

Aus dem Institut für Anatomie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. D. Drenckhahn

„Die Bedeutung von Rho-Proteinen für Migration, Zellkontaktbildung
und Aktinfilamentdifferenzierung in Endothelzellen“

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Adrien Daigeler
aus Bullenheim

Würzburg, Juni 2001

Referent: Prof. Dr. med. D. Drenckhahn

Koreferent: Prof. Dr. med. P. Kugler

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

Tag der mündlichen Prüfung: 16. November 2001

Der Promovend ist Arzt im Praktikum

Gliederung und Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung.....	1
1.1 Das Gefäßendothel und seine Funktion	1
1.2 Das Aktinfilamentsystem der Endothelzelle	2
1.3 Kontaktproteine der Endothelzelle.....	5
1.4 Das kleine GTP-bindende Protein RhoA.....	9
2. Fragestellung.....	14
3. Material und Geräteverzeichnis.....	15
3.1 Präparation der Endothelzellen und Zellkultur.....	15
3.1.1 Medium	15
3.1.2 Plastikartikel	15
3.1.3 Enzyme	15
3.1.4 Deckgläser	15
3.1.5 Brutschrank	15
3.1.6 Zentrifugen.....	15
3.2 Mikroinjektion.....	16
3.2.1 Injektionskapillarenherstellung	16
3.2.2 Injektionsvorrichtung.....	16
3.2.3 Injektionslösungen.....	16
3.2.4 Pipettenspitzen	16
3.3 Fluoreszenzmikroskopie	17
3.3.1 Fixierungsreagenzien	17
3.3.2 Detergenzien.....	17
3.3.3 Absättigungsmittel.....	17
3.3.4 Primärantikörper	17
3.3.5 Sekundärantikörper.....	18

3.3.6 Aktinfärbemittel.....	18
3.3.7 Reagentien für die Fluoreszenzmikroskopie	18
3.3.8 Puffer	18
3.4 Mikroskope	19
3.5 Toxine, Inhibitoren.....	19
3.6 Gelatinieren der Deckgläser	19
4. Methoden	20
4.1 Gelatinieren der Deckgläser	20
4.2 Zellkultur	20
4.2.1 Präparation von Endothelzellen aus dem Truncus pulmonalis des Schweins (PPAEC).....	20
4.2.2 Abtrypsinieren	21
4.3 Mikroinjektion.....	21
4.3.1 Herstellung der Mikroinjektionskapillaren	21
4.3.2 Mikroinjektionstechnik.....	21
4.4 Fluoreszenzmikroskopie	23
4.4.1 Fixieren	23
4.4.2 Permeabilisieren	23
4.4.3 Absättigen	23
4.4.4 Antikörperinkubation.....	23
4.4.5 Phalloidin-TRITC-Färbung.....	24
4.4.6 Eindecken	24
5. Versuchsbeschreibungen	25
5.1 Der FCS/Lovastatin-Versuch	25
5.2 Der Toxin-B-Versuch.....	26
5.3 Der C3-Toxin-Versuch.....	27
6. Ergebnisse.....	27
6.1 Beschreibung der Kontrollzellen.....	27

6.1.1 Morphologie und Wanderungsverhalten.....	28
6.1.2 Aktinfilamentsystem	29
6.1.3 Zell-Zell-Kontaktproteine.....	31
6.1.4 Zell-Matrix-Kontaktproteine	32
6.2 Der FCS/Lovastatin-Versuch	34
6.2.1 Zellen in serumfreiem Medium ohne Lovastatinzugabe	34
6.2.1.1 Morphologie und Wanderungsverhalten	34
6.2.1.1 Aktinfilamentsystem	35
6.2.1.2 Zell-Zell-Kontaktproteine.....	35
6.2.1.3 Zell-Matrix-Kontaktproteine	35
6.2.2 Zellen in serumhaltigem Medium nach Lovastatinzugabe..	35
6.2.2.1 Morphologie und Wanderungsverhalten	35
6.2.2.2 Aktinfilamentsystem	35
6.2.2.3 Zell-Zell-Kontaktproteine.....	36
6.2.2.4 Zell-Matrix-Kontaktproteine	36
6.2.3 Zellen in serumfreiem Medium nach Lovastatinzugabe	37
6.3 Der Toxin-B-Versuch.....	39
6.3.1 Morphologie und Wanderungsverhalten.....	39
6.3.2 Aktinfilamentsystem	39
6.3.3 Zell-Zell-Kontaktproteine.....	40
6.3.4 Zell-Matrix-Kontaktproteine	41
6.4 Der C3-Toxin-Versuch.....	41
6.4.1 Morphologie und Wanderungsverhalten.....	42
6.4.2 Aktinfilamentsystem	42
6.4.3 Zell-Zell-Kontaktproteine.....	43
6.4.4 Zell-Matrix-Kontaktproteine	45
7. Diskussion	46
7.1 Der FCS/Lovastatinversuch	46
7.1.1 Zellen in serumfreiem Medium ohne Lovastatinzugabe	46
7.1.2 Zellen in serumhaltigem Medium nach Lovastatinzugabe..	47
7.1.3 Zellen in serumfreiem Medium nach Lovastatinzugabe	48
7.2 Der Toxin-B-Versuch.....	49
7.3 Der C3-Toxin-Versuch.....	51

8. Zusammenfassung 54

9. Literaturverzeichnis 57

11. Danksagung

10. Curriculum vitae

1. Einleitung

1.1 Das Gefäßendothel und seine Funktion

Gefäßendothelzellen bedecken die luminale Oberfläche des gesamten Blutgefäßsystems. Sie wachsen im dichten Verband und trennen den intravasalen Raum vom Interstitium. In dieser Position sind sie ständigen mechanischen Belastungen im Sinne von Scherstress durch das über sie hinwegfließende Blut, Druck, dem Blutdruck entsprechend und Dehnung und Stauchung durch die Elastizität der Gefäße ausgesetzt (Davies, 1995). Abgesehen von der mechanischen Beanspruchung interagieren die Endothelzellen aber auch auf molekularer Ebene mit Bestandteilen des Blutes und des Interstitiums. Das Endothel sendet Botenstoffe aus und reagiert im Gegenzug auf Signalstoffe der näheren und ferneren Umgebung.

So ist das Endothel Syntheseort des gefäßerweiternd wirkenden Stickstoffmonoxids (NO), des gefäßverengend wirkenden "angiotensin converting enzymes" und von Wachstumsfaktoren, wie dem "platelet-derived growth factor" (PDGF). Auch der Einfluß des Endothels auf das Blutgerinnungssystem ist von großer Bedeutung. Von Endothelzellen synthetisierte Faktoren wie beispielsweise der von-Willebrand-Faktor (VWF) oder der Faktor V sind unerlässlich für eine reguläre Blutgerinnung.

Im Gegenzug muß jedoch die intravasale Gerinnung verhindert werden. Dies geschieht durch die Synthese von Nexin, Heparanproteosulfan, Thrombomodulin und anderen Stoffen.

Die Zellen des Endothels bilden trotz ihrer Kompartimentierungsfunktion jedoch keine undurchdringliche Barriere. Einer Vielzahl von Stoffen und sogar ganzen Zellen wird der selektive Durchtritt durch das Endothel ermöglicht. Es besteht ein reger Austausch von Stoffen und Zellen zwischen intravasalem und interstitiellem Raum, den die Endothelzellen durch Endozytose, Lockerung der Zellkontakte untereinander oder das Zusammenfließen von intrazellulären Vesikeln zu Transportkanälen (Benninghoff I, 15.Aufl., S. 656) bewerkstelligen. Der Übertritt von Leukozyten ins Interstitium geschieht dagegen rezeptorvermittelt. Eine Reihe von im Endothel synthetisierten Oberflächenrezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) genannt, vermitteln zunächst die Anhaftung von Leukozyten und später deren Durchtritt.

Besonders bei pathologischen Prozessen wie Entzündungen oder Ödemen zeigt das Endothel eindrucksvoll, zu welchen Permeabilitätssteigerungen es fähig ist.

Eine vergleichbare Permeabilitätserhöhung im humanen Umbilikalvenendothel konnte im Versuch durch Blockierung der Rho-Proteine erreicht werden (Hippenstiel et al., 1997).

Darüber hinaus ist das Endothel fähig, Verletzungen durch Reendothelisierung zu schließen. Zusätzlich zu diesen Leistungen ist das Endothel mit seiner Lipoproteinlipase am Abbau von Blutfetten und an deren Aufnahme beteiligt.

Die Endothelzelle hat also eine Reihe von Aufgaben, die eine Anpassung des Zellstoffwechsels, aber auch der gesamten Zellmorphologie an die unterschiedlichen Gegebenheiten verlangt.

1.2 Das Aktinfilamentsystem der Endothelzelle

Die morphologische Wandlungsfähigkeit der Zelle ist Voraussetzung für beispielsweise eine Permeabilitätserhöhung oder die Heilungsfähigkeit des Endothels und wird durch das die Zelle durchziehende System von kontraktilen und stützenden Zytoskelettelementen gewährleistet. Das endotheliale Aktin-Myosin-System, das die Fähigkeit zur Kontraktion besitzt und teilweise an den Zell-Zell oder Zell-Matrix-Kontaktproteinen ansetzt, hat hierbei offenbar eine wichtige Funktion (Drenckhahn, 1983; Drenckhahn und Ness, 1997; Garcia und Schaphorst, 1995; Gotlieb et al., 1991).

In Endothelzellen machen Aktin und Myosin etwa 16% am Gesamtprotein der Zelle aus, ein im Vergleich zu anderen Nichtmuskelzellen hoher Anteil.

Das Verhältnis von Aktinmonomeren zu Myosindimeren ist 16 zu 1, wobei das Myosin der aktive, für die Kontraktion verantwortliche Teil ist (Schnittler et al., 1989).

Besonderes Augenmerk richtet sich in dieser Arbeit unter anderem auf das Aktinfilamentsystem der Endothelzellen.

Das Aktinfilamentsystem der Endothelzelle kann schematisch in drei Anteile gegliedert werden (*Abb. 1*):

a) Ein Stressfasersystem, bestehend aus Aktin und Myosin, das hauptsächlich basal in der Zelle liegt und mit Fokalkontakten assoziiert ist (Drenckhahn und Ness, 1997). Stressfasern sind Myofibrillen vergleichbare Filamentbündel, bestehend aus Aktinfilamentbündeln und dazwischenliegenden Myosinfilamenten. In Endothelzellen der Rattenaorta erreichen sie beispielsweise 25 μm Länge und eine Dicke von 0.7 μm (White et al., 1983).

b) Ein kortikales Aktinnetz, das unter der luminalen und basalen Plasmamembran ausgebreitet ist (Drenckhahn und Ness, 1997).

c) Ein kontaktassoziiertes Aktinfilamentsystem, das die gesamte Zirkumferenz der Zelle umspannt (Drenckhahn, 1983; Drenckhahn et al., 1986; Gotlieb et al., 1991; Kobayashi und Sakai, 1993; Schnittler et al., 1990; Strauss et al., 1987; White et al., 1983; Wong und Gotlieb, 1986; Wong et al., 1983; Wysolmerski et al., 1988).

