Vilaro, S. 2003. Identification of a novel Ezrin-binding site in syndecan-2 cytoplasmic domain. *FEBS Lett.* **547**, 212-216.
- Green, C.R. 1984. Intercellular junctions. **In:** Biology of the Integument. 1 Invertebrates (Bereiter-Hahn, J., Matoltsy, A.G., Richards, K.S., eds.) Springer Verlag, Berlin; pp. 5-16.
- Green, K.J., Jones, J.C. 1996. Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *FASEB J.* **10**, 871-881.
- Green, K.J., Gaudry, C.A. 2000. Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 208-216.
- Green, K.J., Geiger, B., Jones, J.C.R., Talian, J.C., Goldman, R.D. 1987. The relationship between intermediate filaments and microfilaments before and during the formation of desmosomes and adherens-type junctions in mouse epidermal keratinocytes. *J. Cell Biol.* **104**, 1389-1402.
- Green, K.J., Virata, M.L., Elgart, G.W., Stanley, J.R., Parry, D.A. 1992. Comparative structural analysis of desmoplakin, bullous pemphigoid antigen and plectin: members of a new gene family involved in organization of intermediate filaments. *Int. J. Biol. Macromol.* **14**, 145-153.

- Gresser, O., Weber, E., Hellwig, A., Riese, S., Regnier-Vigouroux, A. 2001. Immunocompetent astrocytes and microglia display major differences in the processing of the invariant chain and in the expression of active cathepsin L and cathepsin S. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1813-1824.
- Grobben, B., De Deyn, P.P., Slegers, H. 2002. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res.* **310**, 257-270.
- Grossmann, K.S., Grund, C., Huelsken, J., Behrend, M., Erdmann, B., Franke, W.W., Birchmeier, W. 2004. Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation. *J. Cell Biol.* **167**, 149-160.
- Gumbiner, B., Lowenkopf, T., Apatira, D. 1991. Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3460-3464.
- Haas, A.R., Tuan, R.S. 1999. Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: II: Stimulation by bone morphogenetic protein-2 requires modulation of N-cadherin expression and function. *Differentiation* **64**, 77-89.
- Haftek, M., Hansen, M.U., Kaiser, H.W., Kreysel, H.W., Schmitt, D. 1996. Interkeratinocyte adherens junctions: immunocytochemical visualization of cell-cell junctional structures, distinct from desmosomes, in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **106**, 498-504.
- Hamm, S., Dehouck, B., Kraus, J., Wolburg-Buchholz, K., Wolburg, H., Risau, W., Cecchelli, R., Engelhardt, B., Dehouck, M.P. 2004. Astrocyte mediated modulation of blood-brain barrier permeability does not correlate with a loss of tight junction proteins from the cellular contacts. *Cell Tissue Res.* **315**, 157-166.
- Harris, A.K. 1976. Is cell sorting caused by differences in the work of intercellular adhesion? A critique of the Steinberg hypothesis. *J. Theor. Biol.* **61**, 267-285.
- Harris, R.G., Herzog, E.L., Bruscia, E.M., Grove, J.E., Van Arnem, J.S., Kreause, D.S. 2004. Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science* **305**, 90-93.
- Hasegawa, M., Seto, A., Uchiyama, N., Kida, S., Yamashita, T., Yamashita, J. 1996. Localization of E-cadherin in peripheral glia after nerve injury and repair. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55**, 424-434.
- Hashimoto, K., Nakatsuji, N. 1989. Formation of the primitive streak and mesoderm cells in mouse embryos – detailed scanning electron microscopical study. *Dev. Growth Differ.* **31**, 209-218.
- Hashimoto, T., Amagai, M., Parry, D.A., Dixon, T.W., Tsukita, S., Miki, K., Sakai, K., Inokuchi, Y., Kudoh, J. 1993. Desmoyokin, a 680 kDa keratinocyte plasma membrane-associated protein, is homologous to the protein encoded by human gene AHNAK. *J. Cell Sci.* **105**, 275-286.
- Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E.S., Hibbard, J., Stevenson, B.R. 1998. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J. Cell Biol.* **141**, 199-208.
- Hatta, K., Takeichi, M. 1986. Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. *Nature* **320**, 447-449.
- Hatta, K., Takagi, L.S., Fujisawa, H., Takeichi, M. 1987. Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. *Dev. Biol.* **120**, 215-227.
- Hatzfeld, M. 2005. The p120 family of cell adhesion molecules. Review. *Eur. J. Cell Biol.* **84**, 205-214.
- Hatzfeld, M., Nachtsheim, C. 1996. Cloning and characterization of a new armadillo family member, p0071, associated with the junctional plaque: evidence for a subfamily of closely related proteins. *J. Cell Sci.* **109**, 2767-2778.
- Hatzfeld, M., Kristjansson, G.I., Plessmann, U., Weber, K. 1994. Band 6 protein, a major constituent of desmosomes from stratified epithelia, is a novel member of the armadillo multigene family. *J. Cell Sci.* **107**, 2259-2270.
- Hatzfeld, M., Green, K.J., Sauter, H. 2003. Targeting of p0071 to desmosomes and adherens junctions is mediated by different protein domains. *J. Cell Sci.* **116**, 1219-1233.
- Hausmann, R.E. The mesoglea of *Hydra*. In: Burnett, A.L. 1973. Biology of Hydra. Academic Press, New York; pp. 394-451

- Hazan, R.B., Philipps, G.R., Qiao, R.F., Norton, L., Aaronson, S.A. 2000. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion and metastasis. *J. Cell Biol.* **148**, 779-790.
- Hazan, R.B., Kang, L., Roe, S., Borgen, P.I., Rimm, D.L. 1997. Vinculin is associated with the E-cadherin adhesion complex. *J. Biol. Chem.* **272**, 32448-32453.
- He, Y., Francis, F., Myers, K.A., Yu, W., Black, M.M., Baas, P.W. 2005. Role of cytoplasmic dynein in the axonal transport of microtubules and neurofilaments. *J. Cell Biol.* **168**, 697-703.
- Heid, H.W., Schmidt, A., Zimbelmann, R., Schäfer, S., Winter-Simanowski, S., Stumpp, S., Keith, M., Figge, U., Schnölzer, M., Franke, W.W. 1994. Cell type-specific desmosomal plaque proteins of the plakoglobin family: plakophilin 1 (band 6 protein). *Differentiation* **58**, 113-131.
- Heid, H.W., Schnölzer, M., Keenan, T.W. 1996. Adipocyte differentiation-related protein is secreted into milk as a constituent of milk lipid globule membrane. *Biochem. J.* **320**, 1025-1030.
- Heid, H.W., Moll, R., Schwetlick, I., Rackwitz, H.R., Keenan, T.W. 1998. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res.* **294**, 309-321.
- Henderson, D.W., Papadimitriou, J.M., Coleman, M. 1986. Ultrastructural Appearances of Tumours. Diagnosis and Classification of Human Neoplasia by Electron Microscopy. 2. edn. Churchill Livingstone, Edinburgh; 434 pp.
- Herbst, C. 1990. Über das Auseinandergehen von Furchungs- und Gewebezellen in kalkfreiem Medium. *Arch. f. Ent.-Mech.* **9**, 424-463.
- Hermann, A., Gastl, R., Liebau, S., Popa, M.O., Fiedler, J., Boehm, B., Maisel, M., Lerche, H., Schwarz, J., Brenner, R., Storch, A. 2004. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J. Cell Sci.* **117**, 4411-4422.
- Herrenknecht, K., Ozawa, M., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Lenter, M., Kemler, R. 1991. The uvomorulin-anchorage protein alpha catenin is a vinculin homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9156-9160.
- Herrmann, H., Harris, J.R. (Eds.) (1998) Intermediate Filaments (Subcellular Biochemistry Series, Vol. 31). Plenum Press, New York
- Herrmann, H., Aebi, U. 2004. Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 749-789.
- Herrmann, H., Fouquet, B., Franke, W.W. 1989. Expression of intermediate filament proteins during development of *Xenopus laevis*. I. cDNA clones encoding different forms of vimentin. *Development* **105**, 279-298.
- Herzog, E.L., Chai, L., Krause, D.S. 2003. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* **102**, 3483-3493.
- Hieda, Y., Tsukita, S. 1989. A new high molecular mass protein showing unique localization in desmosomal plaque. *J. Cell Biol.* **109**, 1511-1518.
- Hinz, B., Gabbiani, G. 2003. Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thromb. Haemost.* **90**, 993-1002.
- Hinz, B., Pittet, P., Smith-Clerc, J., Chaponnier, C., Meister, J.J. 2004. Myofibroblast development is characterized by specific cell-cell adherens junctions. *Mol. Biol. Cell* **15**, 4310-4320.
- Hirakawa, H., Okajima, S., Nagaoka, T., Takamatsu, T., Oyamada, M. 2003. Loss and recovery of the blood-nerve barrier in the rat sciatic nerve after crush injury are associated with expression of intercellular junctions proteins. *Exp. Cell Res.* **284**, 196-210.
- Hirano, S., Nose, A., Hatta, K., Kawakami, A., Takeichi, M. 1987. Calcium-dependent cell-cell adhesion molecules (cadherins): subclass specificities and possible involvement of actin bundles. *J. Cell Biol.* **105**, 2501-2510.
- Hirose, T., Giannini, C., Scheithauer, B.W. 2001. Ultrastructural features of pleomorphic xanthoastrocytoma: a comparative study with glioblastoma multiforme. *Ultrastruct. Pathol.* **25**, 469-478.
- Hiscox, S., Jiang, W.G. 1999. Ezrin regulates cell-cell and cell-matrix adhesion, a possible role with E-cadherin/ β -catenin. *J. Cell Sci.* **112**, 3081-3090.

