

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Universität Würzburg  
Lehrstuhl für Anatomie II  
Vorstand: Professor Dr. med. D. Drenckhahn

Einfluß der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und des Aktinfilamentsystems  
auf die homophile Interaktion von VE-Cadherin  
untersucht mit Hilfe der Laserpinzetten-Technik

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Johannes Tobias Martin Wiegand  
aus Marburg

Würzburg, April 2002

Referent: Prof. Dr. med. D. Drenckhahn

Korreferent: Prof. Dr. med. P. Kugler

Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 03. Juli 2002

Der Promovend ist Arzt im Praktikum

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Zum Untersuchungsgegenstand	1
1.2	Der VE-Cadherin-Catenin-Komplex	2
1.3	Beteiligung des VE-Cadherin-Catenin-Komplexes an biologischen Prozessen	4
1.4	Einflußfaktoren auf die durch VE-Cadherin vermittelte Zelladhäsion	9
1.5	Fragestellung der Arbeit	10
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1	VE-Cadherin-Fc-Fusionsprotein	12
2.2	Aufreinigung des VE-Cadherin-Fc-Fusionsproteins	12
2.3	Proteinbestimmungsverfahren	13
2.3.1	Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	13
2.3.2	Amidoschwarz-Proteinbestimmung	14
2.4	Charakterisierung des VE-Cadherin-Fc-Fusionsproteins	15
2.4.1	Herstellung des VE-Cadherin-Fc-Monomers	15
2.4.2	Polyacrylamidgelelektrophorese mit Natriumdodecylsulfat (SDS-PAGE)	16
2.4.3	Western Blot (Immunreplikanalyse)	16
2.4.3.1	Proteintransfer	17
2.4.3.2	Immundetektion	17
2.4.3.3	Nachweis mit einer Chemoluminiszenzmethode	18
2.5	Beschichtung von Latex-Mikroperlen	19
2.6	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	20
2.7	Untersuchung des Bindungsverhaltens von mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen auf Maus-Endothelzellen mit einer Laserpinzette	21
2.7.1	Kultivierung von Endothelzellen aus dem Myokard der Maus	21
2.7.2	Gelatinieren von Deckgläschen	21

2.7.3	Aufbau der Laserpinzette	22
2.7.4	Untersuchung des Bindungsverhaltens unter verschiedenen Versuchsbedingungen	24
2.7.4.1	Bindungsverhalten unter dem Einfluß von monoklonalem VE-Cadherin- Antikörper (Hybridoma-Überstand)	24
2.7.4.2	Bindungsverhalten unter dem Einfluß der extrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentration	24
2.7.4.3	Bindungsverhalten unter dem Einfluß von Cytochalasin B und Cytochlasin D	25
2.7.4.4	Bindungsverhalten unter dem Einfluß des $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors A 23187	25
2.8	Fluoreszenzmikroskopie	25
2.9	Bestimmung des F-Aktin-Gehalts von Endothelzellen	27
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>29</b>
3.1	Reinigung, biochemische Charakterisierung und Kopplung des VE-Cadherin-Fc-Fusionsproteins	29
3.2	Nachweis der spezifischen VE-Cadherin-Interaktion	31
3.3	Bindungsverhalten von mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen an Endothelzellen	32
3.3.1	Einfluß der extrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration	32
3.3.2	Einfluß von Cytochalasin B und Cytochalasin D	34
3.3.3	Einfluß der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration	34
3.4	Fluoreszenzmikroskopie	36
3.5	Quantifizierung des F-Aktin-Gehalts von Endothelzellen	38
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>40</b>
4.1	Charakterisierung des VE-Cadherin-Fc-Fusionsproteins	40
4.2	Latex-Mikroperlen binden spezifisch über VE-Cadherin an Endothelzellen	41
4.3	Direkte Abhängigkeit der VE-Cadherin-Interaktion von der extra- zellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration	42

4.4	Direkter Einfluß des Aktinfilamentsystems auf die VE-Cadherin- Interaktion	45
4.5	Ausblick	49
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>52</b>

**Danksagung, Lebenslauf**

## Abkürzungen

Ala	Alanin
APC	Adenomatosis Polyposis Coli
BSA	Rinderserumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHO-Zellen	Chinese Hamster Ovary Cells
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagele´s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EC	Extrazellulär
ECL	verstärkte Chemoluminiszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-Aminomethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
F-Aktin	filamentäres Aktin
FCS	Fetales Rinderserum
G-Aktin	globuläres Aktin
HAV	Histidin-Alanin-Valin
HBSS	Hank´s gepufferte Salzlösung
HUVEC	humane Umbilikalvenen-Endothelzellen
Ig	Immunglobulin
KDa	Kilodalton
MEM	Minimal Essential Medium
MG	Molekulargewicht
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
N-Cadherin	neurales Cadherin
NPG	N-Propyl-Gallat
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

POX	Peroxidase
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Polyacryamidgelelektrophorese mit Natriumdodecylsulfat
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
VE-Cadherin	vaskulär-endotheliales Cadherin

## **1 Einleitung**

### **1.1 Zum Untersuchungsgegenstand**

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluß der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und des Aktinfilamentsystems auf VE-Cadherin-vermittelte Interzellularkontakte von Endothelzellen der Blutgefäße untersucht werden.

Die Gefäße des Blutkreislaufes sind auf der Innenseite mit Endothelzellen ausgekleidet. Das Endothel bildet die entscheidende zelluläre Barriere zwischen dem Blut und dem Interstitium des umgebenden Gewebes. Es reguliert den Austausch von Ionen, Metaboliten, Makromolekülen und Leukozyten zwischen beiden Kompartimenten. Die Barriereigenschaften des Endothels werden durch Verschuß- und Adhärenskontakte vermittelt (Dejana et al., 1995; Drenckhahn und Ness, 1997). Sie gehören zu den Interzellularkontakten, die überwiegend mechanische Funktionen haben. Dabei ermöglichen sie ein festes Haften zwischen benachbarten Zellen, das den hydrodynamischen Kräften des Blutstroms widerstehen kann. Die Adhärenskontakte der Endothelzellen enthalten das Adhäsionsmolekül VE-Cadherin (vaskulär-endotheliales Cadherin). Es ist ein transmembranäres Protein, dessen cytoplasmatische Domäne über verschiedene cytoplasmatische Proteine (sogenannte Catenine) mit dem Aktin-Cytoskelett der Endothelzellen verbunden ist (Dejana, 1996; Lampugnani und Dejana, 1997; Dejana et al., 1999). Dabei ist die Verbindung der Adhärenskontakte zum Aktinfilamentsystem eine wesentliche Voraussetzung für den Erhalt der Barrierenfunktion (Drenckhahn und Ness, 1997). Die Adhärenskontakte können geöffnet und verschlossen werden. Die extrazellulären Einflußfaktoren und intrazellulären Signalwege, durch die die Adhärenskontakte reguliert werden, sind noch nicht vollständig bekannt. Um ihre Wirkungszusammenhänge weiter aufzuklären, soll zunächst der VE-Cadherin-Catenin-Komplex (s. 1.2) charakterisiert und seine Beteiligung an biologischen Prozessen (s. 1.3) sowie Einflußfaktoren auf die durch VE-Cadherin vermittelte Zelladhäsion (s. 1.4) dargestellt werden. Daraus ergibt sich die Fragestellung dieser Arbeit (s. 1.5).

## 1.2 Der VE-Cadherin-Catenin-Komplex

Cadherine sind eine Gruppe von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Zelladhäsionsmolekülen (CAM), die nur in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  untereinander haften können. Sie gehen dabei überwiegend homophile Bindungen ein (Benninghoff, 1994). Ein Vertreter der Cadherine ist VE-Cadherin.

VE-Cadherin (=Cadherin-5) wurde von Heimark et al. (1990), Suzuki et al. (1991) und von Lampugnani et al. (1992) beschrieben: Es ist ein transmembranäres Glykoprotein und gehört zu den Typ II Cadherinen (Aberle et al., 1996). Zusammen mit Cadherinen von Epithelzellen (E), Plazenta (P) und Muskelfasern (M) wird VE-Cadherin bei der Maus auf Chromosom 8 codiert (Huber et al., 1996). E-, P- und M-Cadherine kommen in verschiedenen Geweben vor, während VE-Cadherin ausschließlich auf Endothelzellen beschränkt ist. Endothelzellen besitzen neben VE-Cadherin auch neurales Cadherin (N-Cadherin). N-Cadherin ist diffus an der Zelloberfläche verteilt und trägt zur Bindung von Endothelzellen an andere N-Cadherin exprimierende Zellen bei (glatte Muskelzellen, Astrocyten, Pericyten). VE-Cadherin reichert sich dagegen an Zell-Zell-Kontakten benachbarter Endothelzellen an (Lampugnani und Dejana, 1997). Die extrazelluläre (N-terminale) Domäne von VE-Cadherin besteht aus fünf repetitiven Einheiten (EC1 bis EC5) von je 110 Aminosäuren, die den homophilen Kontakt zwischen benachbarten Endothelzellen vermitteln (Lampugnani et al., 1992; Breviario et al., 1995).

Pertz et al. (1999) konnten durch elektronenmikroskopische Versuche an E-Cadherin zeigen, daß die Untereinheiten der Cadherine strukturelle Ähnlichkeiten mit Adhäsionsmolekülen aus der Immunglobulin-Gruppe haben und über vier verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen miteinander verbunden sind. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen haben dabei unterschiedliche Affinitäten und sind wesentlich an der Ausbildung der räumlichen Struktur der Cadherine beteiligt. Bei einer extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $< 0,5 \text{ mM}$  binden je zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an den Bindungsstellen zwischen den Domänen 2/3, 3/4, und 4/5, so daß Cadherin-Monomere eine Stäbchen-artige Struktur ausbilden.

Die Bindungsstelle zwischen den Domänen 1 und 2 kann drei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden und unterscheidet sich dadurch von den anderen Bindungsstellen. Beträgt die extrazelluläre

$\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration 0,5-1 mM, binden zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle zwischen den Domänen 1 und 2, so daß zwei benachbarte Cadherin-Monomere ein Cis-Dimer bilden. Die Bindung des dritten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions unterliegt einer niedrigeren Affinität und findet erst ab einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration größer als 1 mM statt. Sie ermöglicht die Verlagerung der Aminosäure Trp-2 in einen hydrophoben Abschnitt der EC1-Untereinheit, der von der Aminosäure Ala-80 gebildet wird. Ala-80 ist Teil der in verschiedenen Cadherin-Klassen hochkonservierten Histidin-Alanin-Valin-(HAV)-Sequenz, der eine entscheidende Rolle bei der homophilen Cadherin-Interaktion zugeschrieben wird (Overduin et al., 1995).

Erst wenn das dritte  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion gebunden und zur Verlagerung von Trp-2 geführt hat, kann eine Trans-Interaktion zwischen den EC1-Domänen von Cadherin-Dimeren benachbarter Zellen erfolgen.

VE-Cadherin besitzt keine HAV-Sequenz in seiner EC1-Untereinheit. Es scheint aber wahrscheinlich, daß die durch VE-Cadherin vermittelte Zelladhäsion über ähnliche, noch nicht vollständig bekannte Mechanismen erfolgt. Baumgartner et al. (2000) konnten mit Hilfe der Atomkraftmikroskopie zeigen, daß ein Verlust der Trans-Interaktion zwischen VE-Cadherinen bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $< 0,5$  mM mit einer V-förmigen Aufspaltung der VE-Cadherin-Dimere in Monomere einherging. Legrand et al. (2001) beobachteten *in vitro*, daß VE-Cadherin  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig auch Hexamere bilden konnte, die wahrscheinlich in einer Trans-Formation angeordnet waren.

Die intrazelluläre C-terminale Domäne von VE-Cadherin umfaßt 80 Aminosäuren und enthält Bindungsstellen für Proteine aus der Gruppe der Catenine (Navarro et al., 1995). Zu dieser Gruppe gehören die Proteine  $\beta$ -Catenin,  $\gamma$ -Catenin (= Plakoglobin) und p120. Sie sind Mitglieder der sogenannten Armadillo-Familie und sind unter anderem für die Verbindung zum Aktin-Cytoskelett verantwortlich (Peifer und Wieschaus, 1990; Peifer et al., 1992). So binden  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin an  $\alpha$ -Catenin, welches den Kontakt zum Aktin-Cytoskelett herstellt (Daniel et al., 1995).

Die über Catenine vermittelte Bindung an Aktinfilamente sorgt für eine korrekte laterale Anordnung von Cadherinen in der Zellmembran (Kemler, 1993), so daß die Adhärenskontakte eine größere Stabilität haben und die interzelluläre Permeabilität abnimmt. Die Stabilität der homophilen VE-Cadherin-Bindung hängt dabei besonders

von der Anwesenheit von  $\gamma$ -Catenin ab, das erst in späteren Stadien der Zelladhäsion nach dem Auftreten von  $\alpha$ -Catenin und  $\beta$ -Catenin erscheint (Lampugnani et al., 1995). Ohne Bindung an das Aktin-Cytoskelett ist die Stabilität der VE-Cadherin-Interaktion und die Beschränkung der interzellulären Permeabilität deutlich vermindert (Navarro et al., 1995).

### **1.3 Beteiligung des VE-Cadherin-Catenin-Komplexes an biologischen Prozessen**

Der VE-Cadherin-Catenin-Komplex ist an der Vaskulogenese, der Wundheilung, der Tumor-Metastasierung, an Entzündungsreaktionen und an der Signaltransduktion von Zellen wesentlich beteiligt.

Vaskulogenese: Vaskulogenese ist definiert als eine Blutgefäßbildung de novo (Benninghoff, 1994). Breier et al. (1996) wiesen in vivo VE-Cadherin-mRNA in mesodermalen Zellen des Dottersackmesenchyms am Tag 7,5 der Embryogenese von Maus-Embryonen nach. Am Tag 9,5 der Embryogenese war VE-Cadherin-mRNA nur in der peripheren Zellschicht von Blutinseln nachzuweisen, aus der Endothelzellen hervorgehen. In hämatopoetischen Zellen im Zentrum der Blutinseln konnten dagegen keine Transkripte nachgewiesen werden. Daraus wurde gefolgert, daß VE-Cadherin bei der Vaskulogenese ein frühzeitiger Marker in der Differenzierung von Endothelzellen ist. Vittet et al. (1997) zeigten in vitro, daß an Tag 11 der Embryogenese Maus-Stammzellen mit einer homozygoten VE-Cadherin-Nullmutation keine vaskulären Strukturen ausbilden konnten. Es wurde spekuliert, daß die fehlende Entstehung vaskulärer Strukturen auf der mangelnden Ausbildung von Zellkontakten zwischen Endothelzellen beruhte.

Wundheilung: Bei der Wundheilung und der damit verbundenen Neubildung von Blutgefäßen müssen Endothelzellen Interzellularkontakte aufgeben, sich von einer Zellmonolage lösen und in die Wunde einwandern. Breviario et al. (1995) zeigten, daß die Migration von CHO-Zellen durch die Transfektion mit VE-Cadherin vermindert wurde. Dies wurde durch eine gesteigerte Zell-Zell-Adhäsion erklärt, die eine für die Migration nötige Zell-Zell-Dissoziation verhinderte. Lampugnani et al. (1995) wiesen

durch Immunfluoreszenz-Experimente nach, daß VE-Cadherin,  $\alpha$ -Catenin und  $\beta$ -Catenin an Endothelzellen der Migrationsfront im Vergleich zu dicht konfluenten Zellen reduziert waren und daß Plakoglobin sogar kaum noch nachweisbar war. Navarro et al. (1995) beschrieben, daß die Migration von mit Wildtyp-VE-Cadherin transfizierten Zellen geringer war als die Migration von Zellen, die mit einer VE-Cadherin-Mutante transfiziert waren, der die cytoplasmatische Domäne fehlte.

Tumormetastasierung: In verschiedenen Tumoren wurde gezeigt, daß eine verminderte Cadherin-Expression mit einer gesteigerten Invasivität und Malignität einhergeht (Takeichi, 1991; Takeichi et al., 1993). Martin-Padura et al. (1995) fanden Hinweise, daß VE-Cadherin in Endothelzellen von Hämangiomen stärker als in Endothelzellen von Hämangioendotheliomen und Angiosarkomen exprimiert wird. Da VE-Cadherin die Tendenz zeigte, in malignen Gefäßtumoren zu verschwinden, kommt es als Marker für die Tumordiagnostik kaum in Frage.

Caveda et al. (1999) entdeckten weitere Hinweise, daß VE-Cadherin das Zellwachstum inhibieren kann. Sie beschrieben, daß mit cDNA von humanem VE-Cadherin transfizierte CHO-Zellen und L929-Zellen ebenso wie humane Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC) langsamer wuchsen als nicht transfizierte Kontrollzellen. Dieser negative Effekt von VE-Cadherin auf das Zellwachstum trat nur auf, wenn VE-Cadherin mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin verbunden war. War VE-Cadherin um seine cytoplasmatische Domäne verkürzt und damit nicht mit den Cateninen verbunden, blieb seine extrazelluläre Adhäsionsfähigkeit erhalten, nicht aber der inhibitorische Effekt auf das Zellwachstum.

Entzündungsreaktion: Bei Entzündungsreaktionen verändern sich die Barriereigenschaften des Endothels. Es kommt unter anderem zu einem Austritt von Leukozyten in das Interstitium und zu einer Zunahme der Permeabilität, die zu interstitiellen Ödemen führt.

Die Beteiligung von VE-Cadherin an der Aufrechterhaltung der Barrierenfunktion des Endothels wurde durch Experimente mit Antikörpern gegen VE-Cadherin nachgewiesen. Gulino et al. (1998) verwendeten in vitro einen polyklonalen VE-Cadherin-Antikörper, der zu einer Permeabilitätssteigerung für Makromoleküle führte,

die mit dem Auftreten von Lücken im Zellrasen verbunden war. Corada et al. (1999) beobachteten *in vivo* nach Inkubation mit einem monoklonalen Antikörper gegen VE-Cadherin eine Zunahme der Permeabilität vor allem im Myokard des Herzens und in der Lunge. Histologisch ließen sich Lücken im Endothel und eine Extravasation von Leukozyten nachweisen.