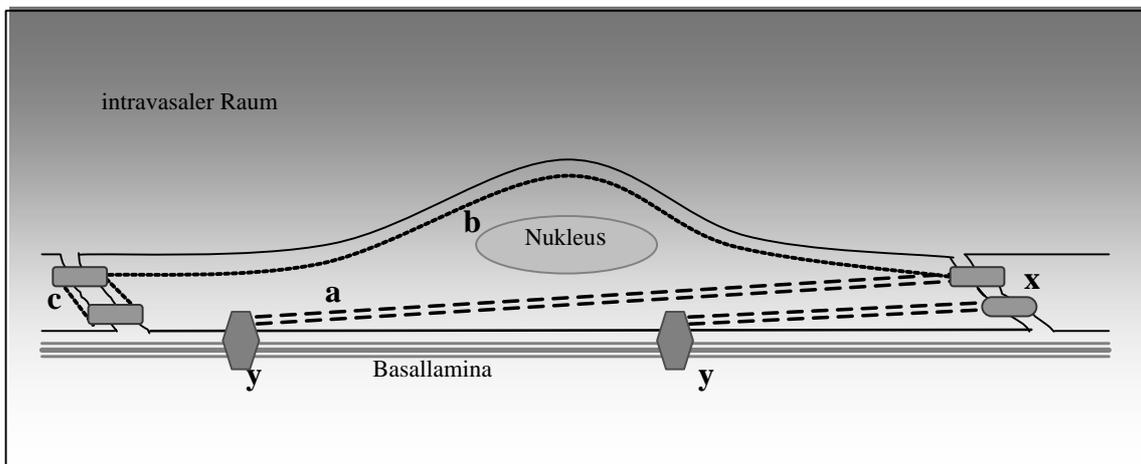


Abb.1: Schema des Aktinfilaments in Endothelzellen

- a) Stressfasern verlaufen an Zell-Zell-Kontakten (x) und Zell-Matrix-Kontakten (y) anhaftend durch die Zelle.
- b) Das kortikale Aktinnetz verläuft unter der Zellmembran.
- c) Das kontaktassoziierte Aktinfilamentsystem umspannt die Zelle im Bereich der Zell-Zell-Kontakte.

Zu a) Das Stressfasersystem in Endothelzellen gibt der Zelle die nötige Stabilität, um mechanischen Irritationen durch Scherstress (Anderson et al., 1993; Gabbiani et al., 1975 und 1979, Kim et al., 1989; Morita et al., 1993, Walpolo et al., 1993) und Dehnung der Gefäßwand (Dartsch und Betz, 1989; Dartsch und Hämmerle, 1986; Iba und Scumpio, 1991; Ives et al., 1986; Shirinsky et al., 1989; Sugimoto et al., 1991) zu widerstehen.

Auch bei der Migration von Endothelzellen, beispielsweise um nach Verletzungen Endothellücken zu verschließen, spielt das Aktinfilamentsystem, insbesondere dessen Umsatz und Ausrichtung, eine wichtige Rolle (Nobes und Hall, 1999; Lee et al., 1996; Okabe und Hirokawa, 1989; Symons und Mitchison, 1991).

Das Aktin kann als monomeres Aktin oder als filamentäres Aktin (F-Aktin) vorliegen. Die oben beschriebenen Funktionen kann Aktin nur in der filamentären Form übernehmen. Die Aktinmonomere müssen sich also zu Polymeren verbinden. Unter physiologischen Bedingungen sollten 99% der

Monomere polymerisieren. Tatsächlich sind es aber nur unter 50% (Hall(a), 1994). Die Polymerisierung wird durch sogenannte „Capping-Proteine“ verhindert. Sie binden an das „barbed-end“ der Aktinfilamente, d.h. an Aktinmonomere oder filamentäres Aktin, dessen Bindungsstelle für ein weiteres Aktinmonomer noch frei ist (Zigmond, 1996). Dadurch wird das Anheften weiterer Aktinmonomere und somit die Polymerisierung verhindert. Bekannt sind hier unter anderem Gelsolin und Profilin.

Gelsolin (90 kD) besitzt zwei Aktin-Bindungsstellen, von denen eine durch Kalzium reguliert wird. Beide Aktin-Bindungsstellen sind nötig, um filamentäres Aktin zu fragmentieren, jedoch vermag die nicht kalziumsensitive Domäne alleine an „barbed-end“ Aktin zumindest zu binden und es somit zu blockieren. Phosphatidylinositol-4,5-Phosphat hemmt die Aktin-Fragmentierungsfähigkeit und in weniger starkem Ausmaß auch die „capping“-Funktion von Gelsolin (Kwiatkowski et al., 1985; Chaponnier et al., 1986; Janmey und Stossel, 1987).

Profilin besitzt wie Gelsolin die Fähigkeit, filamentäres Aktin zu fragmentieren und die „barbed-ends“ des Aktins für weitere Aktinmonomere zu blockieren. Desweiteren fördert Profilin den ADP/ATP-Austausch von Aktin. Da ATP-Aktin sehr viel schneller polymerisiert als das ADP gebundene, kommt es durch Profilin nicht nur zu einer größeren Verfügbarkeit von Aktinmonomeren, sondern auch zu deren schnellem Wiedereinbau. Profilin fördert also den Aktinumsatz, der vor allem für wandernde Zellen von Bedeutung ist (Goldschmidt-Clermont et al., 1992). Auch hier spielt Phosphatidylinositol-4,5-Phosphat eine Rolle als Regulator. Es bindet an Profilin und kann Profilin von Aktin trennen und so die Aktinpolymerisierung fördern (Lassing und Lindberg, 1988). Zudem steigert es die Phosphorylierung von Profilin durch die Proteinkinase C (Hansson et al., 1988).

Weitere in die Aktinpolymerisierung eingreifende Proteine sind Cofilin, das indirekt durch die Rho-Kinase gehemmt wird (Maekawa et al., 1999), und Destrin, das wahrscheinlich auch über Phosphorylierung reguliert wird (Kanamori et al., 1995). Beide fragmentieren Aktinfilamente.

Auch der Aktin-Depolymerisierende-Faktor (ADF) spaltet filamentäres Aktin (Morgan et al., 1993).

Unphysiologisch kann es nach Zugabe verschiedener Clostridien-Gifte zu einer Depolymerisierung von F-Aktin kommen. Nach Zugabe von C3-Toxin, einem Exoenzym aus *Clostridium botulinum*, auf das später noch genauer eingegangen wird, kommt es beispielsweise zu einem kompletten Zusammenbruch des F-Aktins. Dies wird auf die selektive Blockade des RhoA-

Proteins zurückgeführt (Hall(a), 1994).

Diesem RhoA-Protein wird eine wesentliche Funktion bei der Regulation des Aktin-Myosin-Systems in der Zelle zugeschrieben (Chardin et al., 1989, Paterson et al., 1990; Aullo et al., 1993; Yamamoto et al., 1993 und 1994).

Zu b) Das kortikale Aktinnetz stabilisiert die Plasmamembran und kann diese, beispielsweise unter Scherstress, durch Reaktion auf den externen Stimulus noch versteifen (Wang et al., 1993; Sato et al., 1990). Zudem ist es mit Membranproteinen verbunden und sorgt so durch deren Fixierung, zum Beispiel an der luminalen Membran, für die Polarität des Endothels (Delaunay, 1995; Drenckhahn et al., 1996; Luna und Hitt, 1992; Rodriguez-Boulan und Nelson, 1989; Stolz und Jacobson, 1992). Auch an Endo- und Exozytosevorgängen ist das kortikale Netz beteiligt (Aunis und Bader, 1988; Gottlieb et al., 1993; Muallem et al., 1995).

Zu c) Das kontaktassoziierte Aktinfilamentsystem spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des parazellulären Stoffaustausches zwischen intravasalem Raum und Interstitium.

Durch den Aktinring, der entlang der Zellkontakte, einem Gerüst vergleichbar, in der Zellperipherie verläuft, wird eine Stabilisierung dieser Kontakte erreicht.

Andererseits ist das kontaktassoziierte Aktinfilamentsystem durch seine Myosinanteile zur Kontraktion befähigt und kann so über die aktive Retraktion der Zelle zur Entstehung parazellulärer Lücken führen (Drenckhahn und Ness, 1997).

1.3 Kontaktproteine der Endothelzelle

Entscheidend für die Aufrechterhaltung der Funktionsfähigkeit des Endothels sind neben dem teilweise kontraktile Stützapparat der Zelle auch eine Vielzahl von Zell-Kontakt-Proteinen. Sie gewährleisten die Barrierefunktion und die Integrität des Monolayers. Einerseits spielen sie eine Rolle bei der Regulation der Permeabilität des Endothels, andererseits sorgen sie durch die mechanische Verknüpfung der Zellen mit für die Resistenz gegenüber mechanischen Stimuli, wie Scherstress. Viele dieser Proteine stehen direkt oder indirekt mit dem Aktinfilamentsystem in Verbindung.

Besonders erwähnenswert ist hier unter anderem das vaskuläre endotheliale kalziumabhängige Adhäsionsmolekül (VE-Cadherin).

VE-Cadherin ist die in Zonulae adhaerentes von Endothelzellen vorherrschende Form der Cadherine. VE-Cadherin kommt als Seit-zu-Seit-Dimer vor und besteht als Transmembranprotein aus einer großen extrazellulären NH₃-terminalen Domäne und einem COOH-terminalen intrazellulären Anteil. Der extrazelluläre Anteil bindet kalziumabhängig an den extrazellulären Anteil des VE-Cadherin Dimers der Nachbarzelle. Der intrazelluläre COOH-terminale, 70 Aminosäuren lange Anteil bindet die Proteine beta- und gamma-Catenin, sowie p120 (Sacco et al., 1995). An beta- und gamma-Catenin gebundenes alpha-Catenin bindet wiederum an Aktin und stellt so eine Verbindung von VE-Cadherin mit dem Zytoskelett her. Diese Verbindung mit dem Zytoskelett stabilisiert die Zonulae adhaerentes (Kemler, 1993; Briher et al., 1996; Yap et al., 1997), ist aber nicht zwingend für die Bindung der extrazellulären Cadherindomänen aneinander nötig (Wheelock et al., 1987; Bixby und Zhang, 1990; Vestal und Ranscht, 1992; Kreft et al., 1997; Navarro 1995). Beta-Catenin scheint eine wichtige Rolle bei der Regulation von VE-Cadherin zu spielen (Shapiro et al., 1995; Dejana et al., 1995; Cowin und Burke, 1996; Knudsen et al., 1995). Auch das RhoA-Protein scheint einen Einfluß zumindest auf die Verteilung von VE-Cadherin zu haben (Hordijk et al., 1999; Vouret-Craviari et al., 1999). Zeitgleich mit einem beispielsweise durch eine Blockade des RhoA-Proteins auslösbaren Zusammenbruch des Aktinfilamentsystems ändert sich die aufgelockerte, teils ausgefranst erscheinende VE-Cadherin-Anordnung entlang der Zellgrenzen hin zu einer, wenn überhaupt noch detektierbaren, dann dünnen, scharf begrenzten Linie (Hordijk et al., 1999).

Eine Blockierung der VE-Cadherin Funktion durch selektive Antikörper führt zu verringerter Zelladhäsion, erhöhter Permeabilität und verstärkter Leukozyten-Transmigration durch das Endothel (Hordijk et al., 1999; Gulino et al., 1998).