- Ho, A.D., Punzel, M. 2003. Hematopoietic stem cells: can old cells learn new tricks? *J. Leukoc. Biol.* **73**, 547-555.
- Hobmayer, E., Hatta, M., Fischer, R., Fujisawa, T., Holstein, T.W., Sugiyama, T. 1996. Identification of a Hydra homologue of the β -catenin/plakoglobin/ armadillo gene family. *Gene* **172**, 155-159.
- Hoffmann, I., Balling, R. 1995. Cloning and expression analysis of a novel mesodermally expressed cadherin. *Dev. Biol.* **169**, 337-346.
- Hofmann, I., Schnölzer, M., Kaufmann, I., Franke, W.W. 2002. Symplekin, a constitutive protein of karyo- and cytoplasmic particles involved in mRNA biogenesis in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1665-1676.
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., Lacy, E. 1994. Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual. 2. edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 497 pp.
- Hollnagel, A., Grund, C., Franke, W.W., Arnold, H.-H. 2002. The cell adhesion molecule M-cadherin is not essential for muscle development and regeneration. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4760-4770.
- Holtfreter, J., 1939. Gewebeaffinität, ein Mittel der embryonalen Formbildung. *Arch. Exp. Zellforsch. Gewebezücht.* **23**, 169-209.
- Holtfreter, J. 1944. Experimental studies on the development of the pronephros. *Rev. Can. Biol.* **3**, 220-250.
- Hordijk, P.L., Anthony, E., Mul, F.P.J., Rientsma, R., Oomen, L.C.J.M., Roos, D. 1999. Vascular-endothelial-cadherin modulates endothelial monolayer permeability. *J. Cell Sci.* **112**, 1915-1923.
- Horikawa, K., Radice, G., Takeichi, M., Chisaka, O. 1999. Adhesive subdivisions intrinsic to the epithelial somites. *Dev. Biol.* **215**, 182-189.
- Hoshino, T., Shimizu, K., Honda, T., Kawakatsu, T., Fukuyama, T., Nakamura, T., Matsuda, M., Takai, Y. 2004. A novel role of nectins in inhibition of the E-cadherin-induced activation of Rac and formation of cell-cell adherens junctions. *Mol. Biol. Cell* **15**, 1077-1088.
- Howarth, A.G., Stevenson, B.R. 1995. Molecular environment of ZO-1 in epithelial and non-epithelial cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* **31**, 323-332.
- Howarth, A.G., Hughes, M.R., Stevenson, B.R. 1992. Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other non-epithelial cell types. *Am. J. Physiol.* **262**, C461-469.
- Hsueh, Y.P., Sheng, M. 1999. Regulated expression and subcellular localization of syndecan heparan sulfate proteoglycans and the syndecan-binding protein CASK/LIN-2 during rat brain development. *J. Neurosci.* **19**, 7415-7425.
- Huber, G., Matus, A. 1984. Differences in the cellular distributions of two microtubule-associated proteins, MAP1 and MAP2, in rat brain. *J. Neurosci.* **4**, 151-160.
- Huelsken, J., Birchmeier, W. 2001. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 547-553.
- Ikeda, W., Nakanishi, H., Miyoshi, J., Mandai, K., Ishizaki, H., Tanaka, M., Togawa, A., Takahashi, K., Nishioka, H., Yoshida, H., Mizoguchi, A., Nishikawa, S.-i., Takai, Y. 1999. Afadin: a key molecule essential for structural organization of cell-cell junctions of polarized epithelia during embryogenesis. *J. Cell Biol.* **146**, 1117-1131.
- Imamura, Y., Itoh, M., Maeno, Y., Tsukita, S., Nagafuchi, A. 1999. Functional domains of α -catenin required for the strong state of cadherin-based cell adhesion. *J. Cell Biol.* **144**, 1311-1322.
- Imhof, B.A., Vollmers, H.P., Goodman, S.L., Birchmeier, W. 1983. Cell-cell interaction and polarity of epithelial cells: specific perturbation using a monoclonal antibody. *Cell* **35**, 667-675.
- Ino, Y., Betensky, R.A., Zlatescu, M.C., Sasaki, H., Macdonald, D.R., Stemmer-Rachamimov, A.O., Ramsay, D.A., Cairncross, J.G., Louis, D.N. 2001. Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma: implications for patient management at diagnosis. *Clin. Cancer Res.* **7**, 839-845.
- Inuzuka, H., Miyatani, S., Takeichi, M. 1991a. R-cadherin: A novel Ca^{2+} -dependent cell-cell adhesion molecule expressed in the retina. *Neuron* **7**, 69-79.

- Inuzuka, H., Redies, C., Takeichi, M. 1991b. Differential expression of R- and N-cadherin in neural and mesodermal tissues during early chicken development. *Development* **113**, 959-967.
- Itoh, M., Nagafuchi, A., Moroi, S., Tsukita, S. 1997. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J. Cell Biol.* **138**, 181-192.
- Iyer, S., Ferreri, D.M., DeCocco, N.C., Minnear, F.L., Vincent, P.A. 2004. VE-cadherin-p12 interaction is required for maintenance of endothelial barrier function. *Am. J. Physiol.* **286**, L1143-L1153.
- Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G., Minick, C.R. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* **52**, 2745-2756.
- Jaggi, M., Wheelock, M.J., Johnson, K.R. 2002. Differential displacement of classical cadherins by VE-cadherin. *Cell Commun. Adhes.* **9**, 103-115.
- Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I., Bruder, S.P. 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell. Biochem.* **64**, 295-312.
- Jalkanen, S., Bargatze, R.F., de los Toyos, J., Butcher, E.C. 1987. Lymphocyte recognition of high endothelium: antibodies to distinct epitopes of an 85-95-kD glycoprotein antigen differentially inhibit lymphocyte binding to lymph node, mucosal, or synovial endothelial cells. *J. Cell Biol.* **105**, 983-990.
- Jamora, C., Fuchs, E. 2002. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* **4**, E101-108.
- Jarasch, E.D., Bruder, G., Keenan, T.W., Franke, W.W. 1977. Redox constituents in milk fat globule membranes and rough endoplasmic reticulum from lactating mammary gland. *J. Cell Biol.* **73**, 223-241.
- Jarasch, E.D., Grund, C., Bruder, G., Heid, H.W., Keenan, T.W., Franke, W.W. 1981. Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell* **25**, 67-82.
- Jesaitis, L.A., Goodenough, D.A. 1994. Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *J. Cell Biol.* **124**, 949-961.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A., Verfaillie, C.M. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41-49.
- Jockusch, B.M., Bubeck, P., Giehl, K., Kroemker, M., Moschner, J., Rothkegel, M., Rudiger, M., Schluter, K., Stanke, G., Winkler, J. 1995. The molecular architecture of focal adhesions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 379-416.
- Jones, E.G., Cowan, W.M. 1997. Nervous tissue. **In:** Histology, 4 edn. (Weiss, L., Greep, R.O., eds.) McGraw-Hill, New York; pp. 283-372.
- Joshi, C.V., Enver, T. 2002. Plasticity revisited. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 749-755.
- Kaiser, H.W., Ness, W., Jungblut, I., Briggaman, R.A., Kreysel, H.W., O'Keefe, E.J. 1993. Adherens junctions: demonstration in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 180-185.
- Kajstura, J., Rota, M., Whang, B., Cascapera, S., Hosoda, T., Bearzi, C., Nurzynska, D., Kasahara, H., Zias, E., Bonafé, M., Nadal-Ginard, B., Torella, D., Nascimbene, A., Quaini, F., Urbanek, K., Leir, A., Anversa, P. 2005. Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ. Res.* **96**, 127-137.
- Kapprell, H.-P., Cowin, P., Franke, W.W. 1987. Biochemical characterization of the soluble form of the junctional plaque protein, plakoglobin, from different cell types. *Eur. J. Biochem.* **166**, 505-517.
- Kapprell, H.-P., Owaribe, K., Franke, W.W. 1988. Identification of a basic protein of Mr 75,000 as an accessory desmosomal plaque protein in stratified and complex epithelia. *J. Cell Biol.* **106**, 1679-1691.
- Kapprell, H.-P., Duden, R., Owaribe, K., Schmelz, M., Franke, W.W. 1990. Subplasmalemmal plaques of intercellular junctions: common and distinguishing proteins. **In:** Morphoregulatory Molecules (G.M. Edelman, B.A. Cunningham, J.P. Thiery, eds.) John Wiley & Sons, New York; pp. 285-314.
- Kartenbeck, J., Schmid, E., Franke, W.W., Geiger, B. 1982. Different modes of internalization of proteins associated with adherens junctions and desmosomes: experimental separation of lateral contacts induces endocytosis of desmosomal plaque material. *EMBO J.* **1**, 725-732.

- Kartenbeck, J., Schwechheimer, K., Moll, R., Franke, W.W. 1984. Attachment of vimentin filaments to desmosomal plaques in human meningioma cells and arachnoidal tissue. *J. Cell Biol.* **98**, 1072-1081.
- Kartenbeck, J., Schmelz, M., Franke, W.W., Geiger, B. 1991. Endocytosis of junctional cadherins in bovine kidney epithelial (MDBK) cells cultured in low Ca²⁺ ion medium. *J. Cell Biol.* **113**, 881-892.
- Kashima, T., Kawaguchi, J., Takeshita, S., Kuroda, M., Ishikawa, Y., Ishida, T., Mori, S., Machinami, R., Kudo, A. 1999. Anomalous cadherin expression in osteosarcoma: Possible relationships to metastasis and morphogenesis. *Am. J. Pathol.* **155**, 1549-1555.
- Kashima, T., Nakamura, K., Kawaguchi, J., Takahashi, M., Ishida, T., Aburatani, H., Kudo, A., Fukayama, M., Grigoriadis, A.E. 2003. Overexpression of cadherins suppresses pulmonary metastasis of osteosarcoma *in vivo*. *Int. J. Cancer* **104**, 147-154.
- Katenkamp, D., Stiller, D. 1990. Weichgewebstumoren. Pathologie, histologische Diagnostik und Differentialdiagnose. J.A. Barth, Leipzig; 400 pp.
- Kaufmann, U., Zuppinger, C., Waibler, Z., Rudiger, M., Urbich, C., Martin, B., Jockusch, B.M., Eppenberger, H., Starzinski-Powitz, A. 2000. The armadillo repeat region targets ARVCF to cadherin-based cellular junctions. *J. Cell Sci.* **113**, 4121-4135.
- Kawaguchi, J., Takeshita, S., Kashima, T., Imai, T., Machinami, R., Kudo, A. 1999. Expression and function of the splice variant of the human cadherin-11 gene in subordination to intact cadherin-11. *J. Bone Miner. Res.* **14**, 764-775.
- Kawaguchi, J., Azuma, Y., Hoshi, K., Kii, I., Takeshita, S., Ohta, T., Ozawa, H., Takeichi, M., Chisaka, O., Kudo, A. 2001a. Targeted disruption of cadherin-11 leads to a reduction in bone density in calvaria and long bone metaphyses. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 1265-1271.
- Kawaguchi, J., Kii, I., Sugiyama, Y., Takeshita, S., Kudo, A. 2001b. The transition of cadherin expression in osteoblast differentiation from mesenchymal cells: consistent expression of cadherin-11 in osteoblast lineage. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 260-269.
- Kelley, T.W., Tubbs, R.R., Prayson, R.A. 2005. Molecular diagnostic techniques for the clinical evaluation of gliomas. *Diagn. Mol. Pathol.* **14**, 1-8.
- Kemler, R. (1992) Classical cadherins. *Semin. Cell Biol.* **3**, 149-155.
- Keon, B.H., Schäfer, S., Kuhn, C., Grund, C., Franke, W.W. 1996. Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein. *J. Cell Biol.* **134**, 1003-1018.
- Kevil, C.G., Okayama, N., Trocha, S.D., Kalogeris, T.J., Coe, L.L., Specian, R.D., Davis, C.P., Alexander, J.S. 1998. Expression of zonula occludens and adherens junctional proteins in human venous and arterial endothelial cells: role of occludin in endothelial solute barriers. *Microcirculation* **5**, 197-210.
- Kikyo, M., Matozaki, T., Kodama, A., Kawabe, H., Nakanishi, H., Takai, Y. 2000. Cell-cell adhesion-mediated tyrosine phosphorylation of nectin-2 δ , an immunoglobulin-like cell adhesion molecule at adherens junctions. *Oncogene* **19**, 4022-4028.
- King, I.A., Sullivan, K.H., Bennett Jr., R., Buxton, R.S. 1995. The desmocollins of human foreskin epidermis: identification and chromosomal assignment of a third gene and expression patterns of the three isoforms. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 314-321.
- Kim, K., Sirota, A., Chen Yh, Y.H., Jones, S.B., Dudek, R., Lanford, G.W., Thakore, C., Lu, Q. 2002. Dendrite-like process formation and cytoskeletal remodeling regulated by delta-catenin expression. *Exp. Cell Res.* **275**, 171-184.
- Kim, S.W., Fang, X., Ji, H., Paulson, A.F., Daniel, J.M., Ciesiolka, M., van Roy, F., McCrea, P.D. 2002. Isolation and characterization of XKaiso, a transcriptional repressor that associates with the catenin Xp120(ctn) in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* **277**, 8202-8208.
- Kimura, Y., Matsunami, H., Inoue, T., Shimamura, K., Uchida, N., Ueno, T., Miyazaki, T., Takeichi, M. 1995. Cadherin-11 expressed in association with mesenchymal morphogenesis in the head, somite, and limb bud of early mouse embryos. *Dev. Biol.* **169**, 347-358.
- Kinner, B., Zaleskas, J.M., Spector, M. 2002. Regulation of smooth muscle actin expression and contraction in adult human mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* **278**, 72-83.