Navarro et al. (1995) zeigten mit transfizierten Zellen, daß VE-Cadherin nur die Permeabilität begrenzen konnte, wenn es mit Cateninen verbunden war. War VE-Cadherin um die cytoplasmatische Domäne verkürzt, konnte es sich zwar in Adhärensjunktionen anreichern und Zell-Zell-Kontakte vermitteln, nicht aber die Permeabilität kontrollieren.

Ein zellulärer Marker von Entzündungen sind Leukozyten. Leukozyten sind an den ersten Stadien einer Entzündungsreaktion beteiligt. Durch den Einfluß von Zytokinen und die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen rollen sie auf der Oberfläche der Endothelzellen ab, binden an die Zellen und wandern schließlich durch Interzellularkontakte in das Interstitium. Del Maschio et al. (1996) konnten zeigen, daß die Bindung von Leukozyten an Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) –aktivierte Endothelzellen zur Auflösung von Adhärensjunktionen führt. Mit Immunoprecipitation und Western Blot wurde nachgewiesen, daß  $\beta$ -Catenin und Plakoglobin deutlich, VE-Cadherin und  $\alpha$ -Catenin nur teilweise reduziert wurden. Gotsch et al. (1997) entdeckten *in vivo* nach Applikation eines monoklonalen VE-Cadherin-Antikörpers, daß die Extravasation von Leukozyten und die Gefäßpermeabilität gegenüber Kontrollbedingungen zunahmen. Sie nannten zwei mögliche Erklärungsmodelle für ihre Beobachtungen: Der Antikörper konnte direkt mit VE-Cadherin-Molekülen um Bindungsstellen bei deren homophiler Interaktion konkurrieren und damit durch VE-Cadherin vermittelte Zellkontakte öffnen. Ein zweiter Erklärungsansatz lautete, daß der Antikörper das Schließen der Zellkontakte blockierte, nachdem die ersten Leukozyten hindurchgewandert waren. Hordijk et al. (1999) zeigten, daß der Einfluß von VE-Cadherin auf die Leukozyten-Transmigration abhängig von der Verbindung zum Aktin-Cytoskelett war. Bei einer Zerstörung des Aktinfilamentsystems nahm die Leukozyten-Transmigration zu, während sie bei einer vermehrten Ausbildung des Aktin-Cytoskeletts abnahm.

In weiteren Arbeiten wurde der Einfluß der Entzündungsmediatoren Histamin und Thrombin auf die durch VE-Cadherin vermittelten Zellkontakte untersucht:

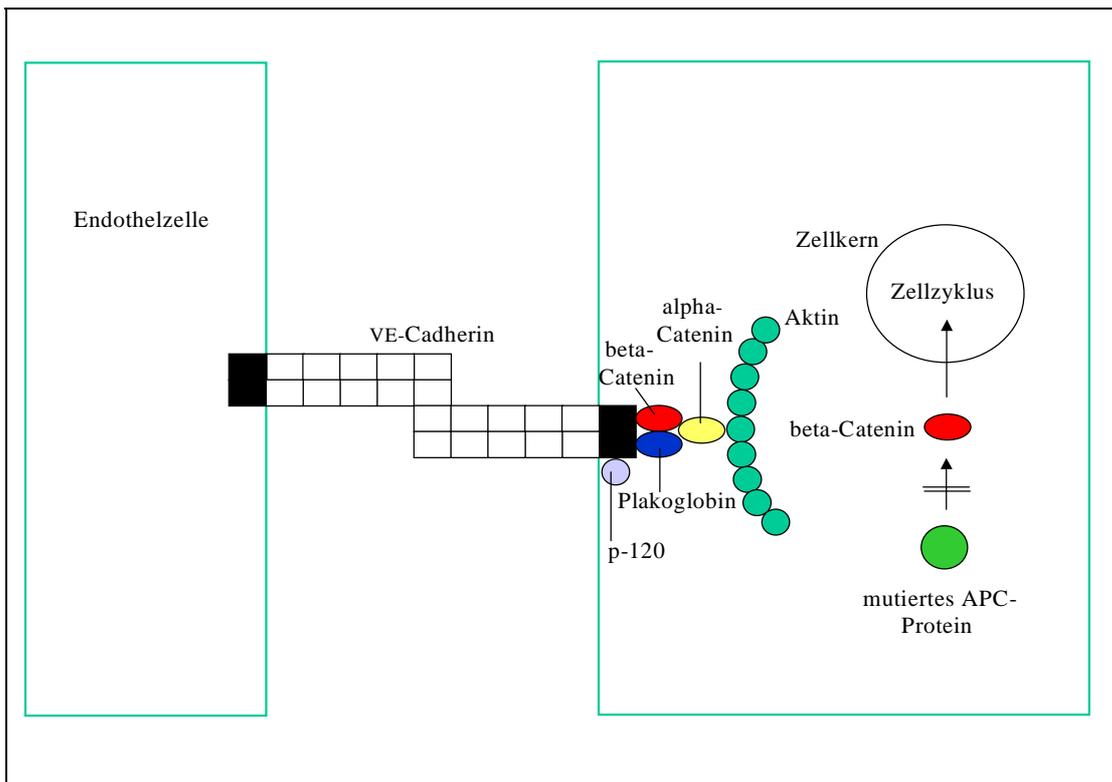
Winter et al. (1999) führten Experimente an ECV304-Zellen durch. Diese Zellen exprimierten kein VE-Cadherin. Wurden die Zellen mit cDNA von VE-Cadherin transfiziert und dem Einfluß von Histamin ausgesetzt, nahm der Zell-Zell-Widerstand der transfizierten ECV304-Zellen im Vergleich zu dem Widerstand nicht transfizierter Zellen ab. Dabei kam es nicht zu einer Phosphorylierung von Myosin-Leichtketten. Es wurde gefolgert, daß Histamin direkt über die durch VE-Cadherin vermittelte Zell-Adhäsion wirkte und nicht über eine Erhöhung einer durch Aktin und Myosin vermittelten Zugspannung, die die Zellen auseinanderzieht.

Andriopoulou et al. (1999) beobachteten in vitro eine Phosphorylierung des VE-Cadherin-Catenin-Komplexes unter dem Einfluß von Histamin, die mit einer Zunahme der Permeabilität verbunden war. Sie folgerten, daß es durch die Phosphorylierung zu einer Dissoziation des VE-Cadherin-Catenin-Komplexes von dem Aktinfilamentsystem kam, die zu einer Schwächung der Zell-Zell-Kontakte führte.

Rabiet et al. (1996) untersuchten den Einfluß eines zweiten Entzündungsmediators, Thrombin, auf VE-Cadherin. Abhängig von Phosphorylierungsprozessen durch die Proteinkinase C führte Thrombin zu einer Dissoziation des VE-Cadherin-Catenin-Komplexes, zu einer Zelldissoziation, zu Lücken im Zellrasen und zu einer gesteigerten Permeabilität.

Signaltransduktion: Neben den beschriebenen mechanischen Funktionen der Zelladhäsion und der Permeabilitätskontrolle ist der VE-Cadherin-Catenin-Komplex auch an Vorgängen der Signaltransduktion beteiligt. Eine mögliche Regulation der Signaltransduktion stellen dabei die an Adhärensjunktionen gebundenen Catenine dar. Es gibt Hinweise, daß  $\beta$ -Catenin als Signalmolekül agiert, wenn es von Adhärensjunktionen in das Cytoplasma dissoziiert. Es wandert in den Zellkern und induziert dort zusammen mit dem Transkriptionsfaktor LEF die Transkription von Proliferations-aktivierenden Genen (Behrens et al., 1996; Huber et al., 1996). Das Protein APC (Adenomatosis Polyposis Coli) eliminiert  $\beta$ -Catenin und verhindert damit die Transkription von Myc und Cyclin D. Eine Mutation des APC-Proteins führt durch

den verminderten Abbau von  $\beta$ -Catenin zu einer vermehrten Proliferation von Zellen. Mutationen von APC und  $\beta$ -Catenin kommen gehäuft in Kolonkarzinomen vor. (Klymkowski und Parr, 1995; Dejana, 1996; Lampugnani und Dejana, 1997; Dejana et al., 1999).



*Abbildung 1: Schematische Darstellung von Adhärenzstrukturen. VE-Cadherin vermittelt eine  $Ca^{2+}$ -abhängige, homophile Interaktion zwischen Endothelzellen. Dabei bildet VE-Cadherin Dimere aus, die mit Dimeren der gegenüberliegenden Zelle interagieren. Auf der cytoplasmatischen Seite bindet VE-Cadherin Proteine aus der Armadillo-Familie ( $\beta$ -Catenin, Plakoglobin, p-120).  $\beta$ -Catenin und Plakoglobin binden an  $\alpha$ -Catenin, das die Verbindung zum Aktinfilamentsystem herstellt.  $\beta$ -Catenin ist an der Signaltransduktion beteiligt und kann im Zellkern Transkriptionsfaktoren aktivieren. Eine Mutation des APC-Proteins resultiert in einem verminderten Abbau von  $\beta$ -Catenin. Dies führt zu einer gesteigerten Transkription von Proliferations-fördernden Genen.*

Ausführliche Zusammenfassungen der verschiedenen Funktionen des VE-Cadherin-Catenin-Komplexes geben die Übersichtsartikel von Dejana et al. (1995), Dejana (1996), Lampugnani und Dejana (1997), Dejana et al. (1999), Vestweber (2000) und Petzelbauer et al. (2000).

#### **1.4 Einflußfaktoren auf die durch VE-Cadherin vermittelte Zelladhäsion**

Die durch VE-Cadherin und andere Cadherine vermittelte interzelluläre Adhäsion kann von verschiedenen Faktoren abhängen:

Murase und Schuman (1999) beschrieben Wechselwirkungen zwischen intrazellulären Signalwegen und der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an Nervenzellen des Hippocampus. Hier führte elektrische Aktivität an den Synapsen zu einer vorübergehenden Senkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im synaptischen Spalt, so daß sich Cadherin-Kontakte (wahrscheinlich N-Cadherin) zwischen prä- und postsynaptischer Zelle lösen konnten. Dadurch konnte eine Remodellierung der synaptischen Kontakte stattfinden, die für synaptische „Lerneffekte“ wie die Langzeit-Potenzierung wichtig ist. Shapiro et al. (1995) postulierten an N-Cadherin ein Reißverschluß-Modell („zipper“), nach dem die Cadherine gegenüberliegender Zellen über ihre N-terminale EC1-Untereinheit miteinander interagieren. Dabei beeinflussen sich extrazelluläre Veränderungen an den Cadherinen und intrazelluläre Veränderungen an der Verbindung der Cadherine zum Aktinfilamentsystem wechselseitig: Einerseits ist die cytoplasmatische Domäne von Cadherinen und ihre Verbindung zu cytoplasmatischen Proteinen entscheidend für die Cadherin-vermittelte Zelladhäsion. Andererseits führt eine Störung der extrazellulären Cadherin-Funktion durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Depletierung oder durch Cadherin-Antikörper zu einer Desintegration des Aktinfilamentsystems.

Briher et al. (1996) zeigten anhand von *Xenopus* C-Cadherin, daß Cadherin-Dimere eine größere homophile Bindungsaktivität entwickelten als Monomere.

Hierfür wurden mehrere Erklärungsmöglichkeiten diskutiert: Dimere könnten eine höhere homophile Bindungsaktivität erreichen, weil sie multivalent sind. Alternativ könnte eine Dimerisation neue Bindungsstellen schaffen, die eine homophile Trans-Interaktion erst ermöglichen oder verstärken. Bei dem von Shapiro et al. vorgeschlagenen Reißverschluß-Modell der Cadherin-Interaktion würde eine Bildung

von Cadherin-Dimeren ein Ineinandergreifen gegenüberliegender Cadherin-Moleküle und damit eine multivalente Bindung ermöglichen.

Yap et al. (1997) entdeckten, daß die Anordnung von C-Cadherin in punktuellen Aggregaten in der Zellmembran eine höhere Adhäsionsfähigkeit bedingte als eine diffuse Verteilung der Cadherine über die gesamte Zellmembran. Mit zunehmender Zeitdauer, die zur Ausbildung der extrazellulären Interaktion zur Verfügung stand, nahm die Stabilität der Cadherin-Kontakte gegenüber einer laminaren Strömung zu. Die Stabilität erhöhte sich auch, wenn die Zellen mehr Protein exprimierten.

Yap et al. formulierten aus ihren Ergebnissen ein Modell, bei dem die cytoplasmatische Domäne der Cadherine die Anordnung von Cadherinen in punktuellen Aggregaten fördert, indem sie eventuell die Diffusion von Cadherin-Molekülen in der Zellmembran reguliert.

Die für verschiedene Cadherine erhobenen Befunde lassen darauf schließen, daß auch für VE-Cadherin die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und die Verbindung zum Aktinfilamentsystem wichtige Faktoren bei der Bildung von Adhäsionskontakten darstellen.

## **1.5 Fragestellung der Arbeit**

Vor dem Hintergrund der vorliegenden Forschungsergebnisse und der hierbei angewandten Methoden soll in dieser Arbeit der Einfluß der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und des Aktin-Cytoskeletts auf die homophile Trans-Interaktion von VE-Cadherin mit einem neuartigen experimentellen Zugang genauer charakterisiert und quantifiziert werden. Dazu wurde die Laserpinzetten-Technik (s. 2.7.3) eingesetzt. Es wurden 2,8  $\mu\text{m}$  große Mikroperlen mit rekombinanten VE-Cadherin-Dimeren beschichtet, die als Bindungspartner für VE-Cadherin-Moleküle der Endothelzellen dienten. Die beschichteten Mikroperlen wurden auf den Zellen bewegt, wobei die Interaktion zwischen den Mikroperlen und den Endothelzellen ausschließlich VE-Cadherin vermittelt war. Durch Auszählung der an den Zellen haftenden Mikroperlen wurde das durch VE-Cadherin vermittelte Adhäsionsverhalten quantifiziert. Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob sich das Adhäsionsverhalten bei einer verminderten extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration oder bei einer Veränderung des

Aktinfilamentsystems änderte und ob die Unterschiede gegenüber Kontrollverhältnissen direkt auf die homophile VE-Cadherin-Interaktion zurückgeführt werden konnten.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 VE-Cadherin-Fc-Fusionsprotein**

Das VE-Cadherin-Fc-Fusionskonstrukt wurde von Gotsch et al. (1997) hergestellt. Es besteht aus einem cDNA-Fragment, das den extrazellulären Teil des VE-Cadherins der Maus codiert. Dieses cDNA-Fragment wurde mit einem zweiten cDNA-Fragment kombiniert, das den Fc-Teil von humanem IgG<sub>1</sub> mit der Gelenk-Region und den IgG-Domänen CH<sub>2</sub> und CH<sub>3</sub> codiert. Die Zugriffsnummern in der Protein-Datenbank Swiss-Prot lauten P01857 für humanes IgG und P55284 für VE-Cadherin-Maus. Die Herstellung des Expressionsplasmids und die Transfektion von Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen wurden ebenfalls von Gotsch et al. (1997) durchgeführt.

Das VE-Cadherin-Fc wurde von den transfizierten Zellen in das Zellkulturmedium sezerniert. Die Zellen befanden sich in T<sub>100</sub>-Zellkulturflaschen (Fa. Greiner, Frickenhausen), in die 26 ml Minimal Essential Medium (MEM) der  $\alpha$ -Modifikation gegeben wurden. Das Medium enthielt einen Zusatz von 10 % (v/v) fetalem Rinderserum (FCS, Fa. Biochrom, Berlin) und 0,5 % (v/v) einer Antibiotikallösung, die 10000 U/ml Penicillin-Streptomycin enthielt (Stammlösung: 9,55 g PBS, 10000 U/ml Penicillin (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 10000 U/ml Streptomycin (Fa. Sigma-Aldrich) ad 1000 ml Ampuwa (Fa. Fresenius, Bad Homburg), pH 5,58). Die Zellen waren nach 2-3 d zu einer konfluenten Zellmonolage gewachsen. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. Das Medium mit dem sezernierten VE-Cadherin-Fc wurde 5 min bei 150 x g (900 U/min) zentrifugiert (Megafuge 1.0, Fa. Heraeus, Hanau) und der Überstand bei 4°C gesammelt.

### **2.2 Aufreinigung des VE-Cadherin-Fc-Fusionsproteins**

Es wurden 1-3 l Zellkulturüberstand gesammelt und in einer Kühlzentrifuge 10 min bei 4640 x g (5500 U/min) bei 4°C abzentrifugiert (Zentrifuge J2-21, Rotor JA 14, Fa. Beckman-Coulter, Unterschleißheim), bevor dem so gereinigten Überstand Proteaseinhibitoren zugesetzt wurden (2 ml 1mg/ml Leupeptin in H<sub>2</sub>O, 2 ml 1 mg/ml Aprotinin in H<sub>2</sub>O, 1 ml 1 mg/ml Pepstatin in 100 % (v/v) DMSO, 3 ml 1mM PMSF in

Isopropanol). Die Aufreinigung erfolgte über eine Plastiksäule mit Protein A-Agarose (Fa. Fluka, Buchs, Schweiz). Am Boden der Plastiksäule (2,5 ml Gesamtvolumen, 1 cm Durchmesser, Fa. MoBiTec, Göttingen) wurde ein Filter mit dem Durchmesser 1 cm platziert (Porengröße 35 µm, Fa. MoBiTec), der vorher mit HBSS angefeuchtet worden war. 75 mg lyophilisierte Protein A-Agarose wurden in 2 ml HBSS bis zu einem Bettvolumen von 0,3 ml in 45 min bei Raumtemperatur (RT) in der Säule zum Aufquellen gebracht (Quellkapazität: 1 g lyophilisierte Protein A-Agarose quillt zu 4 ml Bettvolumen. Bindungskapazität: 1 ml gequollene Protein A-Agarose bindet 20 mg humanes IgG). Die gequollene Protein A-Agarose wurde mit einem zweiten angefeuchteten Filter (s.o.) bedeckt. Die Säule wurde mit 60 ml HBSS gewaschen, bevor der Zellkulturüberstand vollständig über die Säule tropfte. Anschließend wurde das gebundene VE-Cadherin-Fc mit 20 mM Na-Citrat (pH 2,6) eluiert. Es wurden 15 Fraktionen je 1 ml abgenommen, in die 26 µl 2 M Na-Carbonat vorgelegt worden waren. Danach erfolgte eine Proteinbestimmung der einzelnen Fraktionen nach Bradford (s. 2.3.1).