Die Funktion des an den intrazellulären Anteils von VE-Cadherin bindenden Proteins p120 (120 kD) ist noch nicht genau geklärt (Shibamoto et al., 1995). Das zur Gruppe der Catenine gehörende Protein scheint allerdings eine Rolle bei der Regulation der Endothelpermeabilität zu spielen. VE-Cadherin wird durch Phosphorylierung reguliert und wurde ursprünglich als Substrat der Tyrosinkinase Src entdeckt. Eine Permeabilitätserhöhung von Endothelzellen wird von einer Dephosphorylierung von p120 an Serin und Threonin begleitet. Serin- und Threonin-Kinasen spielen eine Rolle bei der Regulation von p120 (Ratcliffe et al., 1997).

Das beta-Catenin (92 kD) gehört wie p120 und das gamma-Catenin zur Gruppe der Armadillo-Proteine.

Gemeinsam ist ihnen eine erstmals bei *Drosophila melanogaster* gefundene Sequenz von 42 sich wiederholenden Aminosäuren. Zwölf dieser Kopien scheinen der proteaseresistente, aktive Teil des Proteins zu sein (Huber et al., 1997). Beta-Catenin dient als Verbindungsprotein zwischen VE-Cadherin und alpha-Catenin (Jou et al., 1995) und wird wahrscheinlich über Tyrosinkinassen und Phosphatasen (Barth et al., 1997) und das kleine GTP-bindende Protein Rac reguliert (Takaishi et al., 1997).

Gamma-Catenin (83 kD, 744 Aminosäuren) wird auch als Plakoglobin bezeichnet und bindet an den zytoplasmatischen Teil von Cadherin (Knudsen und Wheelock, 1992; Butz und Kemler, 1994) und an alpha-Catenin (Aberle et al., 1996). Das aktive Zentrum für die Bindung an alpha-Catenin liegt zwischen den Aminosäuren 104 bis 145 (Ozawa et al., 1995). Gamma-Catenin kommt sowohl in Desmosomen als auch in den Zonulae adhaerentes vor (Franke et al., 1989). Ihm wird eine wichtige Funktion bei der Stabilisierung der Adhaerensjunctionen zugeschrieben. So zeigten Plakoglobin-defiziente Zellen unter Scherstress eine verstärkte Lückenbildung, was auf die aufgrund der Abwesenheit von gamma-Catenin fehlende Verknüpfung der Cadherine mit dem Zytoskelett zurückgeführt wurde (Schnittler et al., 1997).

Das alpha-Catenin (102 kD) ist dem Vinculin homolog und ebenfalls am Aufbau der Zonulae adhaerentes beteiligt. Es bindet mit seinem N-terminalen Ende an beta- und gamma-Catenin und stellt durch seine Bindung an Aktin das Bindeglied zwischen Zellkontakt und Zytoskelett her (Aberle et al. 1996; Butz und Kemler, 1994).

Neben der Haftung an den Nachbarzellen durch Zell-Zell-Kontakte findet die Endothelzelle Halt an der Basallamina oder in Kultur an einer Gelatine-matrix. Spezialisierte basale Fixierungspunkte der Zelle sind die Fokalkontakte. Sie sind aus einer Reihe von Proteinen (Vinculin, Paxillin, Talin, alpha-Actinin, Zyxin, p130) zusammengesetzt, die einerseits über Integrine in der extrazellulären Matrix (Laminin, Kollagen) verankert, andererseits zytoplasmatisch mit dem Stützapparat der Zelle verbunden sind (Benninghoff I, 15. Aufl., S.26 ff). Diese Fokalkontakte gewährleisten in der ruhenden Zelle die Substrathaftung, in migrierenden Zellen werden bestehende Kontakte abgebaut und neue ausgebildet. Stressfasern strahlen in die Fokalkontakte ein und werden hier mit der Zellmembran verankert. Das

RhoA-Protein ist bei der Induktion dieser Fokalkontakte von entscheidender Bedeutung (Nobes und Hall, 1995; Rankin et al., 1994; Seckl et al., 1995; Flinn und Ridley, 1996; Wang et al., 1997; Garcia et al., 1997). Auch CDC42 und Rac sind anscheinend unerlässlich für die Aufrechterhaltung von regulären Fokalkontakten (Allen et al. 1997; Clark et al., 1998). Sie sind sogar in der Lage, die Bildung kleinerer, in ihrem Aufbau aber mit Fokalkontakten identischer Komplexe zu initiieren (Nobes und Hall, 1995).

Einen wesentlichen Bestandteil des Fokalkontaktes macht das ebenfalls in Adhaerens-Kontakten vorkommende Protein Vinculin (130 kD) aus. Es ist stets dort lokalisiert, wo Aktinbündel an Zellmembranen verankert sind (Geiger et al., 1980).

An seinem N-terminalen Ende enthält es wahrscheinlich die Bindungsstelle für Talin und Aktin, wobei das COOH-terminale Ende für Vinculin-Vinculin Interaktionen (Bendori et al., 1989) und die Bindung an Paxillin (Wood et al., 1994) verantwortlich zu sein scheint. Die Bindungsstelle für Talin und Aktin ist durch eine Interaktion von Kopf und Ende des Vinculins verborgen. Es wurde gezeigt, daß Vinculin über die durch das RhoA-Protein regulierte Phosphatidyl-Inositol-4-Phosphat-5-OH-Kinase (PIP-5-Kinase) zur Anlagerung an Fokalkontakte gebracht werden kann. Dies geschieht durch eine Demaskierung der Aktin/Talin-Bindungsstelle. Erst die Bindung von Vinculin an Fokalkontakte macht eine Ausrichtung von Stressfasern in der Zelle möglich (Gilmore und Burridge, 1996; Geiger et al., 1980). In migrierenden Zellen ist das Vorhandensein von Vinculin zwar für die Ausbildung von Pseudopodien oder Lamellopodien nicht zwingend notwendig, zur Stabilisierung derselben jedoch unabdingbar (Varnum-Finney und Reichart, 1994).

Neben Talin und Aktin interagiert Vinculin auch mit dem Fokalkontaktprotein Paxillin (68 kD), das ursprünglich als Substrat der Tyrosinkinase Src entdeckt wurde (Glenney und Zokas, 1989; Turner et al., 1990 und 1991). Paxillin findet sich im Gegensatz zu Vinculin jedoch nicht in Zell-Zell-Kontakten, sondern nur in Fokalkontakten, wo Aktinbündel an der Zellmembran enden (Turner et al., 1990). Dort bindet es an seinem N-terminalen Ende nicht nur Vinculin, sondern auch die Fokalkontaktkinase (Turner und Miller, 1994). Versuche an Swiss-3T3-Fibroblasten haben gezeigt, daß Paxillin wie auch die Fokalkontaktkinase (FAK) durch das kleine GTP-bindende Protein p21Rho, auf das später noch detailliert eingegangen wird, aktiviert wird. Im Zuge dieser

Aktivierung kommt es zu einer Tyrosinphosphorylierung von Paxillin und FAK und zu einer Anheftung von Stressfasern an neu entstehenden Fokalkontakten (Barry und Critchley, 1994; Rankin et al., 1994; Yano et al., 1996). Die Phosphorylierung dieser Fokalkontakt-Proteine, infolge derer es zur Ausbildung der Zell-Matrix-Kontakte kommt, erfolgt unabhängig von der Anwesenheit von Stressfasern (Flinn und Ridley, 1996).

Eine verstärkte Phosphorylierung von Paxillin und p125FAK wurde auch bei der Permeabilitätserhöhung kultivierter Endothelzellrasen nach Zugabe des Rho-aktivierenden Entzündungsmediators Histamin beobachtet (Yuan et al., 1998).

Die bereits angesprochene Fokalkontaktkinase FAK (125 kD) ist ebenfalls am Aufbau von Fokalkontakten beteiligt (Schaller et al., 1992). Sie bindet an Paxillin (Turner und Miller, 1994) und Vinculin (Wood et al., 1994) und reguliert diese und andere Proteine durch seine Kinase-Aktivität (Schaller und Parsons, 1994). Wie bereits erwähnt, wird FAK selbst ebenfalls durch das RhoA-Protein und Phosphorylierung reguliert.

Wie beschrieben, sind all die oben genannten Elemente unerlässlich für die Aufrechterhaltung der Funktion des Endothels. Der teilweise kontraktile Stützapparat gibt der Zelle die nötige Stabilität, sich gegen mechanische Irritationen zu behaupten und entstandene Endothelläsionen durch Migration zu verschließen.

Die Zell-Zell-Kontakte sorgen für den Zusammenhalt der Zellen untereinander und gewährleisten so die Ausbildung eines dichten Zellverbandes, der eine Kompartimentierung in intravasalen und extravasalen Raum erst ermöglicht.

Die Fokalkontakte fixieren die Zelle am Untergrund und verhindern so die Ablösung der Endothelzelle von der Gefäßwand.

All diese Elemente werden wesentlich durch das nun schon oft genannte RhoA-Protein beeinflusst.

1.4 Das kleine GTP-bindende Protein RhoA

Das RhoA-Protein gehört zur Gruppe der kleinen Guanosin triphosphat (GTP) bindenden Proteine. Es wurde erstmals 1985 als ein dem Ras-Onkoprotein ähnliches Protein beschrieben (Madaule und Axel, 1985).

Zur Gruppe der Rho-Proteine gehören auch CDC42 und Rac. Auf diese beiden Proteine soll nur kurz eingegangen werden.

CDC42 und Rac führen unabhängig von der RhoA-Kaskade zur Bildung von Fokalkomplexen, die zwar kleiner als reguläre Fokalkontakte sind, aber die gleichen Komponenten enthalten. Beide spielen eine Rolle bei der Organisation des Zytoskeletts und beim Wanderungsverhalten der Zelle. CDC42, das in der Lage ist Rac und RhoA zu aktivieren, läßt Zellen dünne fingerartige Fortsätze (Filopodien) ausbilden, an deren Spitzen Fokalkomplexe entstanden und in denen Aktinfasern längs verlaufen. Rac und CDC42 wirken wahrscheinlich hemmend auf RhoA, RhoA hat aber keinen Einfluß auf Rac. Deshalb geht man von einer Hierarchie innerhalb der Rho-Proteine aus (Sander et al., 1999; Zondag et al., 2000).

Rac stimuliert Zellen, breitbasige Ausläufer (Lamellopodien) auszubilden, in denen die Aktinfilamente quer zur Ausbreitungsrichtung verlaufen.

Zur Gruppe der Rho-Proteine gehören ferner TC10 und RhoG. Für diese ist aber bisher keine Funktion in Säugetierzellen bekannt (Nobes und Hall, 1995).