- Kitajima, K., Koshimizu, U., Nakamura, T. 1999. Expression of a novel type of classic cadherin, PB-cadherin in developing brain and limb buds. *Dev. Dyn.* **215**, 206-214.
- Kleihues, P., Cavenee, W.K. (Eds.) 1997. Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. International Agency for Research on Cancer, Lyon; 255 pp.
- Kleihues, P., Cavenee, W.K. (Eds.) 2000. Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System (WHO Classification of Tumours). IARC Press, Lyon; 314 pp.
- Kleihues, P., Louis, D.N., Scheithauer, B.W., Rorke, L.B., Reifenberger, G., Burger, P.C., Cavenee, W.K. 2002. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **61**, 215-225
- Knapp, A.C., Franke, W.W. 1989. Spontaneous losses of control of cytokeratin gene expression in transformed, non-epithelial human cells occurring at different levels of regulation. *Cell* **59**, 67-79.
- Knapp, A.C., Bosch, F.X., Hergt, M., Kuhn, C., Winter-Simanowski, S., Schmid, E., Regauer, S., Bartek, J., Franke, W.W. 1989. Cytokeratins and cytokeratin filaments in subpopulations of cultured human and rodent cells of nonepithelial origin: modes and patterns of formation. *Differentiation* **42**, 81-102.
- Kniesel, U., Risau, W., Wolburg, H. 1996. Development of blood-brain barrier tight junctions in the rat cortex. *Dev. Brain Res.* **96**, 229-240.
- Knowles, B.B., Howe, C.C., Aden, D.P. 1980. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* **209**, 497-499.
- Knudsen, K.A., Soler, A.P., Johnson, K.R., Wheelock, M.J. 1995. Interaction of α -actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via α -catenin. *J. Cell Biol.* **130**, 67-77.
- Ko, K., Arora, P., Lee, W., McCulloch, C. 2000. Biochemical and functional characterization of intercellular adhesion and gap junctions in fibroblasts. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**, C147-C157.
- Kobielak, A., Pasolli, H.A., Fuchs, E. 2004. Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat. Cell Biol.* **6**, 21-30.
- Koch, P.J., Franke, W.W. 1994. Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 682-687.
- Koch, P.J., Walsh, M.J., Schmelz, M., Goldschmidt, M.D., Zimbelmann, R., Franke, W.W. 1990. Identification of desmoglein, a constitutive desmosomal glycoprotein, as a member of the cadherin family of cell adhesion molecules. *Eur. J. Cell Biol.* **53**, 1-12.
- Koch, P.J., Goldschmidt, M.D., Zimbelmann, R., Troyanovsky, R., Franke, W.W. 1992. Complexity and expression patterns of the desmosomal cadherins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 353-357.
- Kopen, G.C., Prockop, D.J., Phinney, D.G. 1999. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10711-10716.
- Kostetskii, I., Li, J., Xiong, Y., Zhou, R., Ferrari, V.A., Patel, V.V., Molkenin, J.D., Radice, G.L. 2005. Induced deletion of the N-cadherin gene in the heart leads to dissolution of the intercalated disc structure. *Circ. Res.* **96**, 346-354.
- Kowalczyk, A.P., Palka, H.L., Luu, H.H., Nilles, L.A., Anderson, J.E., Wheelock, M.J., Green, K.J. 1994. Posttranslational regulation of plakoglobin expression. Influence of the desmosomal cadherins on plakoglobin metabolic stability. *J. Biol. Chem.* **269**, 31214-31223.
- Kowalczyk, A.P., Navarro, P., Dejana, E., Bornslaeger, E.A., Green, K.J., Kopp, D.S., Borgwardt, J.E. 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**, 3045-3057.
- Krause, M., Dent, E.W., Bear, J.E., Loureiro, J.J., Gertler, F.B. 2003. Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 541-564.
- Kucia, M., Dawn, B., Hunt, G., Guo, Y., Wysoczynski, M., Majka, M., Ratajczak, J., Rezzoug, F., Ildstad, S.T., Bolli, R., Ratajczak, M.Z. 2004. Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction. *Circ. Res.* **95**, 1191-1199.

- Kühnel, W. 2002. Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. 11 edn. Thieme, Stuttgart; 535 pp.
- LaBarge, M.A., Blau, H.M. 2002. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* **111**, 589-601.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laing, J.G., Manley-Markowski, R.N., Koval, M., Civitelli, R., Steinberg, T.H. 2001. Connexin45 interacts with zonula occludens-1 and connexin43 in osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 23051-23055.
- Lamb, R.F., Ozanne, B.W., Roy, C., McGarry, L., Stipp, C., Mangeat, P., Jay, D.G. 1997. Essential functions of ezrin in maintenance of cell shape and lamellipodial extension in normal and transformed fibroblasts. *Curr. Biol.* **7**, 682-688.
- Lampugnani, M.G., Resnati, M., Raiteri, M., Pigott, R., Pisacane, A., Houen, G., Ruco, L.P., Dejana, E. 1992. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J. Cell Biol.* **118**, 1511-1522.
- Lampugnani, M.G., Corada, M., Caveda, L., Breviario, F., Ayalon, O., Geiger, B., Dejana, E. 1995. The molecular organization of endothelial cell to cell junctions, differential association of plakoglobin, β -catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J. Cell Biol.* **129**, 203-217.
- Lampugnani, M.G., Zanetti, A., Breviario, F., Balconi, G., Orsenigo, F., Corada, M., Spagnuolo, R., Betson, M., Braga, V., Dejana, E. 2002. VE-cadherin regulates endothelial actin activating Rac and increasing membrane association of Tiam. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1175-1189.
- Landis, D.M.D., Reese, T.S. 1981. Membrane structure in mammalian astrocytes: A review of freeze-fracture studies on adult, developing, reactive and cultured astrocytes. **In:** Glial-Neurone Interactions (J. Exp. Biol. vol. 95; J.E. Treherne, ed.). Cambridge University Press, Cambridge; pp. 35-38.
- Lane, N.J. 1981. Invertebrate neuroglia-junctional structure and development. **In:** Glial-Neurone Interactions (J. Exp. Biol. vol. 95; J.E. Treherne, ed.). Cambridge University Press, Cambridge; pp. 7-33.
- Langbein, L., Grund, C., Kuhn, C., Praetzel, S., Kartenbeck, J., Brandner, J.M., Moll, I., Franke, W.W. 2002. Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom. *Eur. J. Cell Biol.* **81**, 419-435.
- Langbein, L., Pape, U.F., Grund, C., Kuhn, C., Praetzel, S., Moll, I., Moll, R., Franke, W.W. 2003. Tight junction-related structures in the absence of a lumen: occludin, claudins and tight junction plaque proteins in densely packed cell formations of stratified epithelia and squamous cell carcinomas. *Eur. J. Cell Biol.* **82**, 385-400.
- Lanza, R., Gearhart, J., Hogan, B., Melton, D., Pedersen, R., Thomson, J., West, M. (Eds.) 2004. Handbook of Stem Cells, Vol. 1. Embryonic Stem Cells. Elsevier Academic Press, Amsterdam; 806 pp.
- Lawson, K.A., Meneses, J.J., Pedersen, R.A. 1991. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development* **113**, 891-911.
- Leckband, D., Sivasankar, S. 2000. Mechanism of homophilic cadherin adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 587-592.
- Lewis, J.E., Wahl III, J.K., Sass, K.M., Jensen, P.J., Johnson, K.R., Wheelock, M.J. 1997. Cross-talk between adherens junctions and desmosomes depends on plakoglobin. *J. Cell Biol.* **136**, 919-934.
- Liebner, S., Fischmann, A., Rascher, G., Duffner, F., Grote, E.-H., Kalbacher, H., Wolburg, H. 2000a. Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol.* **100**, 323-331.
- Liebner, S., Gerhardt, H., Wolburg, H. 2000b. Differential expression of endothelial β -catenin and plakoglobin during development and maturation of the blood-brain and blood-retina barrier in the chicken. *Dev. Dyn.* **217**, 86-98.
- Liebner, S., Kniesel, U., Kalbacher, H., Wolburg, H. 2000c. Correlation of tight junction morphology with the expression of tight junction proteins in blood-brain barrier endothelial cells. *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 707-717.
- Liu, H.M., Bahu, R.M. 1975. Ultrastructure of the nervous system. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **5**, 348-354.
- Londos, C., Brasaemle, D.L., Schultz, C.J., Segrest, J.P., Kimmel, A.R. 1999. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**, 51-58.