Aus 1 l Zellkulturüberstand ließen sich 0,25-1,98 mg VE-Cadherin-Fc gewinnen.

## **2.3 Proteinbestimmungsverfahren**

Es wurden die folgenden Proteinbestimmungsverfahren durchgeführt:

### 2.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Je 20 µl der eluierten Fraktionen wurden mit Roti-Quant-Lösung (1:5 verdünnt mit H<sub>2</sub>O, Fa. Roth, Karlsruhe) auf 1 ml aufgefüllt und für 10 min bei RT inkubiert. Dabei entsteht ein blauer Farbkomplex aus Proteinen und Coomassie-Blau 250, das in dem Bradford-Reagenz enthalten ist. Ebenso wurde mit Rinderserumalbumin (BSA, Fa. Sigma-Aldrich) verfahren, das in unterschiedlichen Konzentrationen als Standard für die Erstellung einer Eichkurve diente (Leerwert, 0,1/0,25/0,5/0,75/1,0 mg/ml). Nach der Inkubationszeit wurde mit einem Photometer LKB Biochrom Ultraspec II (Fa. Pharmacia Biosystems, Freiburg) die Extinktion bei 595 nm gemessen und daraus die

Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen errechnet. Der Hauptteil des Proteins befand sich in den Fraktionen eins bis vier.

Für eine genauere Proteinbestimmung wurde das Amidoschwarzverfahren eingesetzt.

### 2.3.2 Amidoschwarz-Proteinbestimmung

Diese Methode (Dieckmann-Schuppert und Schnittler 1996) erlaubt im Gegensatz zu dem Verfahren nach Bradford eine genaue Proteinbestimmung auch in Anwesenheit hoher Konzentrationen an Detergentien oder Salz. Dies ermöglicht die Messung von Proben, die in SDS-Probenpuffer gelöst sind.

Zuerst wurde eine Celluloseacetatfolie (Fa. Schleicher und Schuell, Dassel) in 1 cm<sup>2</sup> große Felder aufgeteilt und mit zwei Metallklammern frei schwebend aufgehängt. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer ohne DTT (s. 2.4.2) versetzt (Verdünnung 1:5 mit H<sub>2</sub>O) und zu je 5 µl auf die Felder aufgetragen. Als Proteinstandard wurde BSA analog eingesetzt. Alle Proben wurden trocken geföhnt und anschließend 10 min in eine Färbelösung auf den Schüttler gegeben (2,5 g Amidoschwarz, 225 ml Methanol, 225 ml H<sub>2</sub>O, 50 ml 100 % (v/v) Essigsäure). Mit Entfärber (237,5 ml Methanol, 237,5 ml H<sub>2</sub>O, 25 ml 100 % (v/v) Essigsäure) wurde der Hintergrund wieder entfärbt, während die Proteinbanden durch die gebundene Färbelösung sichtbar wurden. Die Celluloseacetatfolie wurde in der Luft hängend mit einem Föhn gut getrocknet, bevor die Felder auseinander geschnitten und in 2 ml Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf, Frankfurt) gefaltet wurden. Nach Zugabe von 1 ml der Auflöselösung (10 g Trichloressigsäure, 80 ml 100 % (v/v) Ameisensäure, 10 ml 100 % (v/v) Essigsäure) und 30 min Inkubation im 50°C Wasserbad löste sich die Celluloseacetatfolie vollständig auf. Abschließend wurde die Extinktion bei 620 nm mit einem Photometer (s.o.) ermittelt und über die Eichgerade die Proteinkonzentration errechnet.

Nach Abschluß der Proteinbestimmung wurden die Fraktionen mit hohem Proteingehalt zusammengeführt, mit HBSS umgepuffert und über einen Filter auf 100-200 µl eingengt. Bei kleinem Volumen wurde der Filter Ultrafree-MC, 30000 MG (Fa. Millipore, Bedford, USA) verwendet und in der Zentrifuge 5415C (Fa. Eppendorf) bei 15800 x g (14000 U/min) für 3 min eingesetzt. Ab 3 ml Volumen wurden die Fraktionen über den Filter Ultrafree-15, 100000 MG (Fa. Millipore) in der Zentrifuge

CPKR (Fa. Beckman-Coulter) bei 1400 x g (3600 U/min) und 4°C für 10 min eingengt. Die ankonzentrierten Proben wurden in 20 µl Portionen bei -80°C aufbewahrt.

## **2.4 Charakterisierung des VE-Cadherin-Fc-Fusionsproteins**

Bei der Charakterisierung des VE-Cadherin-Fc-Fusionskonstrukts wurden die Monomer- und die Dimer-Form des Proteins untersucht. Dabei kamen folgende Techniken zur Anwendung:

- Herstellung des Monomers aus dem Dimer: die Disulfid-Brücken im Fc-Teil des Dimers wurden mit DTT gespalten, so daß zwei Monomere entstanden. Zusätzlich wurden die SH-Gruppen der entstandenen Monomere mit Iodoacetamid alkyliert und damit stabilisiert.
- SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese mit Natriumdodecylsulfat)
- Western-Blot
- Nachweis mit einer Chemoluminiszenzmethode

### 2.4.1 Herstellung des VE-Cadherin-Fc-Monomers

Bei der Herstellung des VE-Cadherin-Fc-Monomers wurden 5 µl einer VE-Cadherin-Dimer-Suspension (0,4 µg/µl HBSS) zu 15 µl Probenpuffer (mit DTT, s. 2.4.2) gegeben, 3 min bei 56°C erwärmt und anschließend in einem 10 % (w/v) Polyacrylamid-Gel laufen gelassen (SDS-PAGE Verfahren, s. 2.4.2).

Um zusätzlich die SH-Gruppen des Monomers zu stabilisieren, wurden folgende Schritte durchgeführt:

100 µg lyophilisiertes Dimer wurden mit 0,2 ml 0,1 M DTT-Lösung und 0,2 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0) versetzt und eine Stunde bei RT inkubiert. Danach wurden 0,2 ml 0,3 M Iodoacetamid (MW185) hinzugefügt und im Dunkeln 30 min inkubiert.

Die Probe (0,6 ml) wurde über einen Filter (s. 2.3.2) auf HBSS umgepuffert und auf 100 µl eingengt. Die Proteinkonzentration wurde auf 1 µg/µl eingestellt.

2  $\mu\text{l}$  dieser VE-Cadherin-Monomer-Suspension (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) wurden mit 18  $\mu\text{l}$  Probenpuffer (mit DTT, s. 2.4.2) gemischt und nach dem SDS-PAGE Verfahren (s. 2.4.2) in einem 10 % (w/v) Polyacrylamid-Gel dargestellt.

#### 2.4.2 Polyacrylamidgelelektrophorese mit Natriumdodecylsulfat (SDS-PAGE)

Die Methode wurde nach der Beschreibung von Anderson und Peterson (1981) durchgeführt. Es kam das Puffersystem nach Laemmli (1970) zum Einsatz:

Probenpuffer: 0,454 g Tris, 1,2 g SDS, 7,56 g Glycerin, 400  $\mu\text{l}$  Bromphenolblau, mit HCl auf pH 6,9 einstellen,  $\text{H}_2\text{O}$  ad 20 ml

Für Experimente mit dem VE-Cadherin-Fc-Dimer wurde dem Probenpuffer kein DTT zugesetzt, für Experimente mit dem VE-Cadherin-Monomer oder zur Monomer-Herstellung wurden dem Probenpuffer 30 mg DTT zugegeben.

Elektrophoresepuffer: 10 g SDS, 144 g Glycin, 30 g Tris ad 10 l  $\text{H}_2\text{O}$

Pro Spur wurden 2  $\mu\text{g}$  Probe in 20  $\mu\text{l}$  Volumen aufgetragen. Die Proben wurden 3 min bei 56°C erwärmt, damit das SDS an das Protein binden konnte. Dieses wurde dabei denaturiert und negativ geladen.

Ein Minigel war 0,75 cm dick und 6x8 cm groß. Es bestand aus einem 5 % (w/v) Polyacrylamid Sammelgel und einem Trenngel aus 10 % (w/v) oder 7,5 % (w/v) Polyacrylamid.

Für das Durchlaufen des Sammelgels wurde eine Spannung von 80 V angelegt, für das Trenngel eine Spannung von 180-200 V.

Nach Abschluß der Elektrophorese wurde das Gel 30 min gefärbt (1,25 g Serva Blau G-250, 225 ml Isopropanol, 227 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 46 ml 100 % (v/v) Essigsäure ad 500 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ).

#### 2.4.3 Western Blot (Immunreplikanalyse)

Die Immunreplikanalyse wurde wie folgt durchgeführt:

### 2.4.3.1 Proteintransfer

Nach der elektrophoretischen Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine aus dem Gel auf Nitrocellulose (Hybond<sup>TM</sup>-C, Fa. Amersham, Braunschweig) im Semi-dry-Verfahren (Kyhse-Anderson, 1984) übertragen (Burnette, 1981). Die Übertragung erfolgte in einem System, bei dem Nitrocellulose und Gel zwischen puffergetränkten Filterpapieren luftblasenfrei auf die Graphitelektroden der Laufkammer (Fa. Keutz, Reiskirchen) gelegt wurden (2 Filter in Anodenpuffer I, 1 Filter in Anodenpuffer II, Nitrocellulose, Gel, 3 Filter in Kathodenpuffer). Die Zusammensetzung der Puffer lautete:

Anodenpuffer I: 36,34 g 1 M Tris (pH 8,0), 200 ml Ethanol, H<sub>2</sub>O ad 1 l

Anodenpuffer II: 3,03 g 1 M Tris (pH 8,0), 200 ml Ethanol, H<sub>2</sub>O ad 1 l

Kathodenpuffer: 3,03 g 1 M Tris (pH 8,0), 7,25 g Aminocapronsäure, 200 ml Ethanol,  
H<sub>2</sub>O ad 1 l

Der Proteintransfer erfolgte in 90-120 min bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Fläche des Polyacrylamidgels. Durch Anfärben der Nitrocellulose mit 0,5 % (w/v) Ponceau S (Fa. Appli Chem, Darmstadt) in 3 % (w/v) Trichloressigsäure (Salinovich und Montelaro, 1986) wurden die Proteine sichtbar gemacht, so daß die einzelnen Laufspuren identifiziert und gegebenenfalls ausgeschnitten werden konnten. Die Färbung ist in Wasser reversibel und ohne Einfluß auf die nachfolgende Immundetektion.

### 2.4.3.2 Immundetektion

Freie Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulose wurden 3 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit 5 % Magermilch in PBS mit Zusatz von 0,1 % (w/v) Tween 20 (Fa. Appli Chem) abgesättigt. Danach wurden die unterschiedlichen Bestandteile des VE-Cadherin-Fc-Fusionskonstrukts mit Antikörpern nachgewiesen. Der Nachweis des VE-Cadherin-Anteils erfolgte durch Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper Ratte-IgG<sub>2a</sub> 11D4.1 über Nacht bei 4°C. Der Antikörper wurde von Gotsch et al. (1997) mit

Lewis Ratten hergestellt, die mit dem oben beschriebenen VE-Cadherin-Fc-Fusionskonstrukt immunisiert worden waren. Aus den Ratten wurden Lymphozyten isoliert. Nach Hybridisierung mit einem Plasmazellklon wurden immortalisierte Hybridoma-Zellen gewonnen, die den Antikörper in das Zellkulturmedium sezernierten. Dieser Zellkulturüberstand konnte in der vorliegenden Arbeit ohne weitere Aufreinigung bei der Immundetektion und Immunfluoreszenz zum Nachweis von VE-Cadherin eingesetzt werden. Er wird im Folgenden Hybridoma-Überstand genannt. Nach der Inkubation über Nacht wurde 3x5 min mit PBS mit 0,05 % (w/v) Tween-Zusatz (Fa. Appli Chem) gewaschen, bevor 45 min bei RT mit dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Ratte-IgG 1:1500 in Magermilch inkubiert wurde. Der Antikörper war mit Meerrettichperoxidase (POX) gekoppelt (goat-anti-rat-POX, Fa. Dianova, Hamburg). Nach erneutem gleichartigen Waschen erfolgte die Detektion mit der verstärkten Chemoluminiszenz-Methode (ECL-Methode) (s. 2.4.3.3).

Alternativ wurde der Fc-(Mensch)-Anteil von VE-Cadherin-Fc durch Inkubation mit Ziege-anti-Mensch-IgG-POX (goat-anti-human-POX, Fa. Dianova) 1:1500 in Magermilch nachgewiesen. Die Inkubation dauerte 45 min bei RT, danach wurde 3x5 min mit PBS mit 0,05 % (w/v) Tween-Zusatz (Fa. Appli Chem) gewaschen. Die Detektion erfolgte ebenfalls mit der ECL- Methode.

#### 2.4.3.3 Nachweis mit einer Chemoluminiszenz-Methode

Die auf der Nitrocellulose an Protein gebundenen Antikörper wurden mit der ECL-Methode nachgewiesen. Dabei werden proportional zu der gebundenen Menge an Erst- bzw. Zweitantikörpern enzymatisch Photonen erzeugt, die mit einem Röntgenfilm nachgewiesen werden können.

Die inkubierte und gewaschene Nitrocellulose wurde 1 min in eine ECL-Lösung gegeben (s.u.) und anschließend mit einer Klarsichtfolie abgedeckt. Obenauf wurde ein Röntgenfilm gelegt, der 30 s bis 3 min, je nach Intensität des Signals, in einer Filmkassette mit der Nitrocellulose in Kontakt gebracht wurde. Der Röntgenfilm wurde entwickelt, fixiert und nach dem Trocknen ausgewertet.

Folgende Materialien kamen zum Einsatz:

ECL-Lösung 1 : 1 ml 250 mM Luminol in DMSO, 0,44 ml 90 mM p-Coumaric-

Acid in DMSO, 10 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,5), H<sub>2</sub>O ad 100 ml

ECL-Lösung 2 : 64 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,5), H<sub>2</sub>O ad 100 ml

Mischung der ECL-Lösung 1 und ECL-Lösung 2 im Verhältnis 1:1.

Röntgenfilm: Hyperfilm<sup>TM</sup>ECL<sup>TM</sup> (Fa. Amersham)

Entwickler: Röntgenentwickler LX 24 (Fa. Kodak, Rochester, USA)

Fixierer: Röntgenfixierkonzentrat (Fa. Adefo, Nürnberg)

## 2.5 Beschichtung von Latex-Mikroperlen

Um VE-Cadherin-Molekülen von Endothelzellen in den Laserpinzetten-Experimenten einen homophilen Bindungspartner zur Verfügung zu stellen, wurden Latex-Mikroperlen mit VE-Cadherin-Fc-Konstrukt beschichtet. Es wurden mit Protein A beschichtete Latex-Mikroperlen (Dynabeads, 2,8 µm, Fa. Dynal, Oslo, Norwegen) verwendet. Der Waschvorgang, die Kopplung von VE-Cadherin-Fc und die Quervernetzung fanden nach der Anleitung für das Dynal Produkt 100.01 statt.

Die Mikroperlen wurden im Vorratsgefäß 1 min auf dem Vortexer gründlich aufgeschüttelt, bevor 10 µl der Suspension (2 x 10<sup>9</sup> Mikroperlen/ml) steril in ein 1,5 ml Eppendorf- Reaktionsgefäß entnommen wurden. In einer Magnethalterung MPC<sup>®</sup>-E-1 (Fa. Dynal) wurden die Perlen dreimal mit 100 µl 0,1 M Na-Phosphat (pH 8,1) gewaschen. Dabei wurden die Mikroperlen jeweils für 1 min mit Hilfe des Magneten sedimentiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen, bevor die Mikroperlen in 100 µl 0,1 M Na-Phosphat (pH 8,1) resuspendiert wurden. Nach dem Waschen wurden 7 µl der VE-Cadherin-Fc Chimäre (10 µg) mit 1,5 µl 0,5 M Na-Phosphat (pH 8,1) und 1,5 µl HBSS gemischt und 30 min bei RT mit den gewaschenen Mikroperlen inkubiert. Es wurde erneut dreimal mit 100 µl 0,1 M Na-Phosphat (pH 8,1) gewaschen, bevor abschließend das Protein über eine kovalente Bindung mit den Mikroperlen quervernetzt wurde.

Hierzu wurden die Mikroperlen mehrmals gründlich mit 100 µl 0,2 M Triethanolamin (pH 9,0) gewaschen. In 100 µl 0,2 M Triethanolamin (pH 9,0) wurden 0,54 mg des Quervernetzers DMP (Dimethyl-pimelimidate-2 HCl, Fa. Pierce, Rockford, USA)

gelöst und für 45 min bei RT zu den Perlen gegeben. Danach wurde der Überstand verworfen, einmal mit 100 µl 0,2 M Ethanolamin in H<sub>2</sub>O (pH 8,0) gewaschen und 2 h bei RT mit 100 µl Ethanolamin-Lösung inkubiert. Abschließend wurden die Mikroperlen dreimal mit 100 µl HBSS gewaschen und in 100 µl HBSS bei 4°C an einem sich drehenden Rad (Über-Kopf-Rotation zum Vermeiden einer Sedimentation) aufbewahrt. Die mit dem Fusionskonstrukt beschichteten Mikroperlen waren 5-7 d haltbar.