Das RhoA-Protein hat eine molare Masse von 21 kD, weshalb es auch p21 Rho genannt wird. In der GTP-gebundenen Form ist es aktiv. Es ist fähig, das gebundene GTP wieder zu hydrolysieren. Die GTP-Hydrolyse-Rate scheint vom Vorhandensein von Mg^{2+} -Ionen abhängig zu sein (Zhang et al., 2000). Über GTP-ase aktivierende Proteine (GAP), Guanosinphosphat-Austausch-Proteine (GEF) und ein die Dissoziation von Guanosindiphosphat (GDP) hemmendes Protein (GDP dissociation inhibitor: GDI) wird die Assoziation von Guanosinphosphat und RhoA reguliert. GAP-Proteine sorgen durch die Aktivierung der GTP-ase für eine Spaltung von GTP zu GDP und damit für die Inaktivierung von RhoA. Sie können durch YopE, einem Toxin aus *Yersinia pseudotuberculosis*, aktiviert (Pawel-Rammingen et al., 2000) werden. Die Balance von GAP-Proteinen und GEF bestimmt im wesentlichen die Aktivität der GTP-ase (Vincent und Settleman, 1999). GEF-Proteine tauschen GDP gegen GTP aus und aktivieren RhoA. Anscheinend entfernt GEF gebundenes Mg^{2+} von RhoA, wodurch die Dissoziation des RhoA-Guanosinphosphat-Komplexes gefördert wird (Zhang et al., 2000). Die GDI-Proteine fixieren den Rho-GDP-Komplex und inaktivieren ihn somit. Die genaue Relevanz dieser Proteine ist aber noch unklar, weswegen hier nicht weiter auf sie eingegangen werden soll (Hall(b), 1994; Takai, 1993; Zigmond, 1996).

Als sicher gilt jedoch, daß RhoA, zumindest in Swiss-3T3-Fibroblasten, durch die im Serum enthaltene, von Thrombozyten hergestellte Lysophosphatsäure

(LPA) aktiviert wird. Man geht davon aus, daß das wachstumsfaktorähnliche Phospholipid LPA einen heterotrimeren, G-Protein-gekoppelten Rezeptor in der Zellmembran aktiviert. Dadurch kommt es wahrscheinlich zu einer Aktivierung einer bisher noch nicht identifizierten Tyrosinkinase und dadurch wiederum zu einer gesteigerten RhoA-Aktivität (Ridley und Hall, 1992). Ferner konnten auch der von pathogenen Escherichia-Coli-Stämmen produzierte zytotoxische Nekrotisierungsfaktor (CNF1) (Contamin et al., 2000) und das in Thrombozyten gespeicherte Sphingosin-1-Phosphat (Sph-1-P) (Miura et al., 2000) und verschiedene andere Faktoren, auf die nicht näher eingegangen wird, als Aktivatoren der RhoA-Kaskade identifiziert werden.

Desweiteren konnte gezeigt werden, daß aktive Rho-Proteine einer Prenylierung ihrer C-terminalen CAAX-Sequenz (C=Cystein, A=aliphatische Aminosäure, X=beliebige Aminosäure) bedürfen, um sich dann mit dem lipophilen Anteil in der Plasmamembran zu verankern (Fenton et al., 1992; Yoshida et al., 1991). Am Cystein wird über eine Thioether Brücke das Lipid angehängt. Die restlichen drei Aminosäuren werden proteolytisch abgespalten (Clarke et al., 1988; Gutierrez et al., 1989).

Die angehängten Lipide entstammen dem Cholesterinstoffwechsel. Bei den Prenylierungsgruppen handelt es sich um Geranyl und Farnesyl, die Vorstufen des Squalens, wobei an RhoA, Rac und CDC42 vornehmlich über Phosphat aktiviertes Geranyl-Geranyl angehängt wird (Yoshida et al., 1991; Desrosiers et al., 2000).

Das so aktivierte RhoA erfüllt nun in der Zelle eine ganze Reihe unterschiedlicher Aufgaben.

RhoA aktiviert Protein-Kinasen, reguliert Phospholipasen und Phosphokinasen und bindet an eine Reihe weiterer Proteine, deren Funktion noch nicht bekannt ist. Die Proteinkinase N, eine Serin/Threonin-Kinase, bindet an RhoA und wird dadurch aktiviert (Amano et al., 1996, Watanabe et al., 1996). Eine zweite an RhoA bindende und dadurch aktivierte Serin/Threonin-Kinase ist die p164-Rho-Kinase, auch einfach Rho-Kinase genannt. Sie phosphoryliert das Threonin der Myosinphosphatase vornehmlich an den Positionen 695 und 850. Hauptsächlich die Phosphorylierung an Position 695 wird für die Inaktivierung der Myosinphosphatase verantwortlich gemacht (Feng et al., 1999). Durch die Hemmung der spezifischen Phosphatase liegen die Myosin-Leichtketten (MLC) nun vermehrt phosphoryliert vor. Im phosphorylierten und damit aktivierten Zustand ist das Myosin fähig, an Aktin zu binden, und es kommt zu einer gerichteten Stressfaserpolymerisierung. Dieser Vorgang wird als der entscheidende im Rahmen der Entstehung der Stressfasern betrachtet

(Kimura et al., 1996), wobei RhoA anscheinend nicht direkt an Aktin bindet (Desrosiers et al., 2000).

RhoA fördert ebenso die Bildung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (4,5 PIP₂) durch eine Aktivierung der PIP-5-Kinase (Chong et al., 1994). 4,5 PIP₂ ist, wie oben bereits beschrieben, wesentlich an der Regulation von Aktin Capping-Proteinen beteiligt. Auch hier läßt sich also eine Verbindung des RhoA-Proteins mit dem Zytoskelett herstellen. Ein erhöhter PIP₂-Gehalt führt zu vermehrter Umsetzung durch die Phospholipase C (PLC) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃). IP₃ seinerseits bewirkt als sekundärer Botenstoff einen Kalziumanstieg in der Zelle. Viele Aktin-bindende Proteine sind kalziumsensitiv (Vandekerkhove, 1990).

Außerdem ist RhoA für die Phosphorylierung der Fokalkontaktproteine FAK und Paxillin wichtig. Dies geschieht über eine zwischengeschaltete, noch nicht genau identifizierte Tyrosinkinase (Rankin et al., 1994; Barry und Critchley, 1994). RhoA stabilisiert Fokalkontakte, während Rac für die initiale Ausbildung der Kontakte bzw. Komplexe verantwortlich ist (Rottner et al., 1999).

Auch die Anlagerung von Vinculin an Fokalkontakte ist, wie bereits erläutert, 4,5 PIP₂ und somit indirekt von RhoA abhängig (Kotani et al., 1997).

Zell-Zell-Kontaktproteine wie VE-Cadherin werden ebenfalls, wie oben beschrieben, von RhoA beeinflusst.

Eine direkte Verbindung von RhoA mit den Cateninen konnte bisher noch nicht hergestellt werden.

Es ist eindeutig gezeigt, daß das RhoA-Protein in wesentliche Bereiche der Zellorganisation eingreift. Durch eine RhoA-Blockade wurden eine Änderung der Zellmorphologie und des Zytokineseverhaltens (Aullo et al., 1993; Jantsch-Plunger et al., 2000, Paterson et al., 1990; Yamamoto et al., 1993 und 1994), ein Zusammenbruch der Stressfasern, eine Permeabilitätsänderung (van Nieuw Amerongen et al., 1998; Hordijk et al., 1999; Ermert et al., 1995; Nusrat et al., 1995; Hippenstiel et al., 1997), eine Modulation der Fokalkontakte und eine Änderung der Zell-Zell-Kontaktprotein-Verteilung erreicht. Inwieweit sich diese Effekte gegenseitig bedingen, wird kontrovers diskutiert. Die klinische Relevanz eines Proteins, das so mannigfaltige Aufgaben erfüllt, steht jedoch außer Frage. Mit den Folgen einer Permeabilitäts-erhöhung des Endothels muß sich der Kliniker bei Entzündungen und Ödemen verschiedenster Ursache auseinandersetzen. Es konnte auch eine Verbindung zwischen der Rho-Kaskade und der Entstehung von

Koronarspasmen (Kandabashi et al., 2000) und der Hypertrophie glatter Gefäßmuskulatur (Yamakawa et al., 2000) hergestellt werden. Auch die endotheliale Konzentration von Stickstoffmonoxid und somit die Weite, beispielsweise von Coronararterien, scheint über Rho-Proteine reguliert zu werden (Laufs et al., 1999). Desweiteren spielt RhoA über die Regulation der kontraktilen Elemente und der verschiedenen Haftstrukturen eine wesentliche Rolle für endothelial Reparationsvorgänge, die Migration und damit die Angiogenese (Uchida et al., 2000). Es konnte zum Beispiel ein Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung des VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) und der Aktivität von RhoA nachgewiesen werden (Gingras et al., 2000). Unter anderem vor diesem Hintergrund erscheint es deshalb sinnvoll, die Rolle des RhoA-Proteins in Blutgefäßen, insbesondere im Endothel, genauer zu betrachten.

2. Fragestellung

Die in letzter Zeit durch zahlreiche Arbeiten belegte, immer deutlicher werdende klinische Relevanz der Rho-Proteine rückt die kleinen GTP-bindenden Proteine in den Blickpunkt wissenschaftlichen Interesses. Die Bedeutung der Rho-Proteine in Endothelzellen, insbesondere die des RhoA, im Hinblick auf Migrationsfähigkeit, das Aktinfilamentsystem, Zell-Zell-Kontakte und Zell-Matrix-Kontakte wird im Moment teilweise kontrovers diskutiert. Diese Arbeit soll einen Beitrag zur Klärung dieser Bedeutung leisten.

3. Material und Geräteverzeichnis

3.1 Präparation der Endothelzellen und Zellkultur

3.1.1 Medium

- Aussaatmedium: 500 ml M 199 Kulturmedium (Gibco, BRL)
 - ?? 100 ml FCS (Fetales Kälberserum, Biochrom, Berlin)
 - ?? 10 ml Glutamin (200mM, Biochrom, Berlin)
 - ?? 50 U/ml Penicillin (Gibco, Karlsruhe)
 - ?? 50 U/ml Streptomycin (Gibco, Karlsruhe)
- Wachstumsmedium wie Aussaatmedium, allerdings mit nur 50 ml FCS-Zusatz

3.1.2 Plastikartikel

- Petrischalen mit 30 mm Durchmesser
- Gewebekulturflasche mit 25 cm² Wachstumsfläche (T25) (Greiner, Nürtingen)

3.1.3 Enzyme

- Trypsin: 0.05% Trypsin, 0.01% EDTA in PBS gelöst (Serva, Heidelberg)
- Kollagenase: 1 mg/ml in PBS gelöst (Boehringer, Mannheim)

3.1.4 Deckgläser

- Deckgläser: rund, 12 mm Durchmesser, mit 175 µm Koordinatensystem: Cellocates® (Eppendorf, Hamburg), ohne Koordinatensystem (Hartenstein, Würzburg)
- Objektträger: 76x26x1 mm (Marienfeld, Deutschland)

3.1.5 Brutschrank

- B 5060 EC-CO2 (Heraeus, Hanau)

3.1.6 Zentrifugen

- 5417R / 5415C (Eppendorf, Hamburg)

3.2 Mikroinjektion

3.2.1 Injektionskapillarenherstellung

- "two stage puller": Typ PP-83, "patch clamp 12-90" (Bachhofer, Reutlingen)
- Borosilikatglasröhrchen mit innerer Glasfaser (Hilgenberg GmbH, Malsfel, Deutschland)

3.2.2 Injektionsvorrichtung

- Mikromanipulator 5170 (Eppendorf), bestehend aus Nadelhalterung, Joystick und Steuerungseinheit.
- Mikroinjektor zur Druckluftsteuerung (Sauer Feinmechanik, Würzburg 1/1991)

3.2.3 Injektionslösungen

- PBS mit FITC-Dextran im Verhältnis 9:1 gemischt:
FITC-Dextran ist hochmolekulares (10 kD), nicht mit dem Zellstoffwechsel interagierendes mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiertes Dextran, das nach der Injektion die Zelle nicht mehr verläßt und die spätere Identifikation der injizierten Zellen ermöglicht. Anregungswellenlänge: 488 nm, Emissionswellenlänge: 515 nm, Stammlösung: 10 mg/ml mit 0.1 M Natrium Phosphat, 0.1M Natrium Chlorid in H₂O (Molecular Probes, Leiden Niederlande)
- C3-Toxin-PBS-FITC-Dextran-Gemisch:
Die C3-Toxin-Stammlösung (Biomol, Hamburg) hatte eine Konzentration von 1 mg/ml in H₂O, diese Lösung wurde 1:10 in PBS verdünnt. Somit ergab sich eine C3-Toxin-Konzentration der Lösung von 100 µg/ml, welche im Verhältnis 9:1 mit FITC-Dextran zur endgültigen Injektionslösung gemischt wurde.