- Lories, V., Cassiman, J.J., Van den Berghe, H., David, G. 1989. Multiple distinct membrane heparan sulfate proteoglycans in human lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **264**, 7009-7016.
- Löw, I., Wieland, T. 1974. The interaction of phalloidin. Some of its derivatives, and of other cyclic peptides with muscle actin as studied by viscosimetry. *FEBS Lett.* **44**, 340-343.
- Lu, Q., Mukhopadhyay, N.K., Griffin, J.D., Paredes, M., Medina, M., Kosik, K.S. 2002. Brain armadillo protein delta-catenin interacts with Abl tyrosine kinase and modulates cellular morphogenesis in response to growth factors. *J. Neurosci. Res.* **67**, 618-624.
- Luo, Y., Radice, G.L. 2005. N-cadherin acts upstream of VE-cadherin in controlling vascular morphogenesis. *J. Cell Biol.* **169**, 29-34.
- Luo, Y., Ferreira-Cornwell, M., Baldwin, H., Kostetskii, I., Lenox, J., Lieberman, M., Radice, G. 2001. Rescuing the N-cadherin knockout by cardiac-specific expression of N- or E-cadherin. *Development* **128**, 459-469.
- Luo, Y., Kostetskii, I., Radice, G.L. 2005. N-cadherin is not essential for limb mesenchymal chondrogenesis. *Dev. Dyn.* **232**, 336-344.
- MacCalman, C.D., Furth, E.E., Omigbodun, A., Bronner, M., Coutifaris, C., Strauss III, J.F. 1996. Regulated expression of cadherin-11 in human epithelial cells: a role for cadherin-11 in trophoblast-endometrium interactions? *Dev. Dyn.* **206**, 201-211.
- Maeda, O., Usami, N., Kondo, M., Takahashi, M., Goto, H., Shimokata, K., Kusugami, K., Sekido, Y. 2004. Plakoglobin (gamma-catenin) has TCF/LEF family-dependent transcriptional activity in beta-catenin-deficient cell line. *Oncogene* **23**, 964-972.
- Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Koonishi, F., Kodama, H., Pan, J., Sano, M., Takahashi, T., Hori, S., Abe, H., Hata, J.-i., Umezawa, A., Ogawa, S. 1999. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J. Clin. Invest.* **103**, 697-705.
- Manabe, T., Toashi, H., Uchida, N., Suzuki, S.C., Hayakawa, Y., Yamamoto, M., Yoda, H., Miyakawa, T., Takeichi, M., Chisaka, O. 2000. Loss of cadherin-11 adhesion receptor enhances plastic changes in hippocampal synapses and modifies behavioral responses. *Mol. Cell. Neurosci.* **15**, 534-546.
- Mandai, K., Nakanishi, H., Satoh, A., Obaishi, H., Wada, M., Nishioka, H., Itoh, M., Mizoguchi, A., Aoki, T., Fujimoto, T., Matsuda, Y., Tsukita, S., Takai, Y. 1997. Afadin: A novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adherens junction. *J. Cell Biol.* **139**, 517-528.
- Mandai, K., Nakanishi, H., Satoh, A., Takahashi, K., Satoh, K., Nishioka, H., Mizoguchi, A., Takai, Y. 1999. Ponsin/SH3P12: An 1-afadin- and vinculin-binding protein localized at cell-cell and cell-matrix adherens junctions. *J. Cell Biol.* **144**, 1001-1017.
- Manning, T.J., Parker, J.C., Sontheimer, H. 2000. Role of lysophosphatidic acid and Rho in glioma cell motility. *Cell Motil. Cytoskeleton* **45**, 185-199.
- Mariner, D.J., Sirotkin, H., Daniel, J.M., Lindman, B.R., Mernaugh, R., L., Patten, A.K., Theoreson, M.A., Reynolds, A.B. 1999. Production and characterization of monoclonal antibodies to ARVCF. *Hybridoma* **18**, 343-349.
- Mariner, D.J., Wang, J., Reynolds, A.B. 2000. ARVCF localizes to the nucleus and adherens junction and is mutually exclusive with p120^{cas} in E-cadherin complexes. *J. Cell Sci.* **113**, 1481-1490.
- Martinez, M.C., Ochiishi, T., Majewski, M., Kosik, K.S. 2003. Dual regulation of neuronal morphogenesis by a δ -catenin-cortactin complex and Rho. *J. Cell Biol.* **162**, 99-111.
- Marx, J. 2003. Cancer research. Mutant stem cells may seed cancer. *Science* **301**, 1308-1310.
- Mary, S., Charasse, S., Meriane, M., Comunnale, F., Travo, P., Blangy, A., Gauthier-Rouviere, C. 2002. Biogenesis of N-cadherin-dependent cell-cell contacts in living fibroblasts is a microtubule-dependent kinesin-driven mechanism. *Mol. Biol. Cell* **13**, 285-301.
- Matsunaga, M., Hatta, K., Nagafuchi, A., Takeichi, M., 1998. Guidance of optic nerve fibres by N-cadherin adhesion molecules. *Nature* **334**, 62-64.

- Matsuyoshi, N., Imamura, S. 1997. Multiple cadherins are expressed in human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**, 355-358.
- Matter, K., Balda, M.S. 2003. Signalling to and from tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 225-236.
- McGuckin, C.P., Forraz, N., Allouard, Q., Pettengell, R. 2004. Umbilical cord blood stem cells can expand hematopoietic and neuroglial progenitors in vitro. *Exp. Cell Res.* **295**, 350-359.
- Mechanic, S., Raynor, K., Hill, J.E., Cowin, P. 1991. Desmocollins form a distinct subset of the cadherin family of cell adhesion molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4476-4480.
- Merino, A., Mazzara, R., Fuste, B., Diaz-Ricart, M., Rozman, M., Lozano, M., Ordinas, A. 2003. Transfusion medicine illustrated. The mesenchymal stem cell revealed. *Transfusion* **43**, 1.
- Mertens C. 1999. Plakophilin 2: ein neues Cytoskelettprotein mit molekularen Interaktionen im Zellkern und in Zellverbindungen. Dissertation. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Gesamtfakultät, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Mertens, C., Kuhn, C., Franke, W.W. 1996. Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. *J. Cell Biol.* **135**, 1009-1025.
- Mertens, C., Kuhn, C., Moll, R., Schwetlick, I., Franke, W.W. 1999. Desmosomal plakophilin 2 as a differentiation marker in normal and malignant tissues. *Differentiation* **64**, 277-290.
- Mertens, C., Hofmann, I., Wang, Z., Teichmann, M., Sepelchik, S., Schnölzer, M., Franke, W.W. 2001. Nuclear particles containing RNA polymerase III complexes associated with the junctional plaque protein plakophilin 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7795-7800.
- Mezey, E., Chandross, K.J., Harta, G., Maki, R.A., McKecher, S.R. 2000. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* **290**, 1779-1782.
- Minguell, J.J., Erices, A., Conget, P. 2001. Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.* **226**, 507-520.
- Miyahara, M., Nakanishi, H., Takahashi, K., Satoh-Horikawa, K., Tachibana, K., Takai, Y. 2000. Interaction of nectin with afadin is necessary for its clustering at cell-cell contact sites but not for its *cis* dimerization or *trans* interaction. *J. Biol. Chem.* **275**, 613-618.
- Miyamoto, T., Morita, K., Takemoto, D., Takeuchi, K., Kitano, Y., Miyakawa, T., Nakayama, K., Okamura, Y., Sasaki, H., Miyachi, Y., Furuse, M., Tsukita, S. 2005. Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice. *J. Cell Biol.* **169**, 527-538.
- Morita, K., Sasaki, H., Fujimoto, K., Furuse, M., Tsukita, S. 1999. Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. *J. Cell Biol.* **145**, 579-588.
- Mueller, H., Franke, W.W. 1983. Biochemical and immunological characterization of desmoplakins I and II, the major polypeptides of the desmosomal plaque. *J. Mol. Biol.* **163**, 647-671.
- Mugnaini, E., Schnapp, B. 1974. Possible role of zonula occludens of the myelin sheath in demyelinating conditions. *Nature* **251**, 725-727.
- Nabeshima, S., Reese, T.S., Landis, D.M., Brightman, M.W. 1975. Junctions in the meninges and marginal glia. *J. Comp. Neurol.* **164**, 127-169.
- Nagafuchi, A. 2001. Molecular architecture of adherens junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 600-603.
- Nagafuchi, A., Takeichi, M. 1989. Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion: a 94 kDa protein functionally associated with a specific region of the cytoplasmic domain of E-cadherin. *Cell Regul.* **1**, 37-44.
- Nagafuchi, A., Yonemura, S. 1992. Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 834-839.
- 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**, 1475-1484.

- Neugebauer, K.M., Tomaselli, K.J., Lilien, J., Reichardt, L.F. 1988. N-cadherin, NCAM, and integrins promote retinal neurite outgrowth on astrocytes in vitro. *J. Cell Biol.* **107**, 1177-1187.
- Nico, B., Frigeri, A., Nicchia, G.P., Corsi, P., Ribatti, D., Quondamatteo, F., Herken, R., Girolamo, F., Marzullo, A., Svelto, M., Roncali, L. 2003. Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood-brain barrier of dystropic mdx mice. *Glia* **42**, 235-251.
- Nielsen, P.A., Baruch, A., Giepmans, B.N., Kumar, N.M. 2001. Characterization of association of connexins and ZO-1 in the lens. *Cell Commun. Adhes.* **8**, 213-7.
- Niessen, C.M., Gumbiner, B.M. 2002. Cadherin-mediated cell sorting not determined by binding or adhesion specificity. *J. Cell Biol.* **156**, 389-399.
- Nilles, L.A., Parry, D.A., Powers, E.E., Angst, B.D., Wagner, R.M., Green, K.J. 1991. Structural analysis and expression of human desmoglein: a cadherin-like component of the desmosome. *J. Cell Sci.* **99**, 809-821.
- North, A.J., Bardsley, W.G., Hyam, J., Bornslaeger, E.A., Cordingley, H.C., Trinaman, B., Hatzfeld, M., Green, K.J., Magee, A.I., Garrod, D.R. 1999. Molecular map of the desmosomal plaque. *J. Cell Sci.* **112**, 4325-4336.
- Nose, A., Takeichi, M. 1986. A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *J. Cell Biol.* **103**, 2649-2658.
- Nuber, U.A., Schäfer, S., Schmidt, A., Koch, P.J., Franke, W.W. 1995. The widespread human desmocollin Dsc2 and tissue-specific patterns of synthesis of various desmocollin subtypes. *Eur. J. Cell Biol.* **66**, 69-74.
- Nuber, U.A., Schäfer, S., Stehr, S., Rackwitz, H.R., Franke, W.W. 1996. Patterns of desmocollin synthesis in human epithelia: immunolocalization of desmocollins 1 and 3 in special epithelia and in cultured cells. *Eur. J. Cell Biol.* **71**, 1-13.
- Oberlender, S.A., Tuan, R.S. 1994a. Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. *Development* **120**, 177-187.
- Oberlender, S.A., Tuan, R.S. 1994b. Spatiotemporal profile of N-cadherin expression in the developing limb mesenchyme. *Cell Adhes. Commun.* **2**, 521-537.
- Oda, H., Uemura, T., Harada, Y., Iwai, Y., Takeichi, M. 1994. A Drosophila homolog of cadherin associated with armadillo and essential for embryonic cell-cell adhesion. *Dev. Biol.* **165**, 716-726.
- O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.
- Ohsugi, M., Larue, L., Schwarz, H., Kemler, R. 1997. Cell-junctional and cytoskeletal organization in mouse blastocysts lacking E-cadherin. *Dev. Biol.* **185**, 261-271.
- Okada, T.S. 1996. 1996. The path leading to the discovery of cadherin: In retrospect. *Dev. Growth Differ.* **38**, 583-596.
- Okazaki, M., Takeshita, S., Kawai, S., Kikuno, R., Tsujimura, A., Kudo, A., Amann, E. 1994. Molecular cloning and characterization of OB-cadherin, a new member of cadherin family expressed in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* **269**, 12092-12098.
- O'Keefe, E.J., Briggaman, R.A., Herman, B. 1987. Calcium-induced assembly of adherens junctions in keratinocytes. *J. Cell Biol.* **105**, 807-817.
- Orkand, R.K., Orkand, P.M., Tang, C.-M. 1981. Membrane properties of neuroglia in the optic nerve of *Necturus*. *J. Exp. Biol.* **95**, 49-59.
- Orlandini, M., Oliviero, S. 2001. In fibroblasts Vegf-D expression is induced by cell-cell contact mediated by cadherin-11. *J. Biol. Chem.* **276**, 6576-6581.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S.M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D.M., Leri, A., Anversa, P. 2001a. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium *Nature* **410**, 701-705.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Limana, F., Jakoniuk, I., Quaini, F., Nadal-Ginard, B., Bodine, D.M., Leri, A., Anversa, P. 2001b. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10344-10349.
- Orlic, D., Hill, J.M., Arai, A.E. 2002. Stem cells for myocardial regeneration. *Circ. Res.* **91**, 1092-1102.