Als Kontrollperlen für die nachfolgenden Versuche mit der Laserpinzette wurden nach dem gleichen Protokoll selbstgewonnenes humanes IgG an die Perlen gekoppelt. Dabei wurden 4 µl humane IgG-Lösung (40 µg) mit je 3 µl 0,5 M Na-Phosphat (pH 8,1) und HBSS gemischt und mit den Perlen inkubiert. Der Erfolg der Beschichtung mit VE-Cadherin-Fc oder mit humanem IgG wurde mittels ELISA-Verfahren kontrolliert.

## **2.6 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**

Der ELISA wurde durchgeführt, um die Kopplung der VE-Cadherin-Fc-Moleküle an die Mikroperlen zu überprüfen. Es wurde eine Plastikplatte Nunclon™ mit 96 Vertiefungen (Fa. Nunc, Dänemark) verwendet. Fünf Vertiefungen wurden mit 400 µl 1 % (w/v) Fischgelatine in Beschichtungspuffer (s.u.) für 2 h bei RT abgesättigt und anschließend 3x5 min mit 400 µl Waschpuffer (s.u.) gewaschen. In abgesättigte einzelne Vertiefungen wurden folgende beschichteten Mikroperlen gegeben: 5 µl und 2 µl mit VE-Cadherin-Fc beladene Mikroperlen und 5 µl und 2 µl mit humanem IgG gekoppelte Mikroperlen. Eine Vertiefung blieb leer, um einen Wert für die unspezifische Absorption zu erhalten. Alle fünf Vertiefungen wurden über Nacht bei 4°C mit 100 µl Hybridoma-Überstand inkubiert. Danach wurde 3x5 min mit dem Waschpuffer gewaschen. Die Mikroperlen wurden dabei mit einem Magneten am Boden fixiert, damit sie nicht gewaschen wurden. Die Inkubation mit 100 µl Sekundärantikörper Ziege-anti-Ratte-IgG-POX 1:3000 in Blockpuffer erfolgte 45 min bei RT. Nach erneutem Waschen (mit Magnet) wurden 100 µl Enzymsubstrat 1-Step™ Turbo TMB-ELISA (Fa. Pierce, Rockford, USA) zugegeben. Es erfolgte ein Farbumschlag, welcher nach 25 min durch Zugabe von 100 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt

wurde. Danach wurde die Absorption in einem Photometer Titertek Multiskan<sup>®</sup> PLUS (Fa. Flow Laboratories) bei 450 nm gemessen.

Die Zusammensetzung der Puffer lautete:

ELISA-Beschichtungspuffer: Lösung A: 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (21,2 g/l)

Lösung B: 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> (16,8 g/l)

Gebrauchslösung: 17 ml Lösung A + 8 ml Lösung B

H<sub>2</sub>O ad 100 ml (pH 10,6)

ELISA-Waschpuffer: 0,24 g Tris, 0,87 g NaCl, H<sub>2</sub>O ad 100 ml (pH 7,4)

ELISA-Blockpuffer: 0,24 g Tris, 0,87 g NaCl, 0,30 g lyophilisiertes BSA,  
H<sub>2</sub>O ad 100 ml (pH 7,4)

## **2.7 Untersuchung des Bindungsverhaltens von mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen auf Maus-Endothelzellen mit einer Laserpinzette**

Diese Untersuchung fand in folgenden Schritten statt:

### 2.7.1 Kultivierung von Endothelzellen aus dem Myokard der Maus

Die Endothelzellen aus dem Myokard der Maus (Golenhofen und Drenckhahn, 1999) wurden in T<sub>25</sub>-Zellkulturflaschen (Fa. Greiner) in 6 ml Dulbecco's Modified Egel's Medium (DMEM) gehalten. Das Medium enthielt einen Zusatz von 10 % (v/v) FCS (Fa. Biochrom), 110 mg/l Na-Pyruvat und 0,5 % (v/v) der unter 2.1 beschriebenen Antibiotikallösung Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml). Die Konzentration an ionisiertem Ca<sup>2+</sup> betrug 1,8 mM. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. Die Zellen waren nach 2-3 d zu einer konfluenten Zellmonolage gewachsen. Sie wurden 0-1 d nach Erreichen der Konfluenz für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet.

### 2.7.2 Gelatinieren von Deckgläschen

Zur Untersuchung mit der Laserpinzette wurden die Endothelzellen auf Deckgläschen mit einem Durchmesser von 22 mm ausgesät. Die Deckgläser wurden in 150 ml H<sub>2</sub>O

mit einer Spatelspitze EDTA aufgekocht und nochmals zweimal in frischem H<sub>2</sub>O zum Kochen gebracht. Danach wurde 30 min unter sterilen Bedingungen mit 0,5 % (w/v) Gelatine inkubiert (Herstellung der Gelatine Lösung: 10 g Gelatinepulver in 2 l Ampuwa, Lösung erwärmen, bis Gelatine gelöst ist (nicht kochen!), 60 min bei 100°C autoklavieren). Die Gelatine-Lösung wurde abgesaugt, und die Gläschen wurden 30 min mit 2 % (v/v) Glutaraldehyd in PBS inkubiert. Nach erneutem Absaugen und 3x10 min Waschen mit PBS wurden 100 ml PBS und 1 ml 10000 U/ml Penicillin-Streptomycin-Lösung (s. 2.1) zugegeben. Die gelatinierten Gläschen wurden in Petrischalen bei 4°C aufbewahrt.

Auf diesen gelatinierten Gläschen konnten Endothelzellen in 2 ml DMEM ausgesät werden. Die Zellen waren nach 2-3 Tagen konfluent.

Für die Fluoreszenz-Mikroskopie (s. 2.7.4) wurden nach dem gleichen Protokoll Deckgläschen (Durchmesser 12 mm) gelatiniert.

### 2.7.3 Aufbau der Laserpinzette

Es wurde ein Nd:YAG Laser (Fa. Laser 2000, Wessling) mit einer Wellenlänge von 1064 nm und einer maximalen Leistung von 200 mW eingesetzt. Dieser Laser wurde mit dem Mikroskop Axiovert 135 (Fa. Zeiss, Oberkochen) kombiniert (Abbildung 2). Die mit Endothelzellen bewachsenen Gläschen wurden mit einem Objektiv Plan-Neofluar 63x/1,25 Öl (Fa. Zeiss) in Ölimmersion untersucht. Das Bild wurde mit einer CCD-Kamera (Camera SSC-M370 CE, Fa. Sony) auf einen Bildschirm (Video Monitor VM-122 OE, Fa. Hitachi) projiziert. Auf den Zellen befanden sich 100-200 µl DMEM (37°C), in das vorher 3 µl Suspension beschichteter Mikroperlen gegeben worden waren. Das Absinken der Mikroperlen und die Anhaftung auf den Zellen wurden 15 min am Bildschirm beobachtet, bevor der Laser aktiviert wurde. Einzelne Mikroperlen wurden manuell durch Verschieben des Gläschens in den Fokus des Laserstrahls gebracht (s. Abbildung 3). Die Bindungseigenschaften wurden durch den prozentualen Anteil der Mikroperlen, die sich bei einer bestimmten Laserleistung (30 oder 100 mW) nicht von der Zelloberfläche bewegen ließen, quantifiziert.

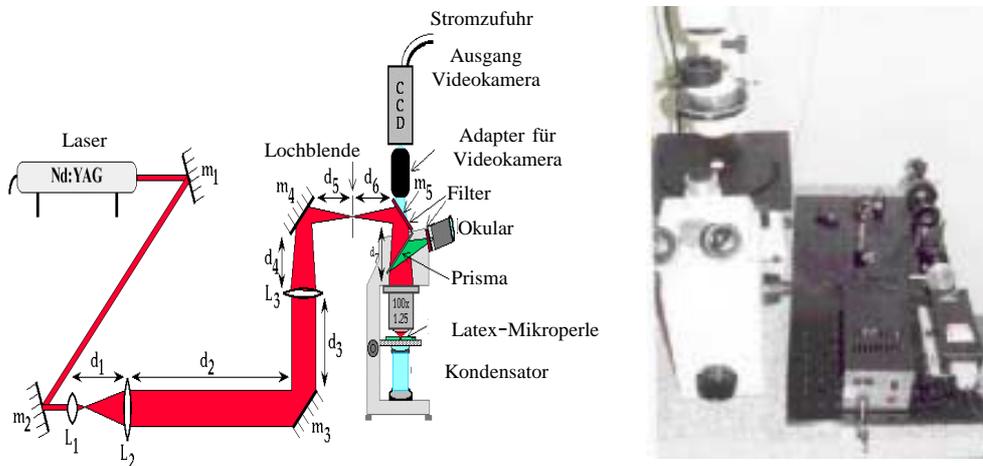


Abbildung 2: linkes Bild: prinzipieller Aufbau der Laserpinzette; rechtes Bild: Laserpinzette am Institut für Anatomie und Zellbiologie Würzburg

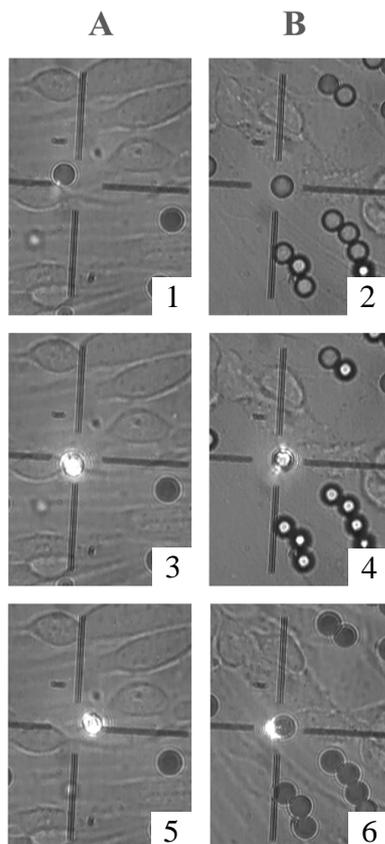


Abbildung 3: Untersuchung des Bindungsverhaltens von mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen an Endothelzellen:

Spalte A: Experiment mit beweglichen Mikroperlen

Spalte B: Experiment mit haftenden Mikroperlen

A1 und B2: Aktivierung des Lasers

A3 und B4: Fokussierung einer einzelnen Mikroperle in den Laserstrahl

A5 und B6: Manuelles Verschieben des Laserfokus:

A5: Die Mikroperle läßt sich bewegen

B6: Die Mikroperle bleibt haften

#### 2.7.4 Untersuchung des Bindungsverhaltens von mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen unter verschiedenen Versuchsbedingungen

Das Bindungsverhalten von mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen wurde unter folgenden Versuchsbedingungen untersucht:

##### 2.7.4.1 Bindungsverhalten unter dem Einfluß von monoklonalem VE-Cadherin-Antikörper (Hybridoma-Überstand)

Das Bindungsverhalten unter dem Einfluß von Hybridoma-Überstand wurde mit zwei verschiedenen Ansätzen untersucht.

Zuerst wurden die Endothelzellen 30 min mit 2 ml Hybridoma-Überstand bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit 1 ml DMEM gewaschen (5 min), die Messung erfolgte mit 3 µl beschichteten Mikroperlen in 200 µl DMEM (37°C) bei einer Laserleistung von 30 mW.

Bei dem zweiten Ansatz wurden die mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen 30 min mit 200 µl Hybridoma-Überstand bei RT inkubiert. Die Mikroperlen wurden mit Hilfe der Magnethalterung dreimal mit 100 µl PBS gewaschen. Die Messung erfolgte mit 3 µl der gewaschenen Mikroperlen in 200 µl DMEM (37°C) bei einer Laserleistung von 30 mW.

##### 2.7.4.2 Bindungsverhalten unter dem Einfluß der extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration

Durch Zugabe einer 100 mM Stammlösung EGTA wurde die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration des DMEM von 1,8 mM auf die zu untersuchenden Ca<sup>2+</sup>-Werte gesenkt (1,3/0,8/0,3 mM Ca<sup>2+</sup>). Diese Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen wurden mit einer Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Meßelektrode (Fa. Ingold, Steinbach/Taunus) nachgewiesen. Ein mit Endothelzellen bewachsenes Deckgläschen wurde aus dem Brutschrank entnommen und dreimal mit 1 ml DMEM (37°C) mit experimentell eingestellter Ca<sup>2+</sup>-Konzentration gespült. Dieses Spülen dauerte insgesamt 5 min. Zuletzt wurde den Zellen 100-200 µl DMEM (37°C) mit verminderter Ca<sup>2+</sup>-Konzentration zugegeben, die 3 µl der beschichteten Mikroperlen

enthielten. Es folgte die Untersuchung des Bindungsverhaltens bei einer Laserleistung von 30 mW (s. 2.7.3).

Zur Kontrolle wurden Versuche mit von Anfang an  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem DMEM durchgeführt, in welchem mit einer 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Stammlösung die gewünschte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eingestellt wurde (1,8/1,3/0,8/0,3 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ). Dieses Medium enthielt einen Zusatz von 10 % (v/v) FCS (Fa. Biochrom) und 110 mg/l Na-Pyruvat. Das FCS war vorher gegen PBS dialysiert worden und damit weitgehend  $\text{Ca}^{2+}$ -frei. Das normale DMEM wurde von den Endothelzellen dreimal mit 1 ml PBS weggespült (5 min), bevor 200  $\mu\text{l}$  DMEM mit frisch eingestellter  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (37°C) hinzugegeben wurden. Die anschließende Untersuchung des Bindungsverhaltens erfolgte wie unter 2.7.3 beschrieben.

#### 2.7.4.3 Bindungsverhalten unter dem Einfluß von Cytochalasin B und Cytochalasin D

Die Endothelzellen wurden einmal mit 1 ml PBS gewaschen und danach für 15 min mit 2 ml DMEM mit 10  $\mu\text{M}$  Cytochalasin B oder 10  $\mu\text{M}$  Cytochalasin D (Fa. Fluka) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 200  $\mu\text{l}$  der 10  $\mu\text{M}$  Cytochalasin B- oder Cytochalasin D-Lösung mit 3  $\mu\text{l}$  beschichteten Mikroperlen versetzt und zur Messung des Bindungsverhaltens auf die Zellen gegeben (s. 2.7.3). Die Laserleistung betrug 30 mW oder 100 mW.

#### 2.7.4.4 Bindungsverhalten unter dem Einfluß des $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors A 23187

Die Endothelzellen wurden einmal mit 1 ml PBS gewaschen und 10 min mit 2 ml DMEM mit 1  $\mu\text{M}$  oder 10  $\mu\text{M}$  A 23187 (Fa. Sigma-Aldrich) bei RT inkubiert. Danach wurden sie dreimal mit 1 ml DMEM gespült (5 min). Die Messung des Bindungsverhaltens wurde mit 3  $\mu\text{l}$  beschichteten Mikroperlen in 200  $\mu\text{l}$  DMEM (37°C) durchgeführt (s. 2.7.3). Die Laserleistung betrug 30 mW.

## **2.8 Fluoreszenzmikroskopie**

Mit der Fluoreszenzmikroskopie wurden der Einfluß einer veränderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und der Einfluß der Wirkstoffe Cytochalasin B, Cytochalasin D und

A 23187 auf VE-Cadherin und auf das Aktin-Cytoskelett optisch dargestellt. Folgende Inkubationen wurden mit Endothelzellen auf gelatinierten Deckgläsern durchgeführt:

- Inkubation mit 100 mM EGTA in DMEM: Einstellung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf 1,8/1,3/0,8/0,3 mM. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37°C.
- Inkubation mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem DMEM: Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde auf 1,8/1,3/0,8/0,3 mM eingestellt (s. 2.7.4). Die Inkubation erfolgte 30 min bei 37°C.
- Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Cytochalasin B oder 10  $\mu\text{M}$  Cytochalasin D in DMEM (1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ): 15 min bei 37°C (s. 2.7.4)
- Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  A 23187 in DMEM (1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ): 10 min bei RT (s. 2.7.4)

Die Zellen wurden 5 min mit 1 ml 2 % (w/v) Formaldehyd in PBS fixiert (frisch hergestellt aus Paraformaldehyd) und 3 min mit 1 ml 0,1 % (w/v) Triton-X in PBS permeabilisiert. Es wurde 3x5 min mit PBS gewaschen und anschließend 30 min mit 10  $\mu\text{l}$  2 % (w/v) BSA- 1 % (v/v) normalem Ziegen-Serum (normal goat serum, Fa. Dianova) in PBS inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde für 30 min 300  $\mu\text{l}$  Hybridoma-Überstand bei RT zugegeben, bevor erneut 3x5 min mit PBS gewaschen wurde. 10  $\mu\text{l}$  des mit Cy 3 markierten Sekundärantikörpers Ziege-anti-Ratte-IgG (goat-anti-rat-Cy 3, Fa. Dianova) 1:600 in PBS wurden 20 min bei RT eingesetzt. Es wurde wiederum mit PBS gewaschen, bevor das Aktin-Cytoskelett durch Inkubation (15 min) mit 5  $\mu\text{l}$  Phalloidin-Alexa (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Phalloidin, Absorbtiionswellenlänge 494 nm, Extinktionswellenlänge 517 nm, Fa. Molecular Probes, USA) 1:60 in PBS dargestellt wurde. Die Deckgläsern wurden zuletzt einmal kurz in  $\text{H}_2\text{O}$  getaucht und dann auf einem Objektträger in 5  $\mu\text{l}$  60 % (w/v) Glycerin in PBS mit 1,5 % (w/v) NPG (N-Propyl-Gallat) eingedeckt.

Unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Olympus BH2-RFCA, Fa. Zeiss) leuchtete das VE-Cadherin rot und das Aktin-Cytoskelett grün. Es wurde ein Objektiv Planapo 63/1,4 Öl (Fa. Zeiss) eingesetzt. Mit einer Fotokamera Olympus OM-4 (Fa. Zeiss) und einem Film TMAX-400 (Fa. Kodak) wurden Aufnahmen zur Dokumentation angefertigt.

## 2.9 Bestimmung des F-Aktin-Gehalts von Endothelzellen

Zur Bestimmung des F-Aktin-Gehalts von Endothelzellen wurde Phalloidin eingesetzt. Phalloidin ist ein Gift des Knollenblätterpilzes und bindet spezifisch und stöchiometrisch an F-Aktin (Wulf et al., 1980; Miyamoto et al., 1986). Diese Eigenschaft kann genutzt werden, um den F-Aktin-Gehalt von Endothelzellen zu quantifizieren. Hierzu wurden Zellen auf gelatinierte Deckgläschen mit einem Durchmesser von 2,2 cm ausgesät. Nachdem eine konfluente Zellmonolage vorhanden war, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 15 min mit 3 % (w/v) Formaldehyd in PBS (s. 2.8) fixiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellmembranen mit 0,1 % (w/v) Triton-X in PBS für 5 min permeabilisiert, bevor die Zellen nochmals mit PBS gespült wurden. Es folgte die Inkubation mit 500 µl Phalloidin-Rhodamin (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. H. Faulstich, Heidelberg) (1 µg/ml PBS) für 1 h bei 37°C. Unter diesen Bedingungen wird eine Sättigung der Phalloidinbindung erreicht (W. Ness, persönliche Kommunikation). Überschüssiges Rhodamin-Phalloidin wurde 3x5 min mit PBS gewaschen, bevor das an F-Aktin gebundene Rhodamin-Phalloidin mit 1 ml Methanol/Gläschen für 2x1 h bei 37°C extrahiert wurde. Diese Inkubation sollte möglichst luftdicht durchgeführt werden, damit kein Methanol verdunstet. Die Vollständigkeit der Extraktion wurde für jedes Deckgläschen fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Die 2 ml Methanolextrakte wurden für 10 min bei 10000 x g (11000 U/min) zentrifugiert (Zentrifuge 5415C, Fa. Eppendorf) und die Fluoreszenz in einem Fluoreszenz-Spektrophotometer (Modell SFM 25, Fa. Kontron Instruments, Neufarn) gemessen (Anregungswellenlänge 542 nm, Emissionswellenlänge 563 nm). Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde Rhodamin-Phalloidin in den Konzentrationen 0/1/5/10/25/50/75 ng/ml Methanol eingesetzt. Die Quantifizierung des F-Aktin-Gehalts wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Kontrollmessung in DMEM (1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ )
- bei mit 100 mM EGTA auf 0,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  eingestelltem DMEM, Inkubation 1 h bei 37°C

- bei Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  Cytochalasin B in DMEM (1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ), Inkubation 30 min bei 37°C
- bei Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  Cytochalasin D in DMEM (1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ), Inkubation 30 min bei 37°C
- bei Anwesenheit von 1  $\mu\text{M}$  A 23187 in DMEM (1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ), Inkubation 10 min bei RT
- bei Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  A 23187 in DMEM (1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ), Inkubation 10 min bei RT

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Reinigung, biochemische Charakterisierung und Kopplung des VE-Cadherin-Fc-Fusionsproteins

Aus 1 l Zellkulturüberstand ließen sich mit einer Protein A-Agarose-Säule 0,25-1,98 mg VE-Cadherin-Fc-Protein gewinnen. Im Western-Blot stimmte das experimentell ermittelte Molekulargewicht (MG) mit dem errechneten MG annähernd überein (s. Abbildung 4). Das errechnete MG betrug:

Humanes IgG schwere Kette:	CH <sub>3</sub>	12077 Da
	CH <sub>2</sub>	12705 Da
	Gelenk-Region	1345 Da
VE-Cadherin extrazellulärer Teil:		62103 Da
Summe:		88230 Da

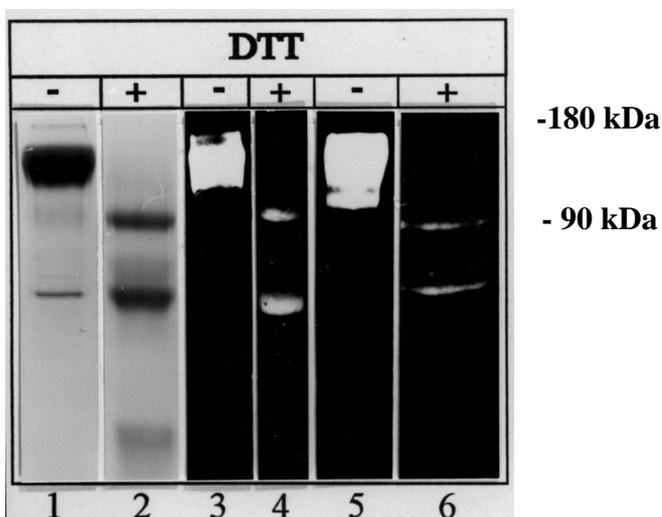


Abbildung 4: SDS-PAGE und Western Blot von gereinigtem VE-Cadherin-Fc unter nicht reduzierenden (-) und reduzierenden (+) Bedingungen. Spur 1 und 2: Coomassiefärbung des Gels; Spur 3 und 4: Inkubation mit Antikörper gegen extrazelluläre Domäne von VE-Cadherin; Spur 5 und 6: Inkubation mit Antikörper gegen humanes IgG

Frisch gereinigtes Protein wurde unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen in SDS-PAGE (7,5 % (w/v) oder 10 % (w/v) Polyacrylamid) aufgetrennt. Unter reduzierenden Bedingungen betrug das apparente MG des Monomers 85 kDa, unter nicht reduzierenden Bedingungen betrug das MG des Dimers 170 kDa. Monomer und Dimer wurden sowohl von dem Hybridoma-Überstand als auch von dem Ziege-anti-Mensch-IgG-POX Antikörper erkannt. Biochemisch mit Iodoacetamid hergestelltes Monomer wurde ebenfalls von beiden Antikörpern erkannt. Bei der Herstellung des Monomers kam es zu einer teilweisen Degradation, wobei Bruchstücke mit einem MG von 75 kDa und 55 kDa nachgewiesen werden konnten. Die Bruchstelle war nicht genau zu bestimmen.

Weiterhin ließ sich feststellen, daß VE-Cadherin-Fc unter reduzierenden Bedingungen hitzelabil ist. Das Protein darf in Anwesenheit von DTT nur 3 min bei 56°C erwärmt werden, weil es bei höheren Temperaturen degradiert.

Der humane Fc-Teil von VE-Cadherin-Fc wurde dabei ebenso wie humanes IgG, das als Kontrolle diente, über Protein A an die Latex-Mikroperlen (Dynabeads) gebunden. Um eine kovalente Bindung zu erhalten, wurde zusätzlich der Quervernetzer DMP eingesetzt. Der Nachweis der Bindung konnte mittels ELISA anhand der enzymatisch induzierten Farbreaktion und der abschließenden Messung der Extinktion semiquantitativ geführt werden. Die Extinktionswerte waren von der Menge der eingesetzten Mikroperlen abhängig und lagen signifikant über dem Leerwert.

Ein exemplarisches Versuchsergebnis zeigt Tabelle 1.

Volumen der Mikroperlen-Suspension in µl	Extinktion der mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen	Extinktion der mit humanem IgG beschichteten Mikroperlen	Extinktion des Leerwerts
10	0,338	0,183	
5	0,195	0,176	
0			0,092

*Tabelle 1: ELISA-Kontrolle der Beschichtung von Latex-Mikroperlen. Mit VE-Cadherin-Fc beschichtete Mikroperlen ergaben höhere Extinktionswerte als mit humanem IgG beschichtete Mikroperlen.*

### 3.2 Nachweis der spezifischen VE-Cadherin-Interaktion

Um zu überprüfen, ob die Bindung der Mikroperlen an den Endothelzellen spezifisch durch die Beschichtung mit VE-Cadherin-Fc vermittelt wird, wurden als Kontrolle Latex-Mikroperlen mit humanen IgG-Molekülen beschichtet.

Diese mit humanen IgG-Molekülen beschichteten Mikroperlen hafteten bei gleicher Laserleistung (30 mW) nur mit 12,3 % des Kontrollniveaus (s. Tabelle 3). Die Bindung erfolgte unabhängig von der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Daten nicht dargestellt). Eine unspezifische Interaktion zwischen dem Komplementsystem und den auf den Mikroperlen gebundenen Antikörpern wurde ausgeschlossen, indem das FCS vor der Zugabe zum Zellmedium 1 h bei  $56^{\circ}\text{C}$  dekomplementiert wurde. Die mit VE-Cadherin-Fc beladenen Mikroperlen hafteten dagegen genauso stark wie im nicht dekomplementierten Standardmedium (Daten nicht dargestellt). Die Bindung dieser Mikroperlen war  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig: Bei einer extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 1,8 mM hafteten 65 % der Mikroperlen, während die Haftung bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von 0,0-0,3 mM 25-27 % betrug (Details s. 3.3.1).

Die Blockierung von VE-Cadherin-Bindungsstellen führte ebenfalls zu einer Reduktion der Bindungshäufigkeit von mit VE-Cadherin beschichteten Mikroperlen: Wurden die Endothelzellen mit Hybridoma-Überstand (monoklonaler Antikörper gegen VE-Cadherin) inkubiert, sank die Bindungshäufigkeit der Mikroperlen auf 63,6 % gegenüber einer Kontrollmessung. Wurden zuerst die Mikroperlen mit dem Antikörper inkubiert und dann in DMEM auf die Zellen gegeben, betrug die Bindungshäufigkeit verglichen mit der Kontrolle 72,5 % (s. Tabelle 3).

Baumgartner bestätigte die Ergebnisse dieser Messungen, indem sowohl die Endothelzellen (30 min bei  $37^{\circ}\text{C}$ ) als auch die mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen (30 min bei RT) mit Hybridoma-Überstand inkubiert wurden. Es wurden anschließend zwei Experimente mit der Laserpinzette (Laserleistung 30 mW) in Anwesenheit von Hybridoma-Zellkulturüberstand ( $37^{\circ}\text{C}$ ) durchgeführt, bei denen die Bindungshäufigkeit der Mikroperlen 61 % des Kontrollniveaus betrug (bisher unveröffentlichte Daten).

Diese Daten zeigten, daß die Bindung zwischen den Endothelzellen und den mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen partiell durch Antikörper gegen VE-Cadherin inhibiert werden konnte.

### **3.3 Bindungsverhalten von mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen an Endothelzellen**

Das genannte Bindungsverhalten stellte sich unter verschiedenen Versuchsbedingungen wie folgt dar:

#### 3.3.1 Einfluß der extrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

Die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde schrittweise durch Zugabe einer 100 mM EGTA-Lösung gesenkt, um die Bindungshäufigkeit der mit VE-Cadherin-Fc beladenen Mikroperlen zu untersuchen. Die einzelnen Messungen wurden bei einer Laserleistung von 30 mW durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß mit abnehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration immer weniger Mikroperlen an den Endothelzellen hafteten. Bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen mußten die Zellen ausreichend (s. 2.7.4.1) mit 0,3 mM bzw. 0,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem DMEM gespült werden. Bei ungenügendem Spülen wurden bei 0,3 mM  $\text{Ca}^{2+}$  zweimal Meßwerte von 67 % und einmal von 47 % gemessen. Bei ungenügendem Spülen wurde bei 0,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  einmal ein Meßwert von 47 % gemessen.

Bei der nach Adam et al. (1995) errechneten Titrationskurve unterschieden sich die Meßwerte unterhalb von 0,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  nur gering voneinander und lagen in einem niedrigen Bereich. Es fiel insbesondere der starke Anstieg der Zahl der haftenden Mikroperlen im Bereich 0,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  bis 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  auf. Das Intervall 0,8 – 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  schien daher ein Bereich zu sein, in dem VE-Cadherine eine stabile Verbindung zwischen Mikroperlen und Endothelzellen gewährleisten konnten. Bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen größer als 1,8 mM nahm die Bindungshäufigkeit der Mikroperlen an den Endothelzellen wieder ab (s. Tabelle 2 und Abbildung 5).

Die Ergebnisse standen in Einklang mit Kontrolldaten, die durch die schrittweise Zugabe einer 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung zu einem von Anfang an  $\text{Ca}^{2+}$ -freien DMEM bis auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von 0,3/0,8/1,3/1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  erhalten wurden. Eine

Beeinflussung des Bindungsverhaltens durch EGTA wurde damit ausgeschlossen (Daten nicht dargestellt).

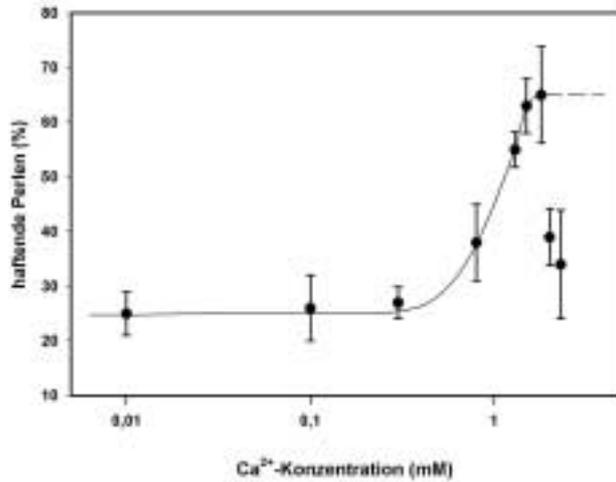


Abbildung 5: VE-Cadherin-vermittelte Interaktion zwischen Mikroperlen und Endothelzellen abhängig von der extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Kooperatives Bindungsverhalten mit  $K_D \sim 1,1$  mM, Hill Koeffizient  $n_H \sim 4,6$ .

Ca <sup>2+</sup> -Konzentration in mM	Mittelwert und Standardabweichung der haftenden Mikroperlen in % (Beschichtung mit VE-Cadherin-Fc)	Anzahl (n) der Versuche
2,3	34 ± 9,9	3
2,0	39 ± 5,2	3
1,8	65 ± 8,8	10
1,3	55 ± 3,2	4
0,8	38 ± 7,0	4
0,3	27 ± 2,9	3
0,1	26 ± 6,0	2
0,0	25	1

Tabelle 2: Bindungshäufigkeit von mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen abhängig von der extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Die Bindungshäufigkeit zeigt einen starken Anstieg ab 0,8 mM  $Ca^{2+}$ .

Bei einer Erhöhung der Laserleistung auf 100 mW hafteten die gleiche Anzahl von Mikroperlen an den Endothelzellen wie bei einer Laserleistung von 30 mW (Daten nicht dargestellt). Damit war sichergestellt, daß eine Laserleistung von 30 mW ausreichend war, um eine unspezifische von einer spezifischen Bindung der Mikroperlen an die Endothelzellen zu unterscheiden.

### 3.3.2 Einfluß von Cytochalasin B und Cytochalasin D

Cytochalasine verhindern vor allem die Polymerisation von Aktin durch Blockierung des schnell wachsenden Filamentendes (barbed end). Außerdem führen Cytochalasine zu einer Fragmentierung von Aktinfilamenten. Sie stellen damit eine spezifische Möglichkeit dar, das Aktinfilamentsystem zu beeinflussen. Es wurden Cytochalasin B und Cytochalasin D eingesetzt (s. Tabelle 3). Nach Exposition (15 min) mit 10 µM Cytochalasin B sank die Bindungshäufigkeit der mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen deutlich (s. Tabelle 3). Im Verhältnis zu einer Kontrollmessung hafteten nur 66,5 % der Mikroperlen an den Endothelzellen (Laserleistung 30 mW). Bei einer Laserleistung von 100 mW lag die Bindungshäufigkeit bei 59,6 %.

Durch 10 µM Cytochalasin D wurde die Bindungshäufigkeit auf 33,3 % der Kontrollwerte reduziert (Laserleistung 30 mW).

Damit wurde gezeigt, daß die Reduktion von F-Aktin die VE-Cadherin-Interaktion entscheidend beeinflußt.

Cytochalasin B, Cytochalasin D und A 23187 waren in Ethanol gelöst. Eine Zugabe von 1 % (v/v) Ethanol zu DMEM beeinflusste die VE-Cadherin- Bindungshäufigkeit nicht wesentlich. Sie betrug gegenüber Kontrollmessungen ohne Ethanol 96,6 %. Die Adhäsion wurde also nur durch Cytochalasin B, Cytochalasin D und A 23187 beeinträchtigt und nicht durch das Lösungsmittel.

### 3.3.3 Einfluß der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration

Die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration wurde durch das  $Ca^{2+}$ -Ionophor A 23187 verändert. A 23187 erhöht die Permeabilität der Zellmembran für  $Ca^{2+}$  und führt so zu einem Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration (Suttorp et al., 1989; Curry et al.,

1990). Eine erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt über verschiedene Zwischenschritte zur Kontraktion des Aktin-Myosin-Cytoskeletts (Schnittler et al., 1990). Weiterhin wird F-Aktin unter dem Einfluß einer durch A 23187 erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration fragmentiert, aber nicht depolymerisiert (Kuhne et al., 1993).