3.2.4 Pipettenspitzen

Um die Injektionslösungen in die Kapillaren einzubringen wurden spezielle feine Pipettenspitzen verwendet:

- "Gel loader Spitzen GS 10" (Hartenstein, Würzburg)

3.3 Fluoreszenzmikroskopie

3.3.1 Fixierungsreagenzien

- 20%ige Glutaraldehydlösung, GLA (Roth, Karlsruhe)
Zum Fixieren der Zellen wurde aus dem kristallinen Paraformaldehyd (Serva, Heidelberg) eine 2%ige Formaldehyd-Lösung in PBS hergestellt.

3.3.2 Detergenzien

- Zum Permeabilisieren wurde aus Triton X-100 (Sigma, Steinheim) eine 0.15%ige Lösung in PBS hergestellt.

3.3.3 Absättigungsmittel

- Zum Absättigen unspezifischer Bindungen wurden bovines Serum-Albumin (BSA) und normales Ziegen Serum (NGS) in Pulver-Form verwendet (Sigma, Steinheim)

3.3.4 Primärantikörper

Zur Darstellung der Zell-Zell- bzw. der Zell-Matrix-Kontakte wurden folgende Antikörper, in PBS gelöst, verwendet:

Antikörper gegen	Klon	Verdünnung	Hersteller
alpha-Catenin	monoklonal (Maus)	1:100	Transduction Lab.
beta-Catenin	polyklonal (Kaninchen)	1:2000	Sigma
gamma-Catenin	monoklonal (Maus)	1:300	Transduction Lab.
VE-Cadherin	polyklonal (Kaninchen)	1:150	Vestweber
Paxillin	monoklonal (Maus)	1:1000	Transduction Lab.
p125-FAK	monoklonal (Maus)	1:200	Transduction Lab.
Vinculin	monoklonal (Maus)	1:1500	Sigma
p 120	monoklonal (Maus)	1:200	Transduction Lab.

(Transduction Laboratories: Los Angeles, USA; Sigma: Steinheim, Deutschland)

Zu den Antikörperlösungen wurde, um Mikrobenbefall zu vermeiden, 0.05% NaN₃ (Carl Roth, Karlsruhe) zugegeben.

3.3.5 Sekundärantikörper

- Ziege-anti-Maus, gekoppelt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 für monoklonale Erstantikörper (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, USA)
- Ziege-anti-Kaninchen, gekoppelt mit Cy3 für polyklonale Erstantikörper (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, USA)

3.3.6 Aktinfärbemittel

- Die Darstellung des Aktinfilamentsystems erfolgte durch Phalloidin, markiert mit Tetramethyl-rhodaminyli-sothiocyanat (TRITC): Phalloidin-TRITC (Sigma, Steinheim), Stammlösung: 10 µg/ml in PBS

3.3.7 Reagentien für die Fluoreszenzmikroskopie

- Zum Eindecken wurde 1,5% n-Propylgallat (3,4,5-Trihydroxybenzoesäurepropylester, Serva, Heidelberg) mit 30% Glycerin (Roth, Karlsruhe) in PBS verwendet.

3.3.8 Puffer

PBS: phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,3

137.00	mM NaCl
2.68	mM KCl
6.50	mM Na ₂ HPO ₄
1.50	mM KH ₂ PO ₄

3.4 Mikroskope

- Fluoreszenzmikroskop Olympus BH II (Olympus, Hamburg)
- Lichtmikroskop Olympus IMF-2 (Olympus, Hamburg)

3.5 Toxine, Inhibitoren

- Lovastatin: Reinstsubstanz, Stammlösung: 10 mM in EtOH (Geschenk von Merck-Sharp-Dome, München)
- Toxin-B aus *Clostridium difficile*: Stammlösung 500 mg/ml in PBS (Geschenk von Prof. Aktories, Freiburg)
- C3-Toxin aus *Clostridium botulinum*: Stammlösung 1 mg/ml in Bidest (Biomol, Hamburg)

3.6 Gelatinieren der Deckgläser

- Gelatinepulver (Sigma, Steinheim) 0.5% in H₂O

4. Methoden

4.1 Gelatinieren der Deckgläser

Die Deckgläser wurden in H₂O mit einer Spatelspitze EDTA 10 min aufgekocht und anschließend gründlich in H₂O gespült. Die gereinigten Gläschen wurden nun für ca. 1 h mit 0.5% steriler Gelatine in PBS benetzt. Nachdem sie mit PBS gespült worden waren, wurde GLA-Lösung (2%ig in PBS) zum Vernetzen der Gelatine dazugegeben. Ca. 1 h später wurde die GLA-Lösung abgesaugt und die Gläschen für eine weitere Stunde in 70% Ethanol gegeben.

Nach gründlichem Spülen mit PBS konnten die Gläschen in PBS mit Antibiotika (Penicillin 150 U/ml und Streptomycin 150 U/ml) im Kühlschrank gelagert werden.

Frisch gelatinisierte Deckgläschen sollten mindestens einen Tag ruhen, bevor Zellen auf sie ausgesät werden, um restliches GLA aus der Gelatine diffundieren zu lassen.

4.2 Zellkultur

4.2.1 Präparation von Endothelzellen aus dem Truncus pulmonalis des Schweins (PPAEC)

Die Versuche wurden mit Endothelzellen aus dem Truncus pulmonalis des Hausschweins (PPAEC) durchgeführt. Der Truncus pulmonalis wurde noch im Schlachthof direkt nach seinem Abgang aus dem rechten Ventrikel und proximal der Bifurcation abgesetzt und in einem sterilen Glasbehälter auf Eis gekühlt bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Der gründlich in PBS gespülte Truncus wurde an einer Seite mit einer Klemme verschlossen und der entstehende Sack mit ca. 3 ml Kollagenase gefüllt. Die andere Seite wurde ebenfalls mit einer Klemme verschlossen. Nach einer Inkubationszeit von 10 min in einem 37°C warmen Wasserbad konnten restliche, noch an der Gefäßwand haftende Endothelzellen durch sanftes Massieren des Gefäßes gelöst werden. Die Kollagenase-Zellsuspension wurde mit einer Spritze abgesaugt, mit 10 ml Aussaatmedium aufgefüllt und abzentrifugiert (10 min bei 200*g). Das Zellsediment wurde in 10 ml P0 (Aussaat-) Medium resuspendiert und in vorgelatinisierte T25 Kulturflaschen ausgesät. Diese Flaschen waren für eine halbe Stunde mit 0.5% steriler Gelatine in PBS gefüllt worden, die danach wieder abgesaugt wurde. Nach einem Tag erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem nicht angewachsene, im Medium schwimmende

Zellen entfernt wurden. Nachdem die Zellen konfluent gewachsen waren, folgte der Mediumwechsel auf Wachstumsmedium, das alle zwei Tage erneuert wurde.

Für die Experimente wurden ausschließlich Zellen der ersten Passage verwendet.

Die Zellen wurden im Brutschrank in wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Als Beweis, tatsächlich Endothelzellen isoliert zu haben, wurde der immunocytochemische Nachweis von VE-Cadherin durchgeführt.

4.2.2 Abtrypsinieren

Nach kurzem Spülen der Zellen mit PBS, um restliches Medium und FCS zu entfernen, wurde 1 ml Trypsin in die T25 Kulturflasche zugegeben. Nach ca. 1 min Einwirkzeit wurden die Zellen durch Beklopfen des Kulturflaschenbodens gelöst, mit 9 ml P1-Medium aufgefüllt und ausgesät. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:1 bis maximal 1:5 ausgesät.

4.3 Mikroinjektion

4.3.1 Herstellung der Mikroinjektionskapillaren

Die verwendeten Mikroinjektionskapillaren wurden in einem Zwei-Schritt-Verfahren hergestellt. Hierbei wurde durch zirkuläres Erhitzen eines unter Zug stehenden Glasröhrchens eine Ausziehung desselben erreicht. In einem zweiten Schritt wurde die inzwischen abgekühlte, ausgezogene, wieder unter Zug gesetzte Stelle erneut erhitzt und man erhielt so durch das Auseinanderreißen des Röhrchens eine Injektionskapillare. Die Spitzen der Kapillaren hatten einen Durchmesser von 2-4 µm. Es wurden Borosilikatglasröhrchen von 10 cm Länge mit innerer Glasfaser (Außendurchmesser 1.5 mm, Innendurchmesser 0.85 mm) verwendet.

4.3.2 Mikroinjektionstechnik

Die zur Injektion vorgesehenen Zellen wurden auf gelatinierte, mit einem Koordinatensystem versehene Deckgläschen ausgesät, so daß injizierte Zellareale später auch im Lichtmikroskop wiedergefunden werden konnten.

Die zu injizierende Lösung wurde abzentrifugiert, um Verunreinigungen zu sedimentieren und so eine Verstopfung der Kapillare zu verhindern. Mit einer speziellen feinen Pipettenspitze wurden einige µl in die Kapillare gefüllt und

diese in die Injektionsvorrichtung gespannt. Mit Hilfe eines Joysticks ließ sich die Nadel ferngesteuert bis auf 300 nm genau bis auf Zellniveau bringen. Das Erreichen der apikalen Zellmembran wurde durch eine leichte Verformung der Nadelspitze und eine veränderte Lichtbrechung durch Verformung der Zelloberfläche beim Kontakt mit dieser erkennbar. Hier wurde das „axiale Limit“ festgelegt, d.h. die Nadel wurde in dieser Stellung so fixiert, daß sie sich nicht mehr weiter nach unten bewegen konnte. Dadurch verhinderte man das Abbrechen der empfindlichen Nadelspitze auf der Deckgläschenoberfläche. Danach wurde die Nadel noch etwas zurückgezogen und mit dem Fußpedal die Druckluft gesteuerte Injektion ausgelöst. Die Kapillare durchstieß die Zellmembran in einem Winkel von ca. 45°. Es wurde ausschließlich in das Zytoplasma injiziert. Injektionen in den Zellkern führten zum Zelltod.

Der druckluftgesteuerte Mikroinjektor erlaubte über elektronisch kontrollierte Ventile Injektionszeiten von 0.1 – 10 s. Der Injektionsdruck konnte zwischen 100 und 4000 mbar variiert werden. Weiterhin ermöglichte das System die Wahl eines konstanten und kontinuierlichen „Haltedruckes“ zwischen 10 und 100 mbar über die gesamte Dauer des Experiments. Der „Haltedruck“ hielt die Kapillarenspitze offen und verhinderte ein retrogrades Einströmen von Medium. Zusätzlich bot der Mikroinjektor die Möglichkeit, mit Druckspitzen bis zu 10000 mbar eine eventuell verunreinigte Kapillare von einer Verstopfung zu befreien („Reinigungsdruck“).