- Ortiz, L.A., Gambelli, F., McBride, C., Gaupp, D., BAdoo, M., Kaminski, N., Phinney, D.G. 2003. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 8407-8411.
- Osborn, M., Weber, K. (Eds.) 1989. Cytoskeletal Proteins in Tumor Diagnosis (Current Communications in Molecular Biology). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor/NY; 244 pp.
- Osborn, M., Franke, W., Weber, K. 1980. Direct demonstration of the presence of two immunologically distinct intermediate-sized filament systems in the same cell by double immunofluorescence microscopy. Vimentin and cytokeratin fibers in cultured epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **125**, 37-46.
- Osborn, M., Ludwig-Festl, M., Weber, K., Bignami, A., Dahl, D., Bayreuther, K. 1981. Expression of glial and vimentin type intermediate filaments in cultures derived from human glial material. *Differentiation* **19**, 161-167.
- Osborn, M., Geisler, N., Shaw, G., Sharp, G., Weber, K. 1982. Intermediate filaments. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **46**, 413-429.
- Osborn, M., Altmannsberger, M., Debus, E., Weber, K. 1984. Conventional and monoclonal antibodies to intermediate filament proteins in human tumor diagnosis. **In:** Cancer Cells 1. The Transformed Phenotype. (Levine, A.J., Vande Woude, G.F., Topp, W.C., Watson, J.D., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor/NY; pp. 191-200.
- Otani, A. 2002. Bone marrow-derived stem cells target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis. *Nat. Med.* **8**, 1004-1010.
- Otero, J.J., Fu, W., Kan, L., Cuadra, A.E., Kessler, J.A. 2004. β -Catenin signaling is required for neural differentiation of embryonic stem cells. *Development* **131**, 3545-3557.
- Otey, C.A., Carpen, O. 2004. α -Actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil. Cytoskeleton* **58**, 104-111.
- Packer, A.I., Elwell, V.A., Parnass, J.D., Knudsen, K.A., Wolgemuth, D.J. 1997. N-Cadherin protein distribution in normal embryos and in embryos carrying mutations in the homeobox gene Hoxa-4. *Int. J. Dev. Biol.* **41**, 459-468.
- Padilla, F., Broders, F., Nicolet, M., Mege, R.M. 1998. Cadherins M, 11, and 6 expression patterns suggest complementary roles in mouse neuromuscular axis development. *Mol. Cell. Neurosci.* **11**, 217-233.
- Paffenholz, R., Franke, W.W. 1997. Identification and localization of a neurally expressed member of the plakoglobin/armadillo multigene family. *Differentiation* **61**, 293-304.
- Paffenholz, R., Kuhn, C., Grund, C., Stehr, S., Franke, W.W. 1999. The arm-repeat protein NPRAP (neurojungin) is a constituent of the plaques of the outer limiting zone in the retina, defining a novel type of adhering junction. *Exp. Cell Res.* **250**, 452-464.
- Pai, L.M., Kirkpatrick, C., Blanton, J., Oda, H., Takeichi, M., Peifer, M. 1996. Drosophila alpha-catenin and E-cadherin bind to distinct regions of Drosophila Armadillo. *J. Biol. Chem.* **271**, 32411-32420.
- Panicker, M.M., Rao, M. 2001. Stem cells and neurogenesis. **In:** Stem Cell Biology. (Marshak, D.R., Gardner, R.L., Gottlieb, D., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; pp. 399-438.
- Papaioannou, V.E. 2004. Early embryonic mesoderm development. **In:** Handbook of Stem Cells, Vol. 1. (Lanza, R., Gearhart, J., Hogan, B., Melton, D., Pedersen, R., Thomson, J., West, M., eds.) Elsevier Academic Press, Amsterdam; pp. 273-278.
- Parker, A.E., Wheeler, G.N., Arnemann, J., Pidsley, S.C., Ataliotis, P., Thomas, C.L., Rees, D.A., Magee, A.I., Buxton, R.S. 1991. Desmosomal glycoproteins II and III. Cadherin-like junctional molecules generated by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **266**, 10438-10445.
- Pasdar, M., Li, Z., Chlumecky, V. 1995. Plakoglobin: kinetics of synthesis, phosphorylation, stability, and interactions with desmoglein and E-cadherin. *Cell Motil. Cytoskeleton* **32**, 258-272.
- Payne, H.R., Hemperly, J.J., Lemmon, V. 1996. N-cadherin expression and function in cultured oligodendrocytes. *Brain. Res. Dev. Brain Res.* **97**, 9-15.
- 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**, 1167-1176.

- Peifer, M., Yap, A.S. 2003. Traffic control: p120-catenin acts as a gatekeeper to control the fate of classical cadherins in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **163**, 437-440.
- Peifer, M., McCrea, P.D., Green, K.J., Wieschaus, E., Gumbiner, B.M. 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**, 681-691.
- Peitsch, W.K., Grund, C., Kuhn, C., Schnölzer, M., Spring, H., Schmelz, M., Franke, W.W. 1999. Drebrin is a widespread actin-associating protein enriched at junctional plaques, defining a specific microfilament anchorage system in polar epithelial cells. *Eur. J. Cell Biol.* **78**, 767-778.
- Peitsch, W.K., Hofmann, I., Prätzel, S., Grund, C., Kuhn, C., Moll, I., Langbein, L., Franke, W.W. 2001. Drebrin particles: components in the ensemble of proteins regulating actin dynamics of lamellipodia and filopodia. *Eur. J. Cell Biol.* **80**, 567-579.
- Peitsch, W.K., Hofmann, I., Endlich, N., Prätzel, S., Kuhn, C., Spring, H., Gröne, H.J., Kriz, W., Franke, W.W. 2003. Cell biological and biochemical characterization of drebrin complexes in mesangial cells and podocytes of renal glomeruli. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 1452-1463.
- Pekny, M., Pekna, M. 2004. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J. Pathol.* **204**, 428-437.
- Perego, C., Vanoni, C., Massari, S., Longhi, R., Pietrini, G. 2000. The vertebrate LIN-7 PDZ protein associates with beta-catenin at the cell-cell junctions of epithelia and neurons. *EMBO J.* **19**, 3978-3989.
- Perego, C., Vanoni, C., Massari, S., Raimondi, A., Pola, S., Cattaneo, M.G., Francolini, M., Vicentini, L.M., Pietrini, G. 2002. Invasive behaviour of glioblastoma cell lines is associated with altered organisation of the cadherin-catenin adhesion system. *J. Cell Sci.* **115**, 3331-3340.
- Perez, T.D., Nelson, W.J. 2004. Cadherin adhesion: mechanisms and molecular interactions. In: Cell Adhesion. (Behrens, J., Nelson, W.J. eds.; *Handbook of Experimental Pharmacology* **165**) Springer-Verlag, Berlin; pp. 3-21.
- Perez-Moreno, M., Jamora, C., Fuchs, E. 2003. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* **112**, 535-548.
- Peters, A., Palay, S.L., Webster, H. deF. 1976. The Fine Structure of the Nervous System: The Neurons and Supporting Cells. W.B. Saunders Company, Philadelphia; 406 pp.
- Phelps, C.H. 1972. The development of glio-vascular relationships in the rat spinal cord. An electron microscopic study. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **128**, 555-563.
- Phinney, D.G. 2002. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **38**, 7-12.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147.
- Pochampally, R.R., Neville, B.T., Schwarz, E.J., Li, M.M., Prockop, D.J. 2004. Rat adult stem cells (marrow stromal cells) engraft and differentiate in chick embryos without evidence of cell fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 9282-9285.
- Pokutta, S., Weis, W.I. 2002. The cytoplasmic face of cell contact sites. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 255-262.
- Ponten, J., Macintyre, E.H. 1968. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **74**, 465-486.
- Prockop, D.J. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **276**, 71-74.
- Puch, S., Armeanu, S., Kibler, C., Johnson, K.R., Muller, C.A., Wheelock, M.J., Klein, G. 2001. N-cadherin is developmentally regulated and functionally involved in early hematopoietic cell differentiation. *J. Cell Sci.* **114**, 1567-1577.
- Punzel, M., Zhang, T., Liu, D., Eckstein, V., Ho, A.D. 2002. Functional analysis of initial cell divisions defines the subsequent fate of individual human CD34(+)CD38(-) cells. *Exp. Hematol.* **30**, 464-472.
- Punzel, M., Liu, D., Zhang, T., Eckstein, V., Miesala, K., Ho, A.D. 2003. The symmetry of initial divisions of human hematopoietic progenitors is altered only by the cellular microenvironment. *Exp. Hematol.* **31**, 339-347.