Versuchsbedingungen	Laserleistung in mW	Mittelwert und Standardabweichung der haftenden Mikroperlen in % der Kontrolle (1,8 mM $\text{Ca}^{2+}$ in DMEM)	Anzahl (n) der Versuche
10 $\mu\text{M}$ Cytochalasin B	30	66,5 $\pm$ 8,6	5
10 $\mu\text{M}$ Cytochalasin B	100	59,6 $\pm$ 9,5	3
10 $\mu\text{M}$ Cytochalasin D	30	33,3 $\pm$ 4,4	4
1 $\mu\text{M}$ A 23187	30	78,2 $\pm$ 4,3	3
10 $\mu\text{M}$ A 23187	30	34,4 $\pm$ 3,2	3
1 % (v/v) Ethanol	30	96,6 $\pm$ 1,6	2
Hybridoma-Überstand			
- Zellen abgesättigt	30	63,6	1
- Mikroperlen abgesättigt		72,5	1
Mit humanem IgG			
beschichtete Mikroperlen	30	12,3 $\pm$ 3,2	3

*Tabelle 3: Darstellung des Bindungsverhaltens von mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen abhängig vom Einfluß von Cytochalasin B, Cytochalasin D, A 23187 und anti-VE-Cadherin (Hybridoma-Überstand). Die Bindungshäufigkeit wird durch die vier Substanzen deutlich reduziert. Ethanol hatte keinen Einfluß auf die Bindung der Mikroperlen. Die Bindungshäufigkeit von mit humanem IgG beschichteten Mikroperlen war geringer als die Bindungshäufigkeit von mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen.*

A 23187 hat damit im Gegensatz zu Cytochalasin B und Cytochalasin D einen weniger spezifischen Einfluß auf das Aktin-Cytoskelett.

In den Experimenten zeigte sich, daß im Verhältnis zu einer Kontrollmessung ohne A 23187 bei Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  A 23187 (Inkubationszeit 10 min) nur noch 78 % der mit VE-Cadherin-Fc beladenen Mikroperlen auf den Endothelzellen hafteten.

In Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  A 23187 wurde die Bindungshäufigkeit auf 34,4 % des Kontrollniveaus reduziert (s. Tabelle 3).

### 3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Mit der Fluoreszenzmikroskopie wurden der Einfluß einer veränderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und der Einfluß der Wirkstoffe Cytochalasin B, Cytochalasin D und A 23187 auf VE-Cadherin und auf das Aktin-Cytoskelett optisch dargestellt. Bei der Immunlokalisation von VE-Cadherin unter Kontrollbedingungen (DMEM mit 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) zeigte sich eine scharf begrenzte Fluoreszenz an den Zellgrenzen benachbarter Endothelzellen. Das Aktin-Cytoskelett stellte sich nach Inkubation mit Phalloidin-Alexa mit parallel und längs verlaufenden Aktinfilamentbündeln dar.

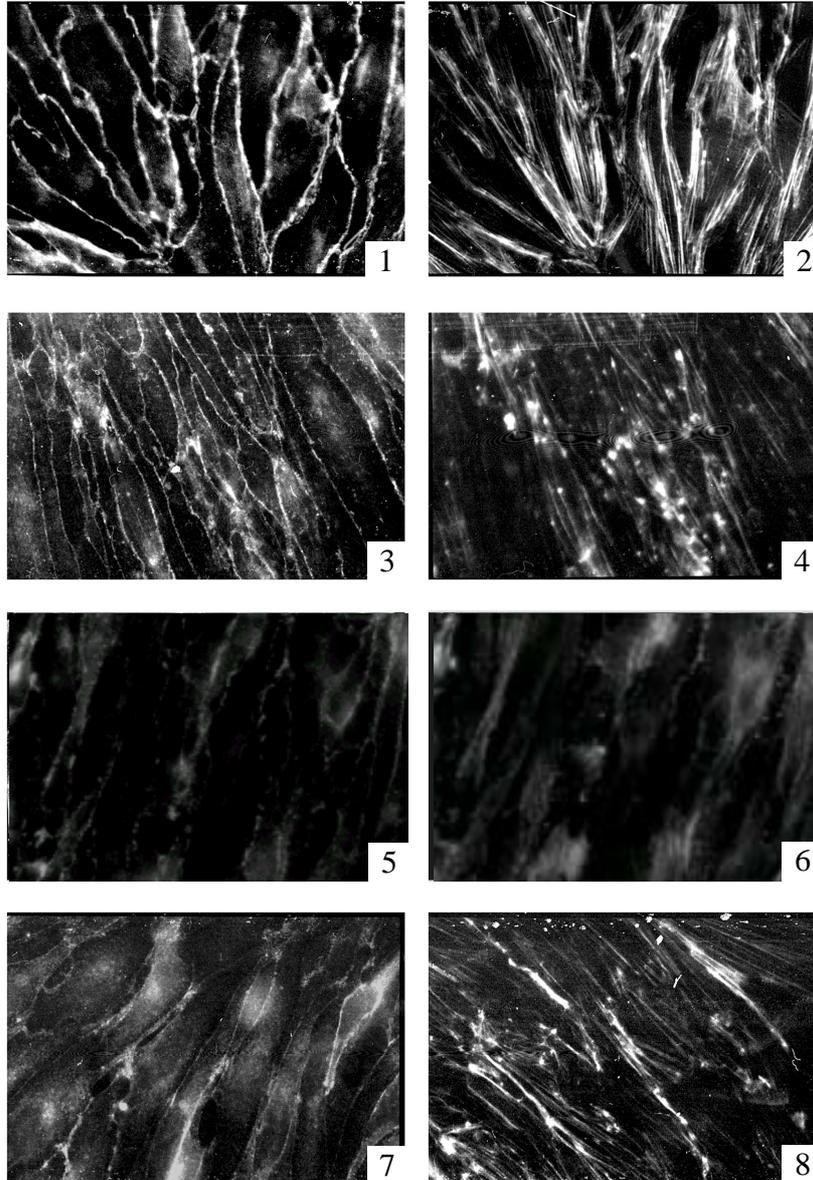
Bei einer extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0,3 mM  $\text{Ca}^{2+}$  ging die scharfe randständige VE-Cadherin-Immunfluoreszenz verloren. Signifikante Änderungen des Aktinfilamentsystems waren nicht festzustellen.

Ab 0,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  war die randständige VE-Cadherin-Immunfluoreszenz wieder vorhanden. Es ließen sich keine eindeutigen Unterschiede zu Inkubationen bei 1,3 mM  $\text{Ca}^{2+}$  und bei 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  feststellen.

Damit wurde gezeigt, daß VE-Cadherin bei niedrigen extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von den Zell-Zell-Kontakten verschwand und bei höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen an die Zell-Zell-Kontakte rekrutiert wurde. Der Bereich ab 0,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  schien dabei eine wichtige Grenze zu sein, oberhalb der sich durch VE-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Kontakte ausbilden konnten.

Die Ergebnisse stimmten mit Ergebnissen aus den Laserpinzetten-Experimenten bei unterschiedlichen extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen überein (s. Absatz 3.2.1). Hier nahm die Bindungshäufigkeit der mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen

ebenfalls ab einer extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0,8 mM zu, während bei niedrigeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen die Bindungshäufigkeit nur gering war.



*Abbildung 6: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von VE-Cadherin und Aktin in Endothelzellen. Bild 1 und 2: Kontrolle; Bild 3 und 4: nach 10  $\mu\text{M}$  Cytochalasin D; Bild 5 und 6: nach 1  $\mu\text{M}$  A 23187; Bild 7 und 8: nach 0,3 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ; Bilder 1, 3, 5 und 7 zeigen Immunlokalisationen von VE-Cadherin mit Hybridoma-Überstand. Bilder 2, 4, 6 und 8 zeigen Darstellungen von F-Aktin mit Phalloidin-Alexa*

Bei Inkubation der Endothelzellen mit 10  $\mu\text{M}$  Cytochalasin B (15 min bei 37°C) wurden die folgenden Beobachtungen gemacht:

Die randständige VE-Cadherin-Immunfluoreszenz blieb erhalten, war aber nicht mehr so scharf begrenzt wie unter Kontrollbedingungen. Das Aktin-Cytoskelett wurde zerstört und stellte sich punktförmig dar.

Versuche mit Cytochalasin D brachten das gleiche Resultat.

Die unterschiedlichen Ergebnisse in der VE-Cadherin-Immunfluoreszenz ließen sich nur erzielen, wenn die Endothelzellen nicht älter als 48-72 h waren. Waren die Zellen älter, stellte sich sowohl unter dem Einfluß verschiedener extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen als auch unter dem Einfluß von Cytochalasin B oder Cytochalasin D eine scharf begrenzte, randständige VE-Cadherin-Lokalisation dar, die nicht von einer Kontrolle zu unterscheiden war. Damit schienen die Zellkontakte von Zellen, die älter als drei Tage waren, stabiler zu sein als die von Zellen, die gerade konfluent gewachsen waren.

Unter dem Einfluß von 1  $\mu\text{M}$  A 23187 ließen sich folgende Beobachtungen machen (Inkubationszeit: 10 min bei RT):

Bei der Immunlokalisierung von VE-Cadherin zeigte sich eine diffusere Immunfluoreszenz als unter Kontrollbedingungen. Die Färbung des Aktin-Cytoskeletts war reduziert.

### **3.5 Quantifizierung des F-Aktin Gehalts von Endothelzellen**

Um den F-Aktin-Gehalt von Endothelzellen zu quantifizieren, wurden die Aktinfilamente mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt und die Extinktion der Methanolextrakte gemessen, nachdem die Zellen vorher mit 0,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  oder bei 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  mit 10  $\mu\text{M}$  Cytochalasin B, 10  $\mu\text{M}$  Cytochalasin D oder 1  $\mu\text{M}$  A 23187 inkubiert worden waren. Als Vergleich diente eine Messung an Zellen mit 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  in DMEM (s. Tabelle 4).

Nach Inkubation mit 0,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Zellmedium für 1 h bei 37°C konnten nur noch 87,0 % des F-Aktins gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden. Unter dem Einfluß von 10  $\mu\text{M}$  Cytochalasin B (1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) sank der gemessene Extinktionswert

des F-Aktins auf 78,3 %, nach Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Cytochalasin D (1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) auf 76,8 % (je 30 min bei 37°C).

In Anwesenheit von 1  $\mu\text{M}$  A 23187 (1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) betrug die Extinktion des F-Aktins 37,0 %, in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  A 23187 betrug die Extinktion 39,3 % (je 10 min bei RT).

Versuchsbedingungen	Mittelwert und Standardabweichung der gemessenen Extinktionen in % der Kontrolle (1,8 mM $\text{Ca}^{2+}$ in DMEM)	Anzahl (n) der Versuche
0,1 mM $\text{Ca}^{2+}$	87,0 $\pm$ 7,1	3
10 $\mu\text{M}$ Cytochalasin B (1,8 mM $\text{Ca}^{2+}$ )	78,3 $\pm$ 5,5	3
10 $\mu\text{M}$ Cytochalasin D (1,8 mM $\text{Ca}^{2+}$ )	76,8 $\pm$ 1,6	3
1 $\mu\text{M}$ A 23187 (1,8 mM $\text{Ca}^{2+}$ )	37,0 $\pm$ 7,0	3
10 $\mu\text{M}$ A 23187 (1,8 mM $\text{Ca}^{2+}$ )	39,3 $\pm$ 6,5	3

*Tabelle 4: Quantifizierung des F-Aktin-Gehalts von Endothelzellen. Der F-Aktin-Gehalt wurde durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0,1 mM und bei 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  durch Cytochalasin B, Cytochalasin D und A 23187 gesenkt.*

Damit wurde gezeigt, daß eine niedrige extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, der Einfluß von Cytochalasin B und D und die durch A 23187 erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration die Menge des F-Aktins deutlich reduzierten. Cytochalasin B und Cytochalasin D erzielten dabei nahezu identische Wirkung.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte dargestellt werden, welchen Einfluß die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und das Aktin-Cytoskelett auf die durch VE-Cadherin vermittelte Adhäsion von Endothelzellen haben. Diese Einflußfaktoren wurden mit Hilfe der Laserpinzetten-Technik untersucht, indem die Bindungshäufigkeit von mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen an Endothelzellen bestimmt wurde. Dabei wurde einem nativen Zellverband ein definierter Bindungspartner in Form der beschichteten Mikroperlen zur Verfügung gestellt, mit dem die Funktion von VE-Cadherin isoliert untersucht werden konnte. Dieser Versuchsaufbau stellte eine neuartige Ergänzung zu den Methoden anderer Autoren dar, die verschiedene Eigenschaften von Cadherinen entweder mit Zellsystemen oder mit rekombinanten Proteinen untersuchten (s. 4.3).

Das VE-Cadherin-Fc-Fusionsprotein wurde zuerst charakterisiert und seine erfolgreiche Kopplung an die Mikroperlen nachgewiesen (s. 4.1). Anschließend wurde festgestellt, daß die durch VE-Cadherin vermittelte Bindung zwischen Mikroperlen und Endothelzellen spezifisch (s. 4.2) und von Veränderungen der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (s. 4.3) und des Aktinfilamentsystems (s. 4.4) direkt abhängig war. Diese Ergebnisse eröffnen einen Ausblick auf weitere Einsatzmöglichkeiten der Laserpinzetten-Technik (s. 4.5).

### 4.1 Charakterisierung des VE-Cadherin-Fc-Fusionsproteins

Um die Eigenschaften des VE-Cadherin-Fc-Fusionsproteins zu charakterisieren, wurde das Protein über eine Protein A-Agarose-Säule aufgereinigt und im Western Blot dargestellt. Dabei wurden die theoretisch ermittelten Eigenschaften der Chimäre durch die Versuchsergebnisse bestätigt: Das errechnete Molekulargewicht (MG) stimmte mit dem experimentell ermittelten MG überein. Aus dem VE-Cadherin-Fc-Dimer konnte die Monomer-Form isoliert werden. Monomer und Dimer wurden sowohl von einem monoklonalen humanen Antikörper gegen den Fc-Teil der Chimäre als auch von dem Hybridoma-Überstand, der gegen den VE-Cadherin-Anteil der Chimäre gerichtet war, erkannt. Damit war gewährleistet, daß das Fusionsprotein Eigenschaften von nativem

VE-Cadherin besaß und für eine homophile Interaktion mit VE-Cadherin-Molekülen der Endothelzellen zur Verfügung stand.

Die ELISA-Ergebnisse zeigten, daß die Kopplung von VE-Cadherin-Fc an die Latex-Mikroperlen erfolgreich durchgeführt werden konnte. Folglich konnten die beschichteten Mikroperlen den Endothelzellen als Bindungspartner gegenübergestellt werden.

#### **4.2 Latex-Mikroperlen binden spezifisch über VE-Cadherin an Endothelzellen**

Es wurden verschiedene Experimente durchgeführt, um sicherzustellen, daß die Bindung der Mikroperlen an die Endothelzellen ausschließlich durch VE-Cadherin vermittelt wurde: Eine Beschichtung der Mikroperlen mit humanen IgG-Molekülen führte zu einer deutlich geringeren Bindungshäufigkeit als Kontrollexperimente mit einer VE-Cadherin-Fc-Beschichtung. Wurde dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Adhäsionsmolekül an die Mikroperlen gekoppelt, konnte die Interaktion mit VE-Cadherin-Molekülen der Endothelzellen durch eine Senkung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration reduziert werden. Die Bindungshäufigkeit der mit humanen IgG-Molekülen beschichteten Mikroperlen war dagegen unabhängig von der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.

Durch Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper Ratte-IgG<sub>2a</sub> 11D4.1 (Hybridoma-Überstand) wurde die VE-Cadherin-vermittelte Interaktion zwischen Mikroperlen und Endothelzellen partiell inhibiert. Corada et al. (2001) beschrieben drei Mechanismen, durch die monoklonale Antikörper die durch VE-Cadherin vermittelte Adhäsion beeinflussen können: Die Bindung eines monoklonalen Antikörpers kann zu einer Konformationsänderung von VE-Cadherin führen, wodurch sein aminoterminal Ende nicht mehr für eine homophile Bindung zur Verfügung steht. Ein zweiter denkbarer Mechanismus ist die Auslösung einer sterischen Änderung von VE-Cadherin, so daß die reißverschlußartige Interaktion von VE-Cadherin-Molekülen benachbarter Zellen verhindert wird. Ein dritter Mechanismus besteht darin, daß reißverschlußartig angeordnete Cadherine multiple Adhäsionskontakte entlang ihrer extrazellulären Domäne eingehen, von denen einer durch einen monoklonalen Antikörper blockiert werden kann. Dies könnte die Bindung zwischen Cadherin-Molekülen schwächen und eine Auflösung von Zellkontakten bewirken.

Alle drei dargestellten Mechanismen der Interaktion zwischen einem monoklonalen Antikörper und Cadherin-Molekülen können auch als Erklärung für die hier vorgestellten Ergebnisse der Laserpinzetten-Experimente dienen. Da der Hybridoma-Überstand in den unterschiedlichen Versuchsansätzen (s. 3.2) die VE-Cadherin-Interaktion nicht weiter als auf 61-72,5 % gegenüber Kontrollverhältnissen reduzierte, wurde vermutet, daß die durch VE-Cadherin vermittelte Bindung zwischen Mikroperlen und Endothelzellen durch Faktoren bedingt war, die durch den Hybridoma-Überstand nur teilweise inhibiert wurden.

### **4.3 Direkte Abhängigkeit der VE-Cadherin-Interaktion von der extrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration**

Als erster Einflußfaktor auf die VE-Cadherin-Interaktion wurde die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration untersucht.

Durch Zugabe von EGTA zu dem Zellkulturmedium ließ sich die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf verschiedene Werte titrieren. Es konnte festgestellt werden, daß die Bindungshäufigkeit der Mikroperlen nicht linear oder exponentiell mit steigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zunahm, sondern daß sie einer hoch kooperativen, s-förmigen Titrationskurve mit einem starken Anstieg ab einer Konzentration von 0,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  entsprach. Ab dieser Konzentration erreichte die Bindungshäufigkeit schnell ein Maximum bei 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  und fiel bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen  $> 2,0$  mM wieder ab. Dieser Abfall wurde damit erklärt, daß Konzentrationen von 2,0 und 2,3 mM  $\text{Ca}^{2+}$  jenseits der physiologischen Grenze lagen und für die Zellen toxisch wirken konnten.