Zur Injektion wurden ein „Haltedruck“ von ca. 30 mbar und ein Injektionsdruck von ca. 1000 mbar gewählt. Die Injektionszeit betrug 0.3 s.

Lichtmikroskopisch konnte während der Injektion eine kurzzeitige Ballonierung der Zellen aufgrund der Volumenaufnahme beobachtet werden. Sie stellte somit den Indikator für eine erfolgreiche Injektion dar.

Das injizierte Volumen betrug ca. 500 fl (Arkenau, 1999). Das entspricht ca. 23% des durchschnittlichen Endothelzellvolumens, welches bei 2300 fl liegt (Cursiefen, 1996).

Durch das Volumen der Injektion schollen die Zellen für Sekundenbruchteile an und für die Dauer von etwa 30 min waren kleine Granula im Lichtmikroskop zu sehen, die aber wieder verschwanden.

Nach spätestens 1h waren diese Zellen im Lichtmikroskop morphologisch nicht mehr von nicht injizierten zu unterscheiden.

4.4 Fluoreszenzmikroskopie

4.4.1 Fixieren

Um restliches Medium zu entfernen, wurden die zu fixierenden Zellen mit PBS gespült. Das PBS wurde hierzu auf 37°C erwärmt. Nachdem das PBS wieder abgesaugt war, gab man für 10 min 2%iges Paraformaldehyd in PBS auf die Zellen, um sie zu fixieren. Nach erneutem Absaugen und dreimaligem Spülen mit PBS für je 5 min konnten die Zellen dann permeabilisiert werden.

4.4.2 Permeabilisieren

Um Phalloidin-TRITC bzw. Antikörpern den Kontakt mit intrazellulären Strukturen zu ermöglichen, wurde die Zellmembran mit dem Detergenz Triton X-100 (0.1%ig in PBS) permeabilisiert. Hierzu wurden die vorher fixierten Zellen für maximal 5 min mit dem Detergenz benetzt und anschließend dreimal für 5 min mit PBS gespült.

4.4.3 Absättigen

Um unspezifische Bindungsmöglichkeiten für die Antikörper weitgehend zu blockieren, wurden die Zellen nach der Permeabilisierung für 30 min bei Raumtemperatur mit 2% BSA (bovines Serum-Albumin), 1% NGS (normales Ziegenserum) in PBS inkubiert und anschließend erneut dreimal 5 min mit PBS gespült.

4.4.4 Antikörperinkubation

Nun konnten die Primärantikörper aufgebracht werden. Es wurden mono- und polyklonale Antikörper verwendet. Von diesen Antikörperlösungen wurden 4 µl pro Deckgläschen auf die Zellen pipettiert und bei 4°C für mindestens 8 h in einer feuchten Kammer inkubiert.

Nach dreimaligem Spülen mit PBS für jeweils 5 min folgte eine halbstündige Inkubation mit den Sekundärantikörpern bei Raumtemperatur, ebenfalls in einer feuchten Kammer.

Die so behandelten Zellen wurden anschließend erneut dreimal für 5 min in PBS gespült und kurz in H₂O gewaschen, um restliche Salze zu entfernen. Dann konnten sie eingedeckt werden.

4.4.5 Phalloidin-TRITC-Färbung

Die Zellen wurden, wie oben beschrieben, fixiert, permeabilisiert und anschließend 30 min bei RT mit jeweils ca. 4 μ l 60fach verdünnter Phalloidin-TRITC Stammlösung (10 μ g/ml in PBS) benetzt.

Phalloidin ist ein bicyclisches Heptapeptid des grünen Knollenblätterpilzes, *Amanita phalloides*, das spezifisch an filamentäres Aktin (F-Aktin) bindet.

An das Phalloidin ist der Fluoreszenzfarbstoff TRITC kovalent gekoppelt, der bei einer Wellenlänge von 542 nm angeregt und bei einer Emissionswellenlänge von 563 nm detektiert wurde.

4.4.6 Eindecken

Zum Eindecken wurde 30% Glycerin mit einem Zusatz von 1,5% n-Propylgallat in PBS verwendet, um ein Ausbleichen zu verhindern. Jeweils 3 μ l pro einzudeckendem Deckgläschen wurden auf große Objektträger aufpipettiert und das Deckgläschen mit der zellbewachsenen Seite auf den Tropfen gelegt. Die so eingedeckten Zellen konnten anschließend im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden.

5. Versuchsbeschreibungen

5.1 Der FCS/Lovastatin-Versuch

Die kleinen GTP-bindenden Proteine der Rho-Familie sind, wie bereits beschrieben, an der Regulation des Zytoskelettes, des Wanderungsverhaltens und der Zellmorphologie beteiligt. CDC42 vermittelt die Ausbildung von fingerartigen Fortsätzen, sogenannten Filopodien, in Swiss-3T3-Fibroblasten. Die Injektion von dominant aktivem Rac in Fibroblasten führte zu blattförmigen, breitbasigen Zytoplasmaausstülpungen, den sogenannten Lamellopodien. Zudem kam es zu Aktinpolymerisation quer zur Ausbreitungsrichtung dieser Lamellopodien und zur Ausbildung von Fokalkontakten an deren Randsaum.

Das RhoA-Protein ist maßgeblich an der Modulation des Stressfasersystems und der Ausbildung von Fokalkontakten beteiligt (Nobes und Hall, 1995).

Man geht davon aus, daß Rac und RhoA, um ihre Aufgaben erfüllen zu können, in der Membran verankert sein müssen. Da sie selbst aber nicht lipophil sind, müssen sie mit einem lipophilen Anteil versehen werden (Fenton et al. 1992; Yoshida et al., 1991).

An ihrem carboxyterminalen Ende befindet sich das sogenannte CAAX-Motiv, eine Aminosäuresequenz, bestehend aus Cystein (C), zwei aliphatischen Aminosäuren (AA) und einer beliebigen Aminosäure (X). Dort, genauer am Cystein, wird über eine Thioether-Brücke das Lipid angehängt. Die restlichen drei Aminosäuren werden proteolytisch abgespalten (Clarke et al., 1988; Gutierrez et al., 1989).

Diese angehängten Lipide entstammen dem Cholesterinstoffwechsel. Es handelt sich um Geranyl und Farnesyl, die Vorstufen des Squalens, wobei an RhoA und Rac vornehmlich Phosphat-aktiviertes Geranyl-Geranyl angehängt wird (Yoshida et al., 1991). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Biosynthese von Cholesterin ist die Bildung von Mevalonsäure aus β -HMG-CoA (β -Hydroxy- β -Methyl-Glutaryl-Coenzym A) durch die β -HMG-CoA-Reduktase.

Dieses Enzym wird durch Lovastatin gehemmt. Es kommt also durch die Zugabe von zellpermeablem Lovastatin zu einer verringerten Bildung von Geranyl und damit auch zu einer verringerten Geranylierung von Rac und RhoA. Nach Zugabe von Lovastatin wurden morphologische Veränderungen wie ein Abrunden der Zellen und ein Stressfaserzusammenbruch in Swiss-3T3-Fibroblasten beobachtet. Als ursächlich hierfür wurde die verringerte

Prenylierung des RhoA-Proteins angesehen (Koch et al., 1997).

Es ging nun darum, den Einfluß einer aktiven Hemmung der Prenylierung durch Lovastatin und die Auswirkungen eines einfachen Entzugs der Isoprenabkömmlinge des Cholesterinstoffwechsels auf Endothelzellen zu untersuchen. Zudem entzieht man den Zellen durch das serumfreie Medium auch Lysophosphatsäure (LPA), die wie in der Einleitung beschrieben, zur Aktivierung von RhoA führt.

Die auf gelatinisierten Deckgläsern ausgesäten Zellen sollten vor Versuchsbeginn vollständig konfluent sein. Nach einem Mediumwechsel, wobei eine Hälfte der Zellen M199 mit FCS, die andere M199 ohne FCS erhielt, wurde mit einer Pipettenspitze ein etwa 1 mm breiter Streifen des Zellrasens entfernt und so eine Läsion geschaffen. Danach wurde Lovastatin (30 μ M) zugegeben. Die Zellen wurden zu vier verschiedenen Zeiten (5,10,15,20 h), wie beschrieben, fixiert und der Immunfluoreszenz oder Aktinfärbung zugeführt.

Es wurden Morphologie, Wanderungsverhalten, zytoskelettale Proteine, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontaktproteine in Abhängigkeit von Lovastatin und FCS untersucht.

5.2 Der Toxin-B-Versuch

Toxin-B ist das zellmembranpermeable Enterotoxin des sporenbildenden Bakteriums *Clostridium difficile*. Dieses Bakterium ist der Erreger der durch Antibiotika ausgelösten pseudomembranösen Colitis.

Toxin-B koppelt Glukose unter Verwendung von Uridin-Diphosphat (UDP) an die Aminosäure Threonin an Position 37 in Rho-Proteinen und inaktiviert diese. Dies führt zu einem Zusammenbruch des Aktinfilamentsystems (Just (c) et al., 1995) und zu einer Permeabilitätszunahme von Endothelzellen (Just et al., 1994). Neben RhoA werden auch CDC42 und Rac glucosyliert.

Das enzymatisch aktive Zentrum befindet sich am N-terminalen Ende des 270 kD Proteins (Hofmann et al., 1997).

Die Stammlösung des Toxins wurde 1:10000 in Wachstumsmedium verdünnt auf die Zellen gegeben, so daß sich eine Wirkkonzentration von 50 μ g/ml ergab.

Zeitgleich wurde eine Läsion im Monolayer gesetzt, um später das Migrationsverhalten der Zellen mit beurteilen zu können.

Die Zellen wurden nach 45 min, 1.5 h und 2.5 h fixiert und immunocytochemisch aufbereitet.

5.3 Der C3-Toxin-Versuch

Das C3-Toxin ist das Exoenzym des sporenbildenden Bakteriums *Clostridium botulinum*, Erreger des Botulismus. Es inaktiviert selektiv das RhoA-Protein durch eine ADP-Ribosylierung der Aminosäure Asparagin an Position 41 und führt dadurch zur Abrundung und zum Zusammenbruch von F-Aktin (Yamamoto et al., 1994).

Auf Cellocates® konfluent gewachsene Zellen wurden, wie oben beschrieben, verwundet. Anschließend wurden im Verband liegende und am Verwundungsrand liegende Zellen injiziert.

Die Injektion war nötig, da das uns zur Verfügung stehende Toxin nicht zellmembranpermeabel war.

Zur Kontrolle wurde PBS im Verhältnis 9:1 mit FITC-Dextran verwendet. C3-Toxin der Konzentration 100 µg/ml wurde ebenfalls 9:1 mit FITC-Dextran gemischt, so daß die in die Zellen injizierte Lösung eine C3-Toxin-Konzentration von 10 µg/ml hatte.

Der mit dem hochmolekularen Zucker Dextran markierte Fluoreszenzfarbstoff FITC verblieb nach Injektion in der Zelle und ermöglichte so ein späteres Wiederfinden der erfolgreich injizierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Nach 5, 10 und 20 h wurden die Zellen fixiert und immunocytochemisch aufbereitet oder Aktin-gefärbt.