- Radice, G.L., Rayburn, H., Matsunami, H., Knudsen, K.A., Takeichi, M., Hynes, R.O. 1997. Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev. Biol.* **181**, 64-78.
- Raff, M. 2003. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 1-22.
- Rajasekaran, A.K., Hojo, M., Huima, T., Rodriguez-Boulan, E. 1996. Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. *J. Cell Biol.* **132**, 451-463.
- Rampon, C., Prandini, M.-H., Bouillot, S., Pointu, H., Tillet, E., Franke, R., Vernet, M., Huber, P. 2005. Protocadherin 12 (VE-cadherin 2) is expressed in endothelial, trophoblast, and mesangial cells. *Exp. Cell Res.* **302**, 48-60.
- Rapraeger, A.C. 2000. Syndecan-regulated receptor signaling. *J. Cell Biol.* **149**, 995-998.
- Reale, E., Luciano, L., Spitznas, M. 1975. Zonulae occludentes of the myelin lamellae in the nerve fibre layer of the retina and in the optic nerve of the rabbit: a demonstration by the freeze-fracture methods. *J. Neurocytol.* **4**, 131-140.
- Redies, C. 1997. Cadherins and the formation of neural circuitry in the vertebrate CNS. *Cell Tissue Res.* **290**, 405-413.
- Redies, C. 2000. Cadherins in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* **61**, 611-648.
- Redies, C., Takeichi, M. 1993a. Expression of N-cadherin mRNA during development of the mouse brain. *Dev. Dyn.* **197**, 26-39.
- Redies, C., Takeichi, M. 1993b. N- und R-cadherin expression in the optic nerve of the chicken embryo. *Glia* **8**, 161-171.
- Redies, C., Inuzuka, H., Takeichi, M. 1992. Restricted expression of N- and R-cadherin on neurites of the developing chicken CNS. *J. Neurosci.* **12**, 3525-3534.
- Redies, C., Engelhart, K., Takeichi, M. 1993a. Differential expression of N- and R-cadherin in functional neuronal systems and other structures of the developing chicken brain. *J. Comp. Neurol.* **333**, 398-416.
- Reid, R.A., Hemperly, J.J. 1990. Human N-cadherin: nucleotide and deduced amino acid sequence. *Nucleic Acids Res.* **18**, 5896.
- Reyes, M., Lund, T., Lenvik, T., Aguiar, D., Koodie, L., Verfaillie, C.M. 2001. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* **98**, 2615-2625.
- Reyes, M., Dudek, A., Jahagirdar, B., Koodie, L., Marker, P.H., Verfaillie, C.M. 2002. Origin of endothelial progenitors in human post-natal bone marrow. *J. Clin. Invest.* **109**, 337-346.
- Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 208-212.
- Reynolds, A.B., Herbert, L., Cleveland, J.L., Berg, S.T., Gaut, J.R. 1992. p120, a novel substrate of protein tyrosine kinase receptors and of p60v-src, is related to cadherin-binding factors beta-catenin, plakoglobin and armadillo. *Oncogene* **7**, 2439-2445.
- Reynolds, A.B., Daniel, J., McCreary, P.D., Wheelock, M.J., Wu, J., Zhang, Z. 1994. Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associated with E-cadherin complexes. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 8333-8342.
- Rood, P.M.L., Calafat, J., Von dem Borne, A.E.G.Kr., Gerritsen, W.R., van der Schoot, C.E. 2000. Immortalisation of human bone marrow endothelial cells: characterisation of new cell lines. *Eur. J. Clin. Invest.* **30**, 618-629.
- Roots, B.I. 1981. Comparative studies on glial markers. *J. Exp. Biol.* **95**, 167-180.
- Rose, O., Grund, C., Reinhardt, S., Starzinski-Powitz, A., Franke, W.W. 1995. Contactus adherens, a special type of plaque-bearing adhering junction containing M-cadherin, in the granule cell layer of the cerebellar glomerulus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6022-6026.
- Rubin, L.L., Hall, D.E., Porter, S., Barbu, K., Cannon, C., Horner, H.C., Janatpour, M., Liaw, C.W., Manning, K., Morales, J., Tanner, L.I., Tomaselli, K.J., Bard, F. 1991. A cell culture model of the blood-brain barrier. *J. Cell Biol.* **115**, 1725-1735.
- Ruhrberg, C., Watt, F.M. 1997. The plakin family: versatile organizers of cytoskeletal architecture. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 392-397.

- Ruhrberg, C., Hajibagheri, M.A., Parry, D.A., Watt, F.M. 1997. Periplakin, a novel component of cornified envelopes and desmosomes that belongs to the plakin family and forms complexes with envoplakin. *J. Cell Biol.* **139**, 1835-1849.
- Ruiz, P., Brinkmann, V., Ledermann, B., Behrend, M., Grund, C., Thalhammer, C., Vogel, F., Birchmeier, C., Günthert, U., Franke, W.W., Birchmeier, W. 1996. Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart. *J. Cell Biol.* **135**, 215-225.
- Ryan, J.W., Ryan, U.S., Habliston, D., Martin, L., Howell, D.S. 1978. Synthesis of prostaglandins by pulmonary endothelial cells. *Trans. Assoc. Am. Physicians* **91**, 343-350.
- Salomon, D., Ayalon, O., Patel-King, R., Hynes, R.O., Geiger, B. 1992. Extrajunctional distribution of N-cadherin in cultured human endothelial cells. *J. Cell Sci.* **102**, 7-17.
- Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T.B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., Cooper, D.R., Sanberg, P.R. 2000. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp. Neurol.* **164**, 247-256.
- Sanger, J.W., Sanger, J.M., Jockusch, B.M. 1983. Differences in the stress fibers between fibroblasts and epithelial cells. *J. Cell Biol.* **96**, 961-969.
- Saotome, I., Curto, M., McClatchey, A.I. 2004. Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine. *Dev. Cell* **6**, 855-864.
- Sarkar, S., Cowan, N.J. 1989. Regulation of expression of the gene encoding glial filament acidic protein. **In:** Cytoskeletal Proteins in Tumor Diagnosis. (Osborn, M., Weber, K., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor/NY; pp. 1-4.
- Schäfer, S., Troyanovsky, S.M., Heid, H.W., Eshkind, L.G., Koch, P.J., Franke, W.W. 1993. Cytoskeletal architecture and epithelial differentiation: Molecular determinants of cell interaction and cytoskeletal filament anchorage. *C. R. Acad. Sci. III, Sci. Vie* **316**, 1316-1323.
- Schäfer, S., Koch, P.J., Franke, W.W. 1994. Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Exp. Cell Res.* **211**, 391-399.
- Schäfer, S., Stumpp, S., Franke, W.W. 1996. Immunological identification and characterization of the desmosomal cadherin Dsg2 in coupled and uncoupled epithelial cells and in human tissues. *Differentiation* **60**, 99-108.
- Schlüter, H., Wepf, R., Moll, I., Franke, W.W. 2004. Sealing the live part of the skin: The integrated meshwork of desmosomes, tight junctions and curvilinear ridge structures in the cells of the uppermost granular layer of the human epidermis. *Eur. J. Cell Biol.* **83**, 655-665.
- Schmelz, M., Franke, W.W. 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**, 274-289.
- Schmelz, M., Moll, R., Kuhn, C., Franke, W.W. 1994. Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: II. Different types of lymphatic vessels. *Differentiation* **57**, 97-117.
- Schmelz, M., Way, D.L., Borgs, P., Peitsch, W.K., Schmidt, H., Witte, M.H., Witte, C.L., Franke, W.W., Moll, R. 1998. A novel type of adhering junction in an epithelioid tumorigenic rat cell culture line. *Cell Tissue Res.* **294**, 11-25.
- Schmidt, A., Jäger, S. 2005. Plakophilins - hard work in the desmosome, recreation in the nucleus? *Eur. J. Cell Biol.* **84**, 189-204.
- Schmidt, A., Heid, H.W., Schäfer, S., Nuber, U.A., Zimbelmann, R., Franke, W.W. 1994. Desmosomes and cytoskeletal architecture in epithelial differentiation: cell type-specific plaque components and intermediate filament anchorage. *Eur. J. Cell Biol.* **65**, 229-245.
- Schmidt, A., Langbein, L., Rode, M., Prätzel, S., Zimbelmann, R., Franke, W.W. 1997. Plakophilins 1a and 1b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. *Cell Tissue Res.* **290**, 481-499.
- Schmidt, A., Langbein, L., Prätzel, S., Rode, M., Rackwitz, H.R., Franke, W.W. 1999. Plakophilin 3--a novel cell-type-specific desmosomal plaque protein. *Differentiation* **64**, 291-306.
- Schmitt-Graff, A., Skalli, O., Gabbiani, G. 1989. Alpha-smooth muscle actin is expressed in a subset of bone marrow stromal cells in normal and pathological conditions. *Virchows Arch., B, Cell Pathol.* **57**, 291-302.

- Schnitzer, J., Franke, W.W., Schachner, M. 1981. Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J. Cell Biol.* **90**, 435-447.
- Schröder, R., van der Ven, P.F., Warlo, I., Schumann, H., Fürst, D.O., Blümcke, I., Schmidt, M.C., Hatzfeld, M. 2000. p0071, a member of the armadillo multigene family, is a constituent of sarcomeric I-bands in human skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **21**, 577-586.
- Schulz, S. 1999. Molekularbiologische Untersuchung von E-Cadherin und Cadherin-11 an Wilms-Tumoren. Dissertation an der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München; ISBN 3-89791-016-0.
- Schulze, C., Firth, J.A. 1993. Immunohistochemical localization of adherens junction components in blood-brain barrier microvessels of the rat. *J. Cell Sci.* **104**, 773-782.
- Schwarz, M.A., Owaribe, K., Kartenbeck, J., Franke, W.W. 1990. Desmosomes and hemidesmosomes: constitutive molecular components. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 461-491.
- Schwechheimer, K. 1990. Pathologie des Nervensystems IV. Spezielle Immunmorphologie neurogener Geschwülste (*Spezielle pathologische Anatomie*, **Bd. 13/IV**; Doerr, W., Seifert, G., eds.). Springer-Verlag, Berlin; 305 pp.
- Shapiro, L., Fannon, A.M., Kwong, P.D., Thompson, A., Lehmann, M.S., Grübel, G., Legrand, J-F., Als-Nielsen, J., Colman, D.R. Hendrickson, W.A. 1995. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* **374**, 327-337.
- Shevde, N., Anklesaria, P., Greenberger, J.S., Blieberg, I., Glowacki, J. 1994. Stromal cell-mediated stimulation of osteoclastogenesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **205**, 306-315.
- Shibamoto, S., Hayakawa, M., Takeuchi, K., Hori, T., Miyazawa, K., Kitamura, N., Johnson, K.R., Wheelock, M.J., Matsuyoshi, N., Takeichi, M. 1995. Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes. *J. Cell Biol.* **128**, 949-957.
- Shibata, T., Ochiai, A., Gotoh, M., Machinami, R., Hirohashi, S. 1996. Simultaneous expression of cadherin-11 in signet-ring cell carcinoma and stromal cells of diffuse-type gastric cancer. *Cancer Lett.* **99**, 147-153.
- Shin, C.S., Lecanda, F., Sheikh, S., Weitzmann, L., Cheng, S.-L., Civitelli, R. 2000. Relative abundance of different cadherins defines differentiation of mesenchymal precursors into osteogenic, myogenic, or adipogenic pathways. *J. Cell. Biochem.* **78**, 566-577.
- Shinoura, N., Paradies, N.E., Warnick, R.E., Chen, H., Larson, J.J., Tew, J.J., Simon, M., Lynch, R.A., Kanai, Y., Hirohashi, S., Hemperly, J.J., Menon, A.G., Brackenbury, R. 1995. Expression of N-cadherin and α -catenin in astrocytomas and glioblastomas. *Br. J. Cancer* **72**, 627-633.
- Shur, I., Marom, R., Lokiec, F., Socher, R., Benayahu, D. 2002. Identification of cultured progenitor cells from human marrow stroma. *J. Cell Biochem.* **87**, 51-57.
- Simon, A.M., Goodenough, D.A. 1998. Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol.* **8**, 477-483.
- Simonneau, L., Thiery, J.P. 1998. The mesenchymal cadherin-11 is expressed in restricted sites during the ontogeny of the rat brain in modes suggesting novel functions. *Cell Adhes. Commun.* **6**, 431-450.
- Simonneau, L., Kitagawa, M., Suzuki, S., Thiery, J.P. 1995. Cadherin 11 expression marks the mesenchymal phenotype: towards new functions for cadherins? *Cell Adhes. Commun.* **3**, 115-130.
- Singh, D., Lampe, P.D. 2003. Identification of connexin-43 interacting proteins. *Cell Commun. Adhes.* **10**, 215-220.
- Smith, A.G. 2001. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 435-462.
- Soler, A.P., Knudsen, K.A. 1994. N-cadherin involvement in cardiac myocyte interaction and myofibrillogenesis. *Dev. Biol.* **162**, 9-17.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M. 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**, 1409-1416.
- Spees, J.L., Olson, S.D., Ylostalo, J., Lynch, P.J., Smith, J., Perry, A., Peister, A., Wang, M.Y., Prockop, D.J. 2003. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during *ex vivo* repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 2397-2402.

- Stachelin, L.A. 1974. Structure and function of intercellular junctions. *Int. Rev. Cytol.* **39**, 191-283.
- Stein, G.H. 1979. T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro. *J. Cell. Physiol.* **99**, 43-54.
- Steinberg, M.S. 1958. On the chemical bonds between animal cells. A mechanism for type-specific association. *Am. Nat.* **92**, 65-82.
- Steinberg, M.S. 1962a. The nature and origin of "ECM", a putative mediator of mutual cell adhesions. *Am. Zool.* **2**, 561-562.
- Steinberg, M.S. 1962b. On the mechanism of tissue reconstruction by dissociated cells. I. Population kinetics, differential adhesiveness, and the absence of directed migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1769-1776.
- Steinberg, M.S. 1962c. Mechanism of tissue reconstruction by dissociated cells. II. Time course of events. *Science* **137**, 762-763.
- Steinberg, M.S. 1962d. On the mechanism of tissue reconstruction by dissociated cells. III. Free energy relations and the reorganization of fused heteronomic tissue fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1769-1776.
- Steinberg, M.S. 1963a. "ECM": Its nature, origin and function in cell aggregation. *Exp. Cell Res.* **30**, 257-279.
- Steinberg, M.S. 1963b. Reconstruction of tissues by dissociated cells. *Science* **141**, 401-408.
- Steinberg, M.S. 1964. The problem of adhesive selectivity in cellular interactions. **In:** Cellular Membranes in Development. (Locke, M., ed.) Academic Press, New York; pp. 321-366.
- Steinberg, M.S. 1970. Does differential adhesion govern self-assembly processes in histogenesis? Equilibrium configurations and the emergence of a hierarchy among populations of embryonic cells. *J. Exp. Zool.* **173**, 395-434.
- Steinberg, M.S. 1978. Cell-cell recognition in multicellular assembly: levels of specificity. **In:** Cell-Cell Recognition. (Curtis, A.S.G., ed.; *Symp. Soc. Exp. Biol.* **32**). Cambridge University Press, Cambridge; pp. 25-49.
- Steinberg, M.S. (1996) Adhesion in development: an historical overview. *Review. Dev. Biol.* **180**, 377-388.
- Steinberg, M.S., Takeichi, M. 1994. Experimental specification of cell sorting, tissue spreading, and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 206-209.
- Steinberg, M.S., McNutt, P.M. 1999. Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 554-560.
- Stevenson, B.R., Keon, B.H. 1998. The tight junction: morphology to molecules. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 89-109.
- Stevenson, B.R., Siliciano, J.D., Mooseker, M.S., Goodenough, D.A. 1986. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J. Cell Biol.* **103**, 755-766.
- Straub, B.K., Boda, J., Kuhn, C., Schnoelzer, M., Korf, U., Kempf, T., Spring, H., Hatzfeld, M., Franke, W.W. 2003. A novel cell-cell junction system: the cortex adhaerens mosaic of lens fiber cells. *J. Cell Sci.* **116**, 4985-4995.
- Suzuki, S. 1996. Structural and functional diversity of cadherin superfamily: Are new members of cadherin superfamily involved in signal transduction pathway? *J. Cell. Biochem.* **61**, 531-542.
- Sztalryd, C., Xu, G., Dorward, H., Tansey, J.T., Contreras, J.A., Kimmel, A.R., Londos, C. 2003. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J. Cell Biol.* **161**, 1093-1103.
- Tachibana, K., Nakanishi, H., Mandai, K., Ozaki, K., Ikeda, W., Yamamoto, Y., Nagafuchi, A., Tsukita, S., Takai, Y. 2000. Two cell adhesion molecules, nectin and cadherin, interact through their cytoplasmic domain-associated proteins. *J. Cell Biol.* **150**, 1161-1175.
- Takahashi, K., Nakanishi, H., Miyahara, M., Mandai, K., Satoh, K., Satoh, A., Nishioka, H., Aoki, J., Nomoto, A., Mizoguchi, A., Takai, Y. 1999. Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein. *J. Cell Biol.* **145**, 539-549.
- Takai, Y., Nakanishi, H. 2003. Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J. Cell Sci.* **116**, 17-27.

- Takeichi, M. 1977. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J. Cell Biol.* **75**, 464-474.
- Takeichi, M. 1988. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* **102**, 639-655.
- Takeichi, M. 1990. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 237-252.
- Takeichi, M. 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* **251**, 1451-1455.
- Takeichi, M. 1993. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 806-811.
- Takeichi, M. 1995. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 619-627.
- Takeichi, M., Abe, K. 2005. Synaptic contact dynamics controlled by cadherin and catenins. *Trends Cell Biol.* **15**, 216-221.
- Takeichi, M., Shirayoshi, Y., Hatta, K., Nose, A. 1986. Cadherins: their morphogenetic role in animal development. **In:** Progress in Developmental Biology, Part B. (Slavkin, H.C., ed.) Alan R. Liss, Inc., New York; pp. 17-27.
- Takeuchi, T., Misaki, A., Liang, S.B., Tachibana, A., Hayashi, N., Sonobe, H., Ohtsuki, Y. 2000. Expression of T-cadherin (CDH13, H-Cadherin) in human brain and its characteristics as a negative growth regulator of epidermal growth factor in neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* **74**, 1489-1497.
- Takeuchi, T., Misaki, A., Fujita, J., Sonobe, H., Ohtsuki, Y. 2001. T-cadherin (CDH13, H-cadherin) expression downregulated surfactant protein D in bronchioloalveolar cells. *Virchows Arch.* **438**, 370-375.
- Tam, P.P.L., Beddington, R.S.P. 1987. The formation of mesodermal tissues in the mouse embryo during gastrulation and early organogenesis. *Development* **99**, 109-126.
- Tam, P.P.L., Williams, E.A., Chan, W.Y. 1993. Gastrulation in the mouse embryo: ultrastructural and molecular aspects of germ layer morphogenesis. *Microsc. Res. Tech.* **26**, 301-328.
- Tamura, A., Kikuchi, S., Hata, M., Katsuno, T., Matsui, T., Hayashi, H., S., Yuichi, Noda, T., Tsukita, Sh., Tsukita, Sa. 2005. Achlorhydria by ezrin knockdown: defects in the formation/expansion of apical analiculi in gastric parietal cells. *J. Cell Biol.* **169**, 21-28.
- Tanaka, Y., Nakanishi, H., Kakunaga, S., Okabe, N., Kawakatsu, T., Shimizu, K., Takai, Y. 2003. Role of nectin in formation of E-cadherin-based adherens junctions in kertyocytes: Analysis with the N-cadherin dominant negative mutant. *Mol. Biol. Cell* **14**, 1597-1609.
- Tani, E., Maeda, Y., Natsume, S., Ito, Y. 1977. Membrane structures of human oligodendrogloma. *Acta Neuropathol.* **38**, 11-19.
- Tavella, S., Raffo, P., Tacchetti, C., Cancedda, R., Castagnola, P. 1994. N-CAM and N-cadherin expression during in vitro chondrogenesis. *Exp. Cell Res.* **215**, 354-362.
- Telo, P., Breviario, F., Huber, P., Panzeri, C., Djana, E. 1998. Identification of a novel cadherin (vascular endothelial cadherin-2) located at intercellular junctions in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 17565-17572.
- Tepass, U. 2002. Adherens junctions: new insight into assembly, modulation and function. *Bioessays* **24**, 690-695.
- Tepass, U., Truong, K., Godt, D., Ikura, M., Peifer, M. 2000. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 91-100.
- Tocci, A., Forte, L. 2003. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *Hematol. J.* **4**, 92-96.
- Togashi, H., Abe, K., Mizoguchi, A., Takaoka, K., Chisaka, O., Takeichi, M. 2002. Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron* **35**, 77-89.
- Tomaselli, K.J., Neugebauer, K.M., Bixby, J.L., Lilien, J., Reichardt, L.F. 1988. N-cadherin and integrins: two receptor systems that mediate neuronal process outgrowth on astrocyte surfaces. *Neuron* **1**, 33-43.
- Toyofuku, T., Yabuki, M., Otsu, K., Kuzuya, T., Hori, M., Tada, M. 1998. Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **273**, 12725-12731.

- Toyofuku, T., Akamatsu, Y., Zhang, H., Kuzuya, T., Tada, M., Hori, M. 2001. c-Src regulates the interaction between connexin-43 and ZO-1 in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **276**, 1780-1788.
- Treherne, J.E. (Ed.) 1981. Glial-Neurone Interactions (*J. Exp. Biol.*, Vol. **95**). Cambridge University Press, Cambridge; 240 pp.
- Trinkaus, J.P., Groves, P.W. 1955. Differentiation in culture of mixed aggregates of dissociated tissue cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **41**, 787-795.
- Trojanowski, J.Q. 1989. Neurofilament proteins and neuroectodermal brain tumors. **In:** Cytoskeletal Proteins in Tumor Diagnosis. (Osborn, M., Weber, K., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor/NY; pp. 11-18.
- Troyanovsky, S.M., Eshkind, L.G., Troyanovsky, R.B., Leube, R.E., Franke, W.W. 1993. Contributions of cytoplasmic domains of desmosomal cadherins to desmosome assembly and intermediate filament anchorage. *Cell* **72**, 561-574.
- Troyanovsky, S.M., Troyanovsky, R.B., Eshkind, L.G., Krutovskikh, V.A., Leube, R.E., Franke, W.W. 1994. Identification of the plakoglobin-binding domain in desmoglein and its role in plaque assembly and intermediate filament anchorage. *J. Cell Biol.* **127**, 151-160.
- Tsukita, S., Furuse, M. 2000. Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J. Cell Biol.* **149**, 13-16.
- Tsukita, Sh., Tsukita, Sa., Nagafuchi, A., Yonemura, S. 1992. Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 834-839.
- Tsukita, Sa., Yonemura, S., Tsukita, Sh. 1997. ERM proteins: head-to-tail regulation of actin-plasma membrane interaction. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 53-58.
- Tsukita, S., Furuse, M., Itoh, M. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 285-293.
- Tsutsui, J.-i., Moriyama, M., Arima, N., Ohtsubo, H., Tanaka, H., Ozawa, M. 1996. Expression of cadherin-catenin complexes in human leukemia cell lines. *J. Biochem.* **120**, 1034-1039.
- Tuli, R., Tuli, S., Nandi, S., Huang, X., Manner, P.A., Hozack, W.J., Danielson, K.G., Hall, D.J., Tuan, R.S. 2003. Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J. Biol. Chem.* **278**, 41227-41236.
- Vaheri, A., Carpen, O., Heiska, L., Helander, T.S., Jaaskelainen, J., Majander-Nordenswan, P., Sainio, M., Timonen, T., Turunen, O. 1997. The ezrin protein family: membrane-cytoskeleton interactions and disease associations. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 659-666.
- van Buul, J.D., Voermans, C., van den Berg, V., Anthony, E.C., Mul, F.P.J., van Wetering, S., van der Schoot, C.E., Hordijk, P.L. 2002. Migration of human hematopoietic progenitor cells across bone marrow endothelium is regulated by vascular endothelial cadherin. *J. Immunol.* **168**, 588-596.
- Van Hoorde, L., Braet, K., Mareel, M. 1999. The N-cadherin/catenin complex in colon fibroblasts and myofibroblasts. *Cell Adhes. Commun.* **7**, 139-150.
- Vasioukhin, V., Fuchs, E. 2001. Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 76-84.
- Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M., Fuchs, E. 2000. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* **100**, 209-219.
- Vázquez-Chona, F., Geisert Jr., E.E. 1999. N-cadherin at the glial scar in the rat. *Brain Res.* **838**, 45-50.
- Verfaillie, C.M. 2002. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol.* **12**, 502-508.
- Verfaillie, C.M., Pera, M.F., Lansdorp, P.M. 2002. Stem cells: hype and reality. Review. *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.)* 369-391.
- Verfaillie, C.M., Schwartz, R., Reyes, M., Jiang, Y. 2003. Unexpected potential of adult stem cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **996**, 231-234.
- Vestweber, D., Kemler, R. 1984. Some structural and functional aspects of the cell adhesion molecule uvomorulin. *Cell Differ.* **15**, 269-273.

- Vittet, D., Buchou, T., Schweitzer, A., Dejana, E., Huber, P. 1997. Targeted null-mutation in the *vascular endothelial-cadherin* gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6273-6278.
- Volk, T., Geiger, B. 1986a. A-CAM: a 135-kD receptor of intercellular adherens junctions. I. Immunoelectron microscopic localization and biochemical studies. *J. Cell Biol.* **103**, 1441-1450.
- Volk, T., Geiger, B. 1986b. A-CAM: a 135-kD receptor of intercellular adherens junctions. II. Antibody-mediated modulation of junction formation. *J. Cell Biol.* **103**, 1451-1464. .
- Volk, T., Cohen, O., Geiger, B. 1997. Formation of heterotypic adherens-type junctions between L-CAM-containing liver cells and A-CAM-containing lens cells. *Cell* **50**, 987-994.
- Vorbach, C., Scriven, A., Capecchi, M.R. 2002. The housekeeping gene xanthine oxidoreductase is necessary for milk fat droplet enveloping and secretion: gene sharing in the lactating mammary gland. *Genes Dev.* **16**, 3223-3235.
- Vorbrodt, A.W., Dobrogowska, D.H. 2004. Molecular anatomy of interendothelial junctions in human blood-brain barrier microvessels. *Folia Histochem. Cytobiol.* **42**, 67-75.
- Wagers, A.J., Weissman, I.L. 2004. Plasticity of adult stem cells. *Cell* **116**, 639-648.
- Waibler, Z., Schäfer, A., Starzinski-Powitz, A. 2001. mARVCF cellular localisation and binding to cadherins is influenced by the cellular context but not by alternative splicing. *J. Cell Sci.* **114**, 3873-3884.
- Weber, K., Osborn, M. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.
- Weiss, E.E., Kroemker, M., Rudiger, A.H., Jockusch, B.M., Rüdiger, M. 1998. Vinculin is part of the cadherin-catenin junctional complex: complex formation between alpha-catenin and vinculin. *J. Cell Biol.* **141**, 755-764.
- Weiss, L., Greep, R.O. 1977. Histology. 4 edn. McGraw-Hill, New York; 1209 pp.
- Weiss, S.W., Goldblum, J. 2001. Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors. 4. edn. Mosby, St. Louis; 1622 pp.
- Wessel, D., Flügge, U.I. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **138**, 141-143.
- Wexler, S.A., Donaldson, C., Denning-Kendall, P., Rice, C., Bradley, B., Hows, J.M. 2003. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br. J. Haematol.* **121**, 368-374.
- Wheelock, M.J., Johnson, K.R. 2003. Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 207-235.
- Widelitz, R.B., Jiang, T.X., Murray, B.A., Chuong, C.M. 1993. Adhesion molecules in skeletogenesis: II. Neural cell adhesion molecules mediate precartilaginous mesenchymal condensations and enhance chondrogenesis. *J. Cell. Physiol.* **156**, 399-411.
- Wilkins, B.S., Jones, D.B. 1995. Immunohistochemical characterization of intact stromal layers in long-term cultures of human bone marrow. *Br. J. Haematol.* **90**, 757-766.
- Winder, S.J., Ayscough, K.R. 2005. Actin-binding proteins. *J. Cell Sci.* **118**, 651-654.
- Wolburg, H., Lippoldt, A. 2002. Tight junctions of the blood-brain barrier: Development, composition and regulation. *Vasc. Pharmacol.* **38**, 323-337.
- Wolburg, H., Neuhaus, J., Kniesel, U., Krauß, B., Schmid, E.-M., Öcalan, M., Farrell, C., Risau, W. 1994. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. *J. Cell Sci.* **107**, 1347-1357.
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Kraus, J., Rascher-Eggstein, G., Liebner, S., Hamm, S., Duffner, F., Grote, E.H., Risau, W., Engelhardt, B. 2003. Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol.* **105**, 586-592.
- Wulf, E., Deboben, A., Bautz, F.A., Faulstich, H., Wieland, T. 1979. Fluorescent phalloxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4498-4502.

- Xu, W., Baribault, H., Adamson, E.D. 1998. Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development. *Development* **125**, 327-337.
- Xu, X., Li, W.E., Huang, G.Y., Meyer, R., Chen, T., Luo, Y., Thomas, M.P., Radice, G.L., Lo, C.W. 2001. Modulation of mouse neural crest cell motility by N-cadherin and connexin 43 gap junctions. *J. Cell Biol.* **154**, 217-230.
- Yajima, H., Yonei-Tamura, S., Watanabe, N., Tamura, K., Ide, H. 1999. Role of N-cadherin in the sorting-out of mesenchymal cells and in the positional identity along the proximodistal axis of the chick limb bud. *Dev. Dyn.* **216**, 274-284.
- Yamamoto, T., Harada, N., Kano, K., Taya, S.-i., Canaani, E., Matsuura, Y., Mizoguchi, A., Ide, C., Kaibuchi, K. 1997. The Ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of tight junctions in epithelial cells. *J. Cell Biol.* **139**, 785-795.
- Yap, C.T., Simpson, T.I., Pratt, T., Price, D.J., Maciver, S.K. 2005. The motility of glioblastoma tumour cells is modulated by intracellular cofilin expression in a concentration-dependent manner. *Cell Motil. Cytoskeleton* **60**, 153-165.
- Ye, B., Jan, Y.N. 2005. The cadherin superfamily and dendrite development. *Trends Cell Biol.* **15**, 64-67.
- Yin, T., Getsios, S., Caldelari, R., Kowalczyk, A.P., Müller, E.J., Jones, J.C.R., Green, K.J. 2005. Plakoglobin suppresses keratinocyte motility through both cell-cell adhesion-dependent and -independent mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 5420-5425.
- Yokoyama, K., Mori, H., Kurokawa, M., 1981. Astroglial filament and fibroblast intermediate filament proteins in cytoskeletal preparations from spinal cord and optic nerve. *FEBS Lett.* **135**, 25-30.
- Yokoyama, S., Tachibana, K., Nakanishi, H., Yamamoto, Y., Irie, K., Mandai, K., Nagafuchi, A., Monden, M., Takai, Y. 2001. alpha-Catenin-independent recruitment of ZO-1 to nectin-based cell-cell adhesion sites through afadin. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1595-1609.
- Yonemura, S., Itoh, M., Nagafuchi, A., Tsukita, S. 1995. Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells. *J. Cell Sci.* **108**, 127-142.
- Yoo, J.U., Barthel, T.S., Nishimura, K., Solchaga, L., Caplan, A.I., Goldberg, V.M., Johnstone, B. 1998. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J. Bone Joint Surg. Am.* **80**, 1745-1757.
- Youn, Y.-H., Hong, J., Burke, J.M. 2005. Endogenous N-cadherin in a subpopulation of MDCK cells: distribution and catenin complex composition. *Exp. Cell Res.* **303**, 275-286.
- Zenker, W. 1994. Feinstruktur des Nervengewebes. **In:** Benninghoff Anatomie (15. edn.), Bd. 2. (Drenckhahn, D., Zenker, W., eds.) Urban & Schwarzenberg, München; pp. 220-266.
- Zhou, S., Matsuyoshi, N., Liang, S.B., Takeuchi, T., Ohtsuki, Y., Miyachi, Y. 2002. Expression of T-cadherin in Basal keratinocytes of skin. *J. Invest. Dermatol.* **118**, 1080-1084.
- Zhou, X., Stuart, A., Dettin, L.E., Rodriguez, G., Hoel, B., Gallicano, G.I. 2004. Desmoplakin is required for microvascular tube formation in culture. *J. Cell Sci.* **117**, 3129-3140.
- Zhu, D., Caveney, S., Kidder, G.M., Naus, C.C. 1991. Transfection of C6 glioma cells with connexin 43 cDNA: analysis of expression, intercellular coupling, and cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1883-1887.
- Zimmermann, P., Tomatis, D., Rosas, M., Grootjans, J., Leenaerts, I., Degeest, G., Reekmans, G., Coomans, C., David, G. 2001. Characterization of syntenin, a syndecan-binding PDZ protein, as a component of cell adhesion sites and microfilaments. *Mol. Biol. Cell* **12**, 339-35

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Bensheim, den 17.08.2005

Dr. med. (Univ. Debrecen) Judit Boda-Heggemann