Durch den kombinierten Einsatz von nativen Zellen und rekombinantem VE-Cadherin wurde damit nachgewiesen, daß unterschiedliche extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen die Interaktion zwischen VE-Cadherin-Molekülen direkt beeinflussten. Der Anstieg der Bindungshäufigkeit von mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen ab einer extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0,8 mM stimmte mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein. Diese machten Aussagen über native Zellsysteme oder über rekombinante Cadherin-Moleküle:

Baumgartner et al. (2000) zeigten mit der Atomkraftmikroskopie (AFM) unter Verwendung von rekombinantem VE-Cadherin, daß sich die Bindungsaktivität von VE-

Cadherin durch eine s-förmige Kurve mit einer halbmaximalen Bindungsaktivität ( $K_D$ ) bei 1,15 mM  $Ca^{2+}$  darstellen ließ. Die Bindungsaktivität nahm ab einer extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration von 0,8 mM stark zu und erreichte bei  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen  $> 1,2$  mM ihr Maximum. Diese Ergebnisse stimmen weitgehend mit den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Laserpinzetten-Experimenten überein.

Pertz et al. (1999) entdeckten an rekombinanten E-Cadherin-Chimärproteinen, daß ab einer Konzentration von 1,0 mM  $Ca^{2+}$  eine Trans-Interaktion zwischen den chimären Cadherinen auftrat, während bei niedrigeren  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen von 0,5-1,0 mM nur eine Cis-Dimerisierung, aber keine Trans-Interaktion, auftrat. Eine  $Ca^{2+}$ -Konzentration von 50-100  $\mu$ M führte zu einer Stäbchen-artigen Struktur chimärer E-Cadherin-Moleküle ohne Cis- oder Trans-Interaktion.

Shasby und Shasby (1986) und Lampugnani et al. (1992) beschrieben an Zellverbänden, daß bei  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen unter 1,0 mM die parazelluläre Permeabilität des Endothels stark anstieg.

Gao et al. (2000) wiesen in vivo nach, daß eine Depletierung der extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration mit EDTA ( $> 1$  mM) zu einer gesteigerten Permeabilität in der Mikrozirkulation der Lunge führte, die 5-7 min nach EDTA-Zugabe auftrat und durch die Wiederherstellung der ursprünglichen  $Ca^{2+}$ -Konzentration nach 20 min reversibel war. Mit Immunfluoreszenz-Experimenten an einer Zellmonolage wurde gezeigt, daß VE-Cadherin nach Inkubation mit 2 mM EDTA (5 min) von den Zellkontakten verschwand und 40 min nach Wiederherstellung der Ausgangs- $Ca^{2+}$ -Konzentration wieder nachweisbar war. Es wurde gefolgert, daß der Verlust der VE-Cadherin-Interaktion zu einer Zunahme der Permeabilität führte. Dabei wies die schnelle Reversibilität der Beobachtungen darauf hin, daß der von den Zellkontakten dissoziierte VE-Cadherin-Catenin-Komplex intakt blieb und sich innerhalb von Minuten wieder an den Zellkontakten anreichern konnte. VE-Cadherin schien so  $Ca^{2+}$ -abhängig die Permeabilität dynamisch regulieren zu können.

Lampugnani et al. (1995) machten ähnliche Beobachtungen, indem sie 5 min nach Inkubation einer Zellmonolage mit EGTA ein Verschwinden von VE-Cadherin zusammen mit dem Komplex der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenine von den Zellkontakten nachwiesen. Dabei löste sich der VE-Cadherin-Catenin-Komplex von dem Aktin-

Cytoskelett. 45 min nach Wiederherstellung der physiologischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration waren VE-Cadherin und die Catenine wieder an Zellkontakten vorhanden.

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit traten bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von 0,3 mM und 0,1 mM große Schwankungen zwischen einzelnen Meßergebnissen auf, die in zwei Bereiche eingeteilt werden konnten. Dabei fiel auf, daß niedrige Meßwerte (20-30 % haftende Mikroperlen) nur dann erhalten wurden, wenn die Zellen vorher ausgiebig mit 0,3 mM oder 0,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem DMEM gespült worden waren (3x2 min; vgl. auch Gao et al., 2000). Bei nicht ausreichendem Mediumwechsel war die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration offensichtlich noch nicht auf die angestrebte Konzentration abgefallen, so daß 47-67 % der Mikroperlen an den Endothelzellen hafteten.

Einen weiteren Einflußfaktor konnten die äußeren Meßbedingungen darstellen, die nicht den Verhältnissen im Brutschrank (37°C, 5 % (v/v)  $\text{CO}_2$ ) entsprachen, sondern bei 20°C durchgeführt wurden. Den Versuchsbedingungen bei 20°C wurde aber kein entscheidender Einfluß zugemessen, weil sie von den Zellen bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen > 0,8 mM auch über längere Zeit toleriert wurden. Baumgartner bestätigte diese These, indem er Kontrollversuche unter Brutschrankbedingungen (37°C, 5 % (v/v)  $\text{CO}_2$ ) durchführte (bisher unveröffentlichte Daten).

Mit der Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, daß sich VE-Cadherin bei einer extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0,3 mM diffus über die Zelle verteilte und von Zell-Zell-Kontakten verschwand. Die Zellkontakte wurden in den Laserpinzetten-Experimenten durch die Zugabe von mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen auf Endothelzellen simuliert. Die geringe Bindungshäufigkeit dieser Mikroperlen bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von 0,1 mM und 0,3 mM wurde daher wahrscheinlich durch die diffuse Verteilung der VE-Cadherin-Moleküle der Endothelzellen bedingt, die nicht mehr für die Ausbildung von Kontakten zwischen Zellen und Mikroperlen zur Verfügung standen.

In der Fluoreszenzmikroskopie ließen sich bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0,3 mM keine signifikanten Veränderungen am Aktinfilamentsystem nachweisen. Es traten keine Lücken in der Zellmonolage auf (vgl. Navarro et al., 1995). Lampugnani et al. (1995) beobachteten bei Anwesenheit von 5 mM EGTA vereinzelt Lücken im Zellrasen, Shasby et al. (1986) beobachteten bei Anwesenheit von 2 mM EGTA eine Zelldissoziation, die von einer Retraktion des peripheren Aktinfilamentsystems begleitet

war. Diese Arbeiten wurden mit Zellmedium ohne Zusatz von Serum durchgeführt. Schnittler et al. (1997) wiesen darauf hin, daß Serumbestandteile für eine konfluente Zellmonolage von wichtiger Bedeutung sind. Die Abwesenheit von Serum stellt damit neben der niedrigen extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration einen weiteren unphysiologischen Einflußfaktor dar, der die Ergebnisse von Experimenten mit Serum-freiem Zellmedium nur eingeschränkt aussagefähig macht.

#### **4.4 Direkter Einfluß des Aktinfilamentsystems auf die VE-Cadherin-Interaktion**

Als zweiter wichtiger Einflußfaktor auf die VE-Cadherin-Interaktion wurde das Aktinfilamentsystem untersucht. Das Aktin-Cytoskelett läßt sich in drei verschiedene Abschnitte einteilen: In das kortikale Netzwerk, in das mit Adhärenskontakten assoziierte Aktin-Cytoskelett und in Aktin-Streßfasern (Drenckhahn und Ness, 1997). Die einzelnen Abschnitte haben unterschiedliche Aufgaben, wobei das mit Adhärensjunctionen assoziierte Aktin-Cytoskelett für die Funktion von VE-Cadherin am wichtigsten ist.

Hordijk et al. (1999) beschrieben anhand von Experimenten über die Leukozyten-Transmigration durch eine Monolage aus Endothelzellen, daß sich VE-Cadherin und Aktin-Streßfasern wechselseitig beeinflussen. Eine Inhibition der extrazellulären VE-Cadherin-Bindung führte dabei zu einer Reduktion der Aktin-Streßfasern und zu einer Anreicherung von F-Aktin im kortikalen Netzwerk des Cytoskeletts. Eine vermehrte Ausbildung der Aktin-Streßfasern verstärkte hingegen die durch VE-Cadherin vermittelte Zelladhäsion.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls deutlich, daß eine Reduktion von F-Aktin durch 10  $\mu\text{M}$  Cytochalasin B oder 10  $\mu\text{M}$  Cytochalasin D die Bindungseigenschaften von VE-Cadherin entscheidend veränderte: Es resultierte eine schwächere Haftung der mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen. Die Interaktion der Mikroperlen mit den Endothelzellen war dabei ausschließlich durch VE-Cadherin vermittelt. Es konnte gefolgert werden, daß ein intaktes Aktinfilamentsystem direkt die durch VE-Cadherin vermittelte Adhäsion beeinflusste.

Da Cytochalasin B nicht nur die Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin verhindert, sondern auch ein Einfluß auf Glucose-Transporter der Zellmembran diskutiert wird,

wurden außerdem Versuche mit Cytochalasin D durchgeführt. Für Cytochalasin D ist keine Nebenwirkung an anderen Transportsystemen der Zelle bekannt. Die wesentlich stärkere Wirkung von Cytochalasin D in den Laserpinzetten-Experimenten konnte daher auf die spezifischere Zerstörung des Aktin-Cytoskeletts zurückgeführt werden.

Bei der Quantifizierung des F-Aktin-Gehalts der Endothelzellen wurden bei Anwesenheit von Cytochalasin B 78,3 % F-Aktin, bei Anwesenheit von Cytochalasin D 76,8 % F-Aktin gegenüber Kontrollbedingungen gemessen. Dieser Reduktion von F-Aktin entsprachen die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie. Hier war das Aktinfilamentsystem der Zellen unter dem Einfluß von Cytochalasin B oder Cytochalasin D zu punktförmigen Flecken aggregiert. Eine Zelldissoziation konnte nicht festgestellt werden. VE-Cadherin stellte sich an den Zellgrenzen dar, allerdings war die Fluoreszenz nicht scharf begrenzt, sondern diffuser als unter Kontrollverhältnissen. In Verbindung mit den Ergebnissen der Laserpinzetten-Experimente wurde vermutet, daß das Aktin-Cytoskelett zur Verankerung von VE-Cadherin in der Zellmembran beitrug: Wurde die Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin durch Cytochalasine verhindert, konnten sich VE-Cadherin-Moleküle diffus in der Zellmembran verteilen. Dabei wurde die Fähigkeit, die mit VE-Cadherin-Fc beladenen Mikroperlen zu binden, reduziert.

Sowohl die diffuse VE-Cadherin-Fluoreszenz bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0,3 mM als auch die unscharfe randständige Fluoreszenz unter dem Einfluß von Cytochalasin B und D konnten nur bei einem Zellalter von 2-3 d (0-1 d nach Erreichen von Konfluenz) beobachtet werden. Bei einem Zellalter von 4-7 d (2-5 d nach Erreichen von Konfluenz) hingegen wurde eine scharf begrenzte randständige Fluoreszenz erhalten, die den Kontrollbedingungen in DMEM mit 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  entsprach.

Navarro et al. (1995) untersuchten ebenfalls den Einfluß des Aktin-Cytoskeletts auf VE-Cadherin. Sie konnten feststellen, daß eine homophile Interaktion zwischen VE-Cadherinen benachbarter Zellen unabhängig von der Bindung an das Aktin-Cytoskelett zustande kam, daß aber die Verankerung der Cadherine an das Aktinfilamentsystem über die Catenine eine entscheidende Bedeutung für die Permeabilität einer Zellmonolage und damit für die mechanische Stabilität der Zellkontakte hatte. Diese These wurde durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt. Navarro beobachtete aber unter dem Einfluß von Cytochalasin D keine diffuse

Immunfluoreszenz von VE-Cadherin und formulierte daher, daß das Aktin-Cytoskelett nicht entscheidend für die durch VE-Cadherin vermittelte Adhäsion war. Diese Beobachtungen standen in einem scheinbaren Gegensatz zu den Ergebnissen, die die Fluoreszenzmikroskopie dieser Arbeit ergab. Die Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse konnte in der oben beschriebenen Zeitabhängigkeit der Immunfluoreszenz-Ergebnisse gefunden werden. Navarro verwendete Zellen, die in 4-5 d zu einer konfluenten Monolage gewachsen waren, während eine diffuse Fluoreszenz von VE-Cadherin in dieser Arbeit nur an Zellen gefunden wurde, die nach 2-3 d Konfluenz erreicht hatten.

Die VE-Cadherin-Interaktion scheint ein dynamischer Prozeß zu sein, der abhängig vom Zellalter und abhängig von der Zeit, die zur Ausbildung der Adhärenskontakte zur Verfügung steht, unterschiedliche Eigenschaften besitzt. Dabei sind die unterschiedlichen Faktoren, die zu einer vermehrten Stabilität der durch VE-Cadherin vermittelten Adhäsion beitragen, noch nicht vollständig bekannt.

Bereits in früheren Arbeiten wurde auf die Dynamik von Cadherin-Interaktionen und auf unterschiedliche Stadien hingewiesen, die Konsequenzen für die Stabilität der Zellverbindungen haben:

Yap et al. (1997) zeigten an C-Cadherin, daß die Stabilität von Cadherin-Kontakten abhängig von der Zeit, die zur Ausbildung der Kontakte zur Verfügung stand, zunahm.

Lampugnani et al. (1997) fanden bei einer gerade konfluenten Zellmonolage eine ausgeprägte intrazelluläre Phosphorylierung von VE-Cadherin, das in diesem Stadium hauptsächlich mit  $\beta$ -Catenin und p120 assoziiert war. Die Phosphorylierung nahm hingegen bei einer dicht gewachsenen Zellmonolage stark ab. VE-Cadherin war nun vor allem mit Plakoglobin verbunden. Abhängig von der Phosphorylierungsrate und der molekularen Zusammensetzung konnte daher zwischen einem Initialstadium und einem Reifestadium der Adhärenskontakte unterschieden werden. In dem Reifestadium wurde die volle mechanische Belastbarkeit der Adhärensjunktionen erreicht. Zuerst lagen ein Komplex aus VE-Cadherin,  $\alpha$ -Catenin und  $\beta$ -Catenin vor, später vermittelte Plakoglobin eine Verstärkung der Zellkontakte (Lampugnani et al., 1997).

Schnittler et al. (1997) konnten in Scherstreß-Versuchen mit Endothelzellen nachweisen, daß die Stabilität der durch VE-Cadherin vermittelten Zellkontakte bei Abwesenheit von Plakoglobin nicht durch  $\beta$ -Catenin kompensiert werden konnte.

Die Phosphorylierung von VE-Cadherin und der assoziierten Catenine konnte auch durch Wachstumsfaktoren induziert werden (Esser et al., 1998). Dies führte zu einer Erhöhung der parazellulären Permeabilität und zu einer Schwächung der Zellkontakte. Dadurch könnten einzelne Prozesse der Angiogenese wie die Wanderung von Zellen und die Reorganisation von Zellverbänden gefördert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde neben dem Einfluß von Cytochalasinen auch der Einfluß des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors A 23187 auf die Aktin-vermittelte Regulation von VE-Cadherin untersucht.

Der Wirkmechanismus von A 23187 auf das Aktin-Cytoskelett wurde bisher durch zwei Mechanismen erklärt:

Schnittler et al. (1990) beschrieben, daß A 23187 die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erhöhte, die zu einer Erhöhung der Permeabilität und zur Dissoziation benachbarter Zellen führte. Sie vermuteten einen Wirkmechanismus, bei dem die erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängigen Phosphorylierung von Myosin führte. Die Phosphorylierung von Myosin war an dem Aktin-Myosin-abhängigen Kontraktionsmechanismus beteiligt, der zu einer Dissoziation von Zell-Zell-Kontakten führte.

Als einen zweiten Mechanismus für die durch A 23187 ausgelöste Dissoziation von Zell-Zell-Kontakten zeigten Kuhne et al. (1993), daß die durch A 23187 erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu einer Fragmentation (nicht aber Depolymerisierung) von F-Aktin führte, an der das Protein Gelsolin beteiligt war.

In den Laserpinzetten-Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde die VE-Cadherin-vermittelte Interaktion zwischen Mikroperlen und Endothelzellen in Anwesenheit von A 23187 deutlich reduziert. Die Fluoreszenzmikroskopie zeigte eine diffuse Fluoreszenz von VE-Cadherin und eine reduzierte Darstellung des Aktin-Cytoskeletts. Die verminderte Fluoreszenz des Aktin-Cytoskeletts deckte sich mit der unter dem Einfluß von A 23187 gemessenen Reduktion des F-Aktin-Gehalts der Endothelzellen. Es wurde vermutet, daß die Veränderung am Aktinfilamentsystem zu einer diffusen Verteilung

von VE-Cadherin in der Zellmembran führte, die die Interaktion mit den VE-Cadherin-Fc-Molekülen der Mikroperlen schwächte.

Es fiel auf, daß der F-Aktin-Gehalt der Endothelzellen durch A 23187 deutlich stärker reduziert wurde als in Anwesenheit von Cytochalasin B oder Cytochalasin D. Die Bindungshäufigkeit von mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen war jedoch in den Versuchen mit 1 µM A 23187 (78,2 %) und 10 µM Cytochalasin B (66,5 %) bzw. in den Versuchen mit 10 µM A 23187 (34,4 %) und 10 µM Cytochalasin D (33,3 %) vergleichbar.

Diese Beobachtungen wurden wie folgt erklärt:

Durch die Bindung zwischen VE-Cadherin-Molekülen der Mikroperlen und der Zellmembran der Endothelzellen wurde ein neu entstehender Zell-Zell-Kontakt simuliert. Dieser Kontakt wurde durch sich neu ausbildendes F-Aktin stabilisiert. Unter A 23187 kommt es hauptsächlich zu einer Fragmentation von neu gebildeten und von bereits bestehenden Aktinfilamenten. Cytochalasine hemmen dagegen vor allem die Polymerisierung von Aktin. Durch diese unterschiedlichen Wirkmechanismen ließ sich erklären, warum die stärkere Reduktion des F-Aktingehalts der Endothelzellen durch A 23187 im Vergleich zu den Cytochalasinen nicht zu einem stärkeren Abfall der Bindungshäufigkeit von mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen führte.