6. Ergebnisse

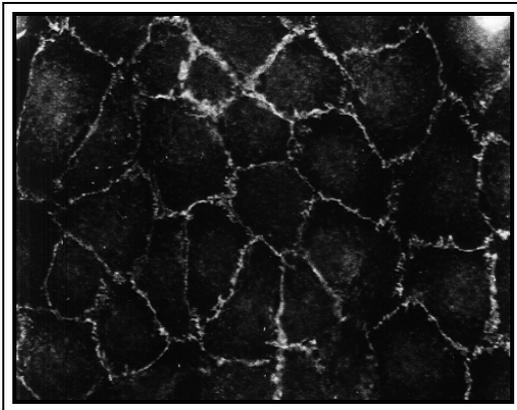
6.1 Beschreibung der Kontrollzellen

Im folgenden sollen nicht mit Toxinen oder Inhibitoren behandelte Endothelzellen im Hinblick auf Morphologie und Wanderungsverhalten, das Aktinfilamentsystem, die Zell-Zell-Kontakte und die Zell-Matrix-Kontakte beschrieben werden. Anhand von Fluoreszenzfärbungen wird so der Vergleich des Normalzustandes der Kontrollzellen zu den Veränderungen in den behandelten Zellen ermöglicht.

6.1.1 Morphologie und Wanderungsverhalten

Morphologische Einflüsse, d.h. Änderungen in der Gestalt der Zellen, wurden immunocytochemisch dargestellt. Da die alleinige lichtmikroskopische Darstellung morphologischer Veränderungen unbefriedigende Ergebnisse brachte, wurden sie durch Färbungen der an Zellkontakten beteiligten Proteine hervorgehoben. Es wurden Zellkontaktproteine und am Aufbau der Fokalkontakte beteiligte Proteine beurteilt (VE-Cadherin, alpha-, beta- und gamma-Catenin, p120, Vinculin, Paxillin und FAK).

Endothelzellen, die bis zum Versuchsbeginn in normalem Medium kultiviert wurden, zeigten 2 bis 3 Tage nach dem Aussäen das typische Bild von im



Verband wachsenden Endothelzellen. Sie waren konfluent gewachsen und hatten eine polygonale Form (Abb.2).

Abb.2: Endothelzellen 3 Tage nach Aussaat. Zellkontakt-Darstellung mit β -Catenin Antikörpern

Nachdem in einem solchen Zellrasen mit einer Pipettenspitze ein etwa 1 mm breiter Streifen abgeschabt wurde (Läsion), begannen die Zellen in diesen Wundspalt einzuwachsen. Nach wenigen Stunden lösten die Zellen am Verwundungsrand ihren Kontakt zu den hinter ihnen liegenden Zellen teilweise und veränderten ihre Form. Sie wurden länglich und begannen, breitbasige Fortsätze, Lamellopodien, in den Spalt einfließen zu lassen. Dies beschreibt die erste Phase der Migration (Abb.3a).

Nach weiteren 10 h zeigten sich zwischen wandernden und zurückbleibenden Zellen größere Lücken. Zu den Lamellopodien kamen nach 5 weiteren Stunden ausgeprägte Pseudopodien hinzu und die wandernden Zellen streckten sich weit in den Spalt hinein. Dies beschreibt die zweite Phase der Migration. Genaue Zeitangaben für das Erreichen der Migrationsphasen blieben schwierig, da sich die einzelnen Zellen sehr unterschiedlich verhielten. Die gemachten Zeitangaben sind also nur um Näherungsangaben (Abb.3b). Die etwa 1 mm breite abgeschabte Fläche wurde in zirka 30-40 h von den wandernden Zellen überbrückt. Nach weiteren 20-30 h hatten sie einen kontinuierlichen Verband gebildet und die Läsion vollständig verschlossen.

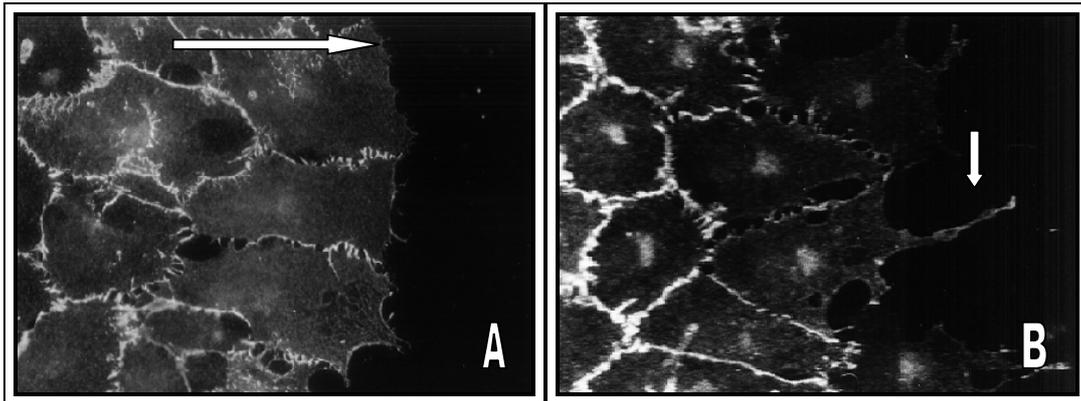
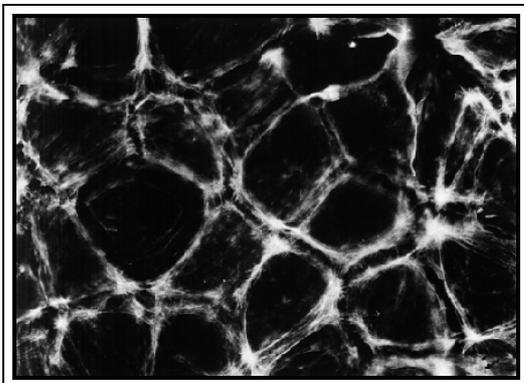


Abb.3a: Endothelzellen 5 h nach dem Setzen einer Läsion (rechter Bildrand) in einer p120-Immunfärbung. Die Zellen nehmen eine im Vergleich zu den im Verband liegenden Zellen längliche Form an und schieben in der 1. Migrationsphase breitbasige Ausläufer (Lamellopodien) mit kleinen Ausziehungen in die Läsion (Pfeil: Wanderungsrichtung).

Abb.3b: Endothelzellen 15 h nach Setzen der Läsion. Es dominieren lange dünne Fortsätze, sogenannte Pseudopodien (Pfeil), die in die Läsion hineingeschoben werden (gamma-Catenin-Immunfärbung).

6.1.2 Aktinfilamentsystem

Das Aktinfilamentsystem der Kontrollzellen im Verband zeigte in der Phalloidin-TRITC-Färbung das reguläre Bild mit dem typischen randständigen Aktinring und wenigen durch die Zelle laufenden Stressfasern. Das kortikale



Aktinnetz war in der Immunfluoreszenzfärbung nicht darstellbar (Abb.4).

Abb.4: Phalloidin-TRITC-Färbung zur Darstellung der Aktinfilamente im Endothelzell-Verband. Deutlich zu erkennen ist das Zell-Zell-Kontakt-assoziierte Aktinsystem, das vor allem in ruhenden Zellen ausgebildet ist.

In den Zellen, welche in die gesetzte Läsion einwuchsen, kam es zu einer Umorganisation des Aktinfilamentsystems. Es wurden vermehrt Stressfasern gebildet. In der ersten Migrationsphase richteten sich diese Aktinfilamentbündel in den vorgeschobenen Lamellopodien meist quer zur Wanderungsrichtung aus. Der periphere Aktinfilamentring umspannte die wandernden Zellen nicht mehr kontinuierlich. Lediglich entlang der Kontaktbereiche zu den rückwärtigen Zellen war das Zell-Zell-Kontakt-assoziierte Aktinfilamentsystem zu sehen. Allerdings erschien es nicht mehr so stark ausgeprägt.

In der zweiten Migrationsphase richteten sich die Stressfasern in den Pseudopodien parallel zur Wanderungsrichtung aus. Sie durchzogen die gesamte Zelle, eine deutlichere Konzentrierung war jedoch in der Zellperipherie und in den dünnen Pseudopodienausläufern zu erkennen. Besonders entlang der Ränder dieser Pseudopodien verliefen dicke Stressfasern (*Abb.5*).

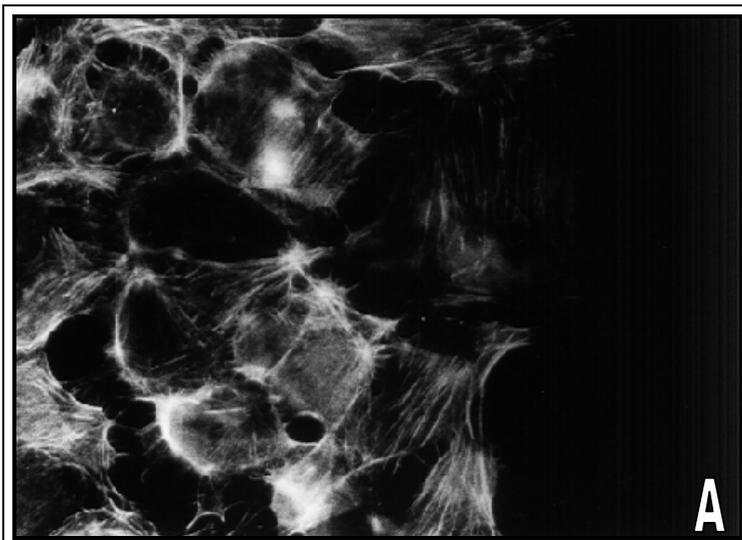
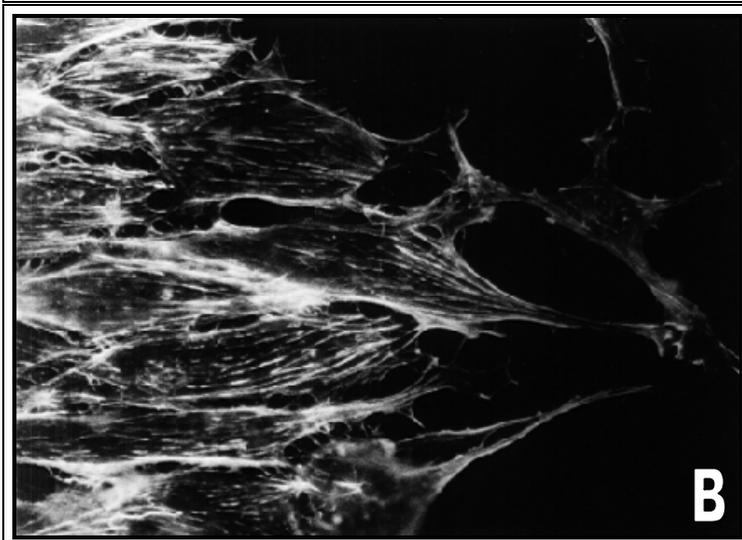


Abb.5: Migrierende Endothelzellen in der Phalloidin-TRITC-Färbung.

A: Die erste Migrationsphase ist geprägt von Lamellopodien-Ausläufern und quer zur Wanderungsrichtung laufenden Stressfasern.



B: Die zweite Migrationsphase ist geprägt von Pseudopodien-Ausläufern und parallel zur Wanderungsrichtung laufenden Stressfasern.

6.1.3 Zell-Zell-Kontaktproteine

Die Zell-Zell-Kontakte wurden immunfluoreszenzmikroskopisch mit Antikörpern gegen alpha-, beta-, gamma-Catenin, p120 und VE-Cadherin dargestellt.

Alpha-Catenin zeigte in der Immunfärbung konfluent gewachsener Zellen eine deutliche Fluoreszenzzone entlang der Zellgrenzen. Typischerweise erschienen die Zell-Zell-Kontaktzonen teils schmal, meist jedoch breit und aufgelockert. Es fanden sich dünne Linien, aufgefächert und auch blasig erscheinende Zonen, die den alpha-Catenin enthaltenden Zell-Zellkontakten entsprachen

(Abb.6).

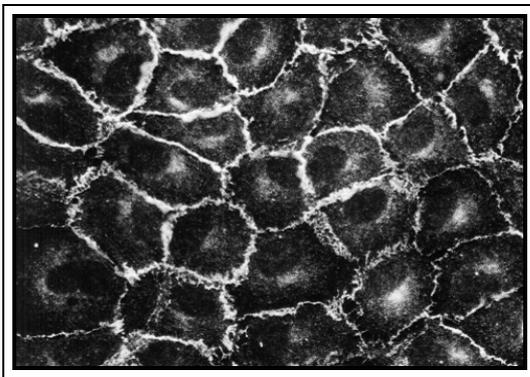


Abb.6: Im Verband wachsende Endothelzellen in der alpha-Catenin-Immunfärbung. Die alpha-Catenin enthaltenden Zell-Zell-Kontakte sind kontinuierlich entlang der Zellgrenzen angeordnet.

In den wandernden Zellen blieb alpha-Catenin bestehen. Dort, wo die Zellkontakte erhalten blieben, zeigte sich ein reguläres Verteilungsbild von alpha-Catenin. An den Stellen, an denen sich die Zellen voneinander lösten und Lücken zwischen ihnen entstanden, verschwand alpha-Catenin teilweise ganz, teils war es noch in den Zytoplasmabrücken nachzuweisen. Zwischen den wandernden Zellen wirkte die Kontaktzone häufig jalousienartig aufgefächert (Abb.7).

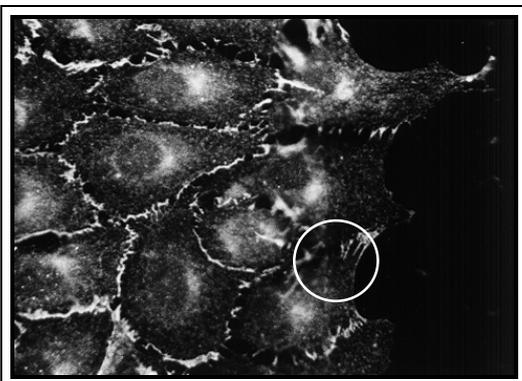


Abb.7: Wandernde Endothelzellen 10 h nach Setzen der Läsion (rechter Bildrand) in der alpha-Catenin-Immunfärbung. Markiert ist der Bereich in dem benachbarte wandernde Zellen ihre Zellkontakte jalousienartig aufgefächern und später lösen.

Die Immunfärbungen für alpha-Catenin, beta-Catenin, gamma-Catenin und p120 unterschieden sich in Verteilung und Intensität weder in der Kontrolle noch unter den späteren Versuchsbedingungen.

Das Zellkontaktprotein VE-Cadherin stellte sich im konfluenten Zellrasen durch eine teils durchgehende, teils unterbrochene Fluoreszenzlinie entlang der Zellgrenzen dar. An manchen Stellen verbreiterte sich diese Linie flächig und erschien blasig aufgelockert.

Zwischen den wandernden Zellen fanden sich kaum noch durchgehende Linien. VE-Cadherin war meist nur noch punktförmig entlang der Zellgrenzen nachweisbar (*Abb.8*).

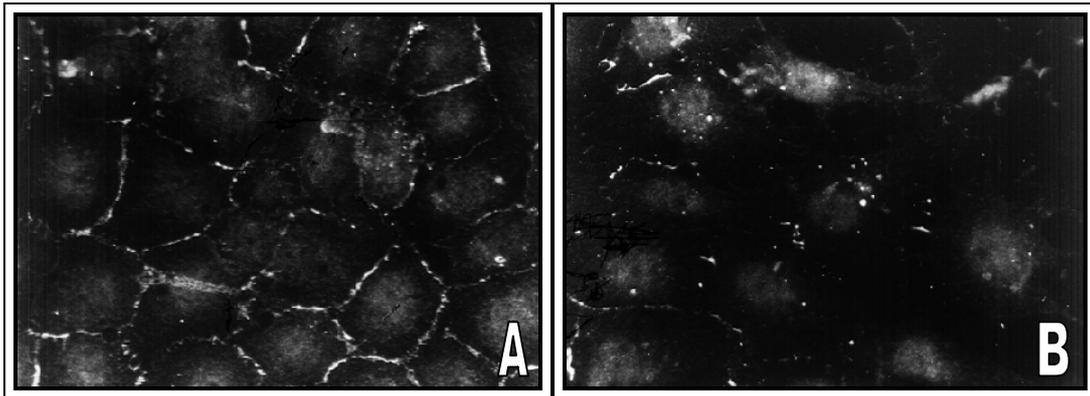


Abb.8a: Im Verband gewachsene Endothelzellen in der VE-Cadherin-Immunfärbung. VE-Cadherin ist diskontinuierlich entlang der Zellgrenzen verteilt.

Abb.8b: In die Läsion (rechter Bildrand) einwandernde Endothelzellen in der VE-Cadherin-Immunfärbung. Nur an wenigen Stellen haben die Endothelzellen noch Kontakt zueinander und VE-Cadherin ist nur selten kontinuierlich entlang der Zellgrenzen nachweisbar.

6.1.4 Zell-Matrix-Kontaktproteine

Das Verteilungsmuster der Fokalkontaktproteine Vinculin, Paxillin und der FAK (Fokalkontakt-Kinase) wurde ebenfalls mittels der Immunfluoreszenzmikroskopie beurteilt. Das in Fokalkontakten und Zell-Zell-Kontakten zu findende Aktin-bindende Plaqueprotein Vinculin fand sich in ruhenden Zellen verstärkt entlang der Zellgrenzen. Vornehmlich in der Zellperipherie zeigte sich eine teils punktförmige, teils längliche Vinculin-Verteilung, entsprechend der typischen Verteilung von Fokalkontakten (*Abb.9*).

In den wandernden Zellen erschien Vinculin vermehrt. Deutlich intensiver gefärbt verliefen sowohl als unterbrochene als auch als ununterbrochene Linien dargestellte Vinculin-Ansammlungen durch die Zelle. In der ersten Migrationsphase verliefen diese Linien quer zur Wanderungsrichtung, in der zweiten Phase parallel zu ihr. Die Spitzen der Pseudopodien und deren Ränder wiesen starke Vinculinfluoreszenzen auf. Diese Vinculin-Ansammlungen entsprechen Fokalkontakten, die wiederum in Kontakt mit dem Aktinzytoskelett stehen (*Abb.9*).

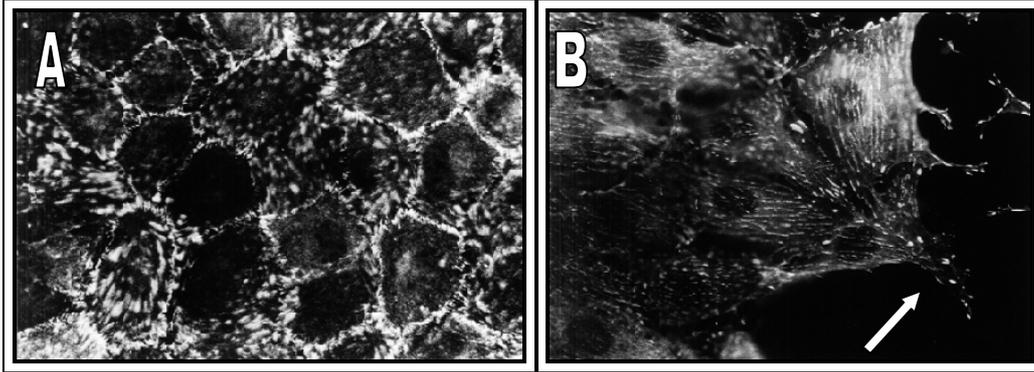
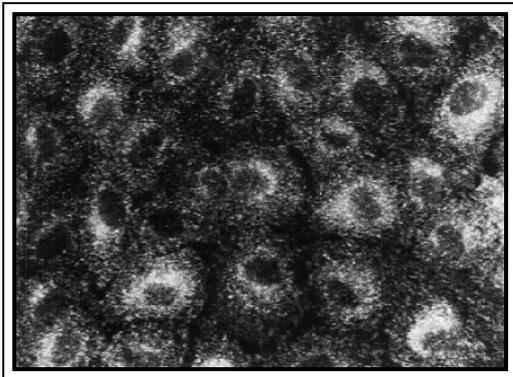


Abb.9a: Ruhende Endothelzellen in der Vinculin-Immunfärbung. Vinculin ist in ruhenden Endothelzellen vornehmlich entlang der Zellgrenzen lokalisiert. Die Fokalkontakte sind unregelmäßig basal der Zelle verteilt und deutlich weniger als in wandernden Zellen (vgl. Abb.9a).

Abb.9b: Endothelzellen 10 h nach Setzen der Läsion in der Vinculin-Immunfärbung. Die Ausrichtung der Vinculin enthaltenden Zell-Matrixkontakte gemäß der Ausrichtung der Stressfasern wird deutlich (vgl. Abb.5). Besonders an den Enden der Pseudopodien bilden sich große Vinculin-haltige Zell-Matrix-Kontakte (Pfeil).

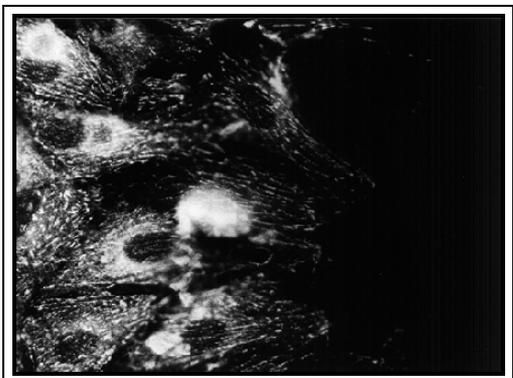
Das Fokalkontaktprotein Paxillin war in ruhenden Endothelzellen keiner Struktur zuzuordnen. Im Zellrasen erschien Paxillin diffus basal in der Zelle



verteilt und fein gekörnt. Im Vergleich zu Vinculin fehlt es im Bereich der Interzellularkontakte. Die Fluoreszenz war in der Zellperipherie schwächer als kernnah.

Abb.11: Im Verband gewachsene Endothelzellen in der Paxillin-Immunfärbung

In den Kontrollzellen, die in den Wundspalt einwuchsen, erschien Paxillin



besonders an den Spitzen der Zellausläufer konzentriert zu sein. Dort bildeten sich anscheinend neue, besonders kräftige Fokalkontakte aus. Ansonsten wurde die Körnung gröber.

Abb.12: Endothelzellen 20 h nach Setzen der Läsion (rechter Bildrand). Paxillin-Immunfärbung

Es zeigte