#### **4.5 Ausblick**

Durch die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden neue Erkenntnisse über die Regulationsmechanismen von VE-Cadherin gewonnen:

- die Kontakte zwischen mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen und VE-Cadherin-Molekülen von Endothelzellen werden durch den Polymerisationsgrad des Aktin-Cytoskeletts und durch die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration direkt reguliert
- mit der Laserpinzetten-Technik ergibt sich die Möglichkeit, Proteinen in einem nativen Zellsystem einen definierten rekombinanten Bindungspartner gegenüber zu stellen, um die Eigenschaften dieser Proteine isoliert zu untersuchen.

Durch eine Weiterentwicklung dieser Methode wäre es möglich, genaue Kraftmessungen an VE-Cadherin durchzuführen und den Einfluß verschiedener

Signalwege auf die Bindungsstärke zwischen mit VE-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen und VE-Cadherin-Molekülen der Zellmembran zu charakterisieren.

Die Laserpinzetten-Technik kann außerdem neue Möglichkeiten eröffnen, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit von Cadherinen anderer Zellen näher zu klassifizieren:

Murase und Schuman (1999) beschrieben eine Beteiligung von Cadherinen an der neuronalen Plastizität und Langzeit-Potenzierung im Hippocampus, bei der die Kommunikation zwischen prä- und postsynaptischen Zellen sowie die Ausbildung neuer Synapsen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig gesteuert werden. Untersuchungen über die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Trans-Interaktion zwischen neuronalen Cadherinen (N-Cadherin) fehlen bisher. Durch die Laserpinzettenteknik könnte eine Klärung dieser Frage erzielt werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Barriereigenschaften des Gefäßendothels werden durch Verschluß- und Adhärenskontakte vermittelt. Das  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zelladhäsionsmolekül VE-Cadherin vermittelt in Adhärenskontakten die Adhäsion benachbarter Endothelzellen. Es wurde vermutet, daß die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und das intrazelluläre Aktinfilamentsystem die Adhäsionseigenschaften von VE-Cadherin verändern können. Daher wurden diese Einflußfaktoren mit Hilfe der Laserpinzetten-Technik untersucht. Hierzu wurden Latex-Mikroperlen mit rekombinanten VE-Cadherin-Fc-Molekülen beschichtet, die damit an VE-Cadherin-Moleküle von Endothelzellen binden und Zell-Zell-Kontakte simulieren konnten.

Es zeigte sich, daß die ausschließlich durch VE-Cadherin vermittelte Interaktion zwischen Mikroperlen und Endothelzellen direkt von der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abhängig war und sich durch eine s-förmige Titrationskurve beschreiben ließ: Die Bindungshäufigkeit der Mikroperlen war bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen nahe 0,0 mM gering (26-27 %), nahm ab 0,8 mM stark zu (38 %) und erreichte bei 1,8 mM ein Maximum (65 %). Halbmaximale Bindung ( $K_D$ ) wurde bei 1,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  erreicht. Die Bindung war hochkooperativ (Hill Koeffizient  $n_H = 4,6$ ).

Um die Eigenschaften des Aktinfilamentsystems zu verändern, wurden die Zellen mit Cytochalasin B, Cytochalasin D und dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor A 23187 inkubiert. Dabei nahm die Bindungshäufigkeit der Mikroperlen deutlich gegenüber Kontrollbedingungen ab. Es wurde gefolgert, daß ein intaktes Aktinfilamentsystem unmittelbar die Interaktion zwischen VE-Cadherin-Molekülen stärkte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern damit neue Erkenntnisse über die Eigenschaften von VE-Cadherin: Die Adhäsion dieses Moleküls wird im physiologischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bereich reguliert und ist direkt von einem intakten Aktinfilamentsystem abhängig. Es ist vorstellbar, daß die durch VE-Cadherin vermittelten Barriereigenschaften des Endothels in vivo durch ähnliche Mechanismen reguliert werden. Ein Abfall der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Interzellularspalt unter den für die Adhäsion kritischen Wert von 1,1 mM könnte durch Agonist-vermittelte Öffnung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen erfolgen. Eingeströmtes  $\text{Ca}^{2+}$  könnte seinerseits über Aktivierung von Gelsolin zur Fragmentation von Aktinfilamenten führen und so die Adhäsion weiter schwächen.

## 6 Literaturverzeichnis

**Aberle, H., Schwartz, H., Kemler, R.** (1996). Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J. Cell Biochem.* **61**: 514-523

**Anderson, D., Peterson, C.** (1981). High resolution electrophoresis of proteins in SDS polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **81**: 41-48

**Andriopoulou, P., Navarro, P., Zanetti A., Lampugnani, M. G., Dejana, E.** (1999). Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**: 2286-2297

**Baumgartner, W., Hinterdorfer, P., Ness, W., Raab, A., Vestweber, D., Schindler, H., Drenckhahn, D.** (2000). Cadherin interaction probed by atomic force microscopy. *PNAS* **97** (8): 4005-4010

**Behrens, J., von Kries J. P., Kuhl M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedel, R., Bichmeier, W.** (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**: 638-642

**Benninghoff, A.** (1994). *Anatomie*. Band 1, 15. Auflage. Hrsg. Drenckhahn, D., Zenker, W.; Urban und Schwarzenberg, München

**Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **112**: 248-254

**Breier, G., Breviario, F., Caveda, L., Berthier, R., Schnürch, H., Gotsch, U., Vestweber, D., Risau, W., Dejana, E.** (1996). Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood* **87**: 630-641

**Breviario, F., Caveda, L., Corada, M., Martin-Padua, 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

**Brieher, W. M., Yap, A. S., Gumbiner, B. M.** (1996). Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-cadherin. *J. Cell Biol.* **135** (2): 487-496

**Burnette, W. N.** (1981). Western blotting. Electrophoretic transfer from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**: 195-203

**Caveda, L., Martin-Padura, I., Navarro, P., Breviario, F., Corada, M., Gulino, D., Lampugnani, M. G., Dejana, E.** (1996). Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin). *J. Clin. Invest.* **98** (4): 886-893

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

**Corada, M., Liao, F., Lindgren, M., Lampugnani, M. G., Breviario, F., Frank, R., Muller, W. A., Hicklin, D. J., Bohlen, P., Dejana, E.** (2001). Monoclonal antibodies to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability. *Blood* **97** (6): 1679-1684

**Curry, F. E., Joyner, W. L., Rutledge, J. C.** (1990). Graded modulation of frog microvessel permeability to albumin using ionophore A 23187. *Am. J. Physiol.* **258**: H587-H598

**Daniel, J. M., Reynolds, A. B.** (1995). The tyrosine kinase substrate p120 cas binds directly to E-cadherin but not to the adenomatous polyposis coli protein or  $\alpha$ -catenin. *Mol. Cell Biol.* **15**: 4819-4824

**Del Maschio, A., Zanetti, A., Corada, M., Rival, Y., Ruco, L., Lampugnani, M.G., Dejana, E.** (1996). Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganisation of endothelial cell to cell adherens junctions. *J. Cell Biol.* **135**: 497-510

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

**Dejana, E.** (1996). Endothelial adherens junctions: Implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* **98 (9)**: 1949-1953

**Dejana, E., Bazzoni, G., Lampugnani, M. G.** (1999). Vascular endothelial (VE)-cadherin: Only an intercellular glue? *Experimental Cell Research* **252**: 13-19

**Dieckmann-Schuppert, A., Schnittler, H.** (1996). A simple assay for quantification of protein in tissue sections, cell cultures, and cell homogenates, and of protein immobilized on solid surfaces. *Cell Tissue Res.* **288**: 119-126

**Drenckhahn, D., Ness, W.** (1997). The endothelial contractile cytoskeleton. In: *Vascular Endothelium: Physiology, Pathology and Therapeutic Opportunities* (G. V. R. Born/C. J. Schwartz, Eds.). New Horizon Series **3**: 1-25 (Schattauer, Stuttgart)

**Esser, S., Lampugnani, M. G., Corada, M., Dejana, E., Risau, W.** (1998). Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J. Cell Sci.* **111**: 1853-1865

**Gao, X., Kouklis, P., Xu, N., Minshall, R. D., Sandoval, R., Vogel, S. M., Malik, A. B.** (2000). Reversibility of increased microvessel permeability in response to VE-cadherin disassembly. *Am. J. Physiol.* **279**: L1218-L1225

**Gotsch, U., Borges, E., Bosse, R., Böggemeyer, E., Simon, M., Mossmann, H., Vestweber, D.** (1997). VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J. Cell Sci.* **110**: 583-588

**Golenhofen, N., Drenckhahn, D.** (1999). Herstellung und Charakterisierung einer mikrovaskulären Endothelzell-Linie, myEnd, aus dem Myokard der Maus. *Annals of Anatomy* 181 Suppl., Seite 263

**Gulino, D., Delachanal, E., Concord, E., Genoux, Y., Morand, M., Valiron, M.-D., Sulpice, E., Scaife, R., Alemany, M., Vernet, T.** (1998). Alteration of endothelial integrity triggers resynthesis of vascular endothelium cadherin. *J. Biol. Chem.* **273**: 29786-29793

**Heimark, R. L., Degner, M., Schwartz, S. M.** (1990). Identification of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent cell-cell adhesion molecule in endothelial cells. *J. Cell Biol.* **110**: 1745-1756

**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

**Huber, O., Korn, R., McLaughlin J., Ohsugi, M., Herrmann, B. G., Kemler, R.** (1996). Nuclear localisation of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech. Dev.* **59**: 3-10

**Huber, P., Dalmon, J., Engiles, J., Breviario, F., Gory, S., Buchberg, A. M., Dejana, E.** (1996). Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse VE-cadherin gene (Cdh5). *Genomics* **32**: 21-28

**Kemler, R.** (1993). From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.* **9**: 317-321

**Klymkowski, M. W., Parr, B.** (1995). The body language of cells: the intimate connection between cell adhesion and behaviour. *Cell* **83**: 5-8

**Kuhne, W., Besselmann, M., Noll, T., Watanabe, H., Piper, H. M.** (1993). Disintegration of cytoskeletal structure of actin filaments in energy-depleted endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **264**: H1599-H1608

**Kyhse-Anderson, J.** (1984). Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**: 203-209

**Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

**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 organisation of endothelial cell to cell junctions: Differential association of plakoglobin,  $\beta$ -catenin, and  $\alpha$ -catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J. Cell Biol.* **129**: 203-217

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

**Lampugnani, M. G., Dejana, E.** (1997). Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 674-682

**Legrand, P., Bibert, S., Jaquinod, M., Ebel, C., Hewat, E., Vincent, F., Vanbelle, C., Concord, E., Vernet, T., Gulino, D.** (2001). Self-assembly of the vascular endothelial cadherin ectodomain in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent hexameric structure. *J. Biol. Chem.* **276**, No. **5**: 3581-3588

**Martin-Padura, I., de Castellarnau, C., Uccini, S., Pilozi, E., Natali, P. G., Nicotra, M. R., Ughi, F., Azzolini, C., Dejana, E., Ruco, L.** (1995). Expression of VE (Vascular Endothelial)-cadherin and other endothelial specific markers in haemangiomas. *J. Pathol.* **175**: 51-57

**Miyamoto, Y., Kuroda, M., Munekata, E., Masaki, T.** (1986). Stoichiometry of actin and phalloidin binding: One molecule of the toxin dominates two actin subunits. *J. Biochem.* **100** (6): 1677-1680

**Murase, S., Schuman, E. M.** (1999). The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 549-553

**Overduin, M., Harvey, T. S., Bagby, S., Tong, K. I., Yau, P., Takeichi, M., Ikura, M.** (1995). Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science* **267**: 386-389

**Navarro, P., Caveda, L., Breviario, F., Mandoteanu, I., Lampugnani, M. G., Dejana, E.** (1995). Catenin dependent and -independent functions of vascular endothelial cadherin. *J. Biol. Chem.* **270**: 30965-30972

**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**: 1167-1178

**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

**Pertz, O., Bozic, D., Koch, A. W., Fauser, C., Brancaccio, A., Engel, J.** (1999). A new crystal structure,  $\text{Ca}^{2+}$  dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J.* **18** (7): 1738-1747

**Petzelbauer, P., Halama, T., Gröger, M.** (2000). Endothelial adherens junctions. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* **5**: 10-13

**Rabiet, M.-J., Plantier, J.-L., Rival, Y., Genoux, Y., Lampugnani, M. G., Dejana, E.** (1996). Thrombin induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**: 488-496

**Salinovich, O., Montelaro, R. C.** (1986). Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **156**: 341-347

**Schnittler, H.-J., Wilke, A., Gress, T., Suttorp, N., Drenckhahn, D.** (1990). Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium. *J. Physiol.* **431**: 379-401

**Schnittler, H.-J., Püschel, B., Drenckhahn, D.** (1997). Role of cadherins and plakoglobin in interendothelial adhesion under resting conditions and shear stress. *Am. J. Physiol.* **273**: H 2396-H 2405

**Shapiro, L., Fannon, A. M., Kwong, P. D., Thompson, A., Lehman, S. M., 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

**Shasby, D. M., Shasby, S. S.** (1986). Effects of calcium on transendothelial albumin transfer and electrical resistance. *J. Appl. Physiol.* **60**: 71-79

**Suttorp, N., Fuchs, T., Seeger, W., Wilke, A., Drenckhahn, D.** (1989). Role of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  for endothelial permeability of water and albumin in vitro. *Laboratory Investigation* Vol. 61, No. 2, p. 183

**Suzuki, S., Sano, K., Tanihara, H.** (1991). Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue. *Cell Regul.* **2**: 261-270

**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

**Vestweber, D.** (2000). Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts. *J. Pathol.* **190**: 281-291

**Vittet, D., Buchou, T., Schweitzer, A., Dejana, E., Huber, P.** (1997). Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organisation of vascular-like structures in embryoid bodies. *PNAS* **94**: 6273-6278

**Winter, M. C., Kamath, A. M., Ries, D. R., Shasby, S. S., Chen, Y.-T., Shasby, D. M.** (1999). Histamine alters cadherin-mediated sites of endothelial adhesion. *Am. J. Physiol.* **277**: L988-L995

**Wulf, E., Deboen, A., Bautz, F. A., Faulstich, H., Wieland, T.** (1980). Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualisation of cellular actin. *PNAS* **76**: 4498-4502

**Yap, A. S., Briehar, W. M., Pruschy, M., Gumbiner, B. M. (1997).** Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Curr. Biol.* **7:** 308-315

## **Danksagung**

Prof. Dr. D. Drenckhahn danke ich für die Überlassung des anspruchsvollen Themas, für die sorgfältige Korrektur der Arbeit sowie für die Gespräche und Unterstützung während der letzten Jahre.

Dr. Winfried Ness danke ich für die gründliche Einarbeitung in wissenschaftliche Arbeitsmethoden und für seine stets vorhandene, geduldige Gesprächsbereitschaft in freundlicher Atmosphäre.

Dr. Werner Baumgartner danke ich für die reibungslose Übernahme der Betreuung meiner Arbeit, für die großzügige technische Unterstützung und für seine ständige und freundliche, motivierende Gesprächsbereitschaft.

Fr. Dr. Nikola Golenhofen danke ich für die Überlassung der myEnd-Endothelzell-Linie.

Fr. Heike Arthen danke ich für die sorgfältige Einarbeitung in biochemische Arbeitsmethoden und für die Benutzung ihrer wertvollen Karteikartensammlung.

Fr. Agnes Weth und Fr. Rita Herrmann danke ich für wertvolle Unterstützung bei der Anlegung und Pflege von Zellkulturen.

Allen Mitarbeitern und Doktoranden des Arbeitskreises Prof. Dr. D. Drenckhahn danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre, für die unverzichtbaren Hilfestellungen im Laboralltag, für die zahlreichen Gespräche und für Motivation und Unterstützung auch in schwierigen Zeiten.

Die Arbeit wurde im Rahmen des SFB 487, Teilbereich B5, der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Meinen Eltern und meiner Familie danke ich für ihr Verständnis und ihre Unterstützung während meines Studiums und während meiner Promotion.

## Lebenslauf

- am 08.04.1976 geboren in Marburg als Sohn von Dr. Hanns-Jürgen Wiegand und Dr. Gisela Wiegand-Auerbach
- 1982 – 1986 Besuch der Grundschule Marburg-Marbach
- 1986 – 1988 Besuch der Förderstufe der Friedrich-Ebert-Schule Marburg
- 1988 – 1995 Besuch des Gymnasium Philippinum Marburg
- 10/1995 – 09/1998 Vorklinisches Studium und Studium des ersten klinischen Abschnitts an der Universität Marburg  
Ärztliche Vorprüfung 09/1997  
1. Staatsexamen 08/1998
- 10/1998 – 10/2000 Studium des zweiten klinischen Abschnitts an der Universität Würzburg  
2. Staatsexamen 09/2000
- 10/2000 – 09/2001 Praktisches Jahr  
1. Terial: Chirurgie, Chirurgische Universitätsklinik Würzburg  
2. Terial: Orthopädie  
02/2001 König-Ludwig-Haus, Würzburg  
03/2001 – 05/2001 University of Rochester, NY, USA  
03/2001 Physical Medicine and Rehabilitation  
04/2001- 05/2001 Externship in Orthopaedics  
3. Terial: Innere Medizin, Medizinische Poliklinik der Universität Würzburg  
3. Staatsexamen 11/2001
- seit 02/2002 Arzt im Praktikum am Zentrum Innere Medizin,  
Abt. Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover (Prof. Dr. M. P. Manns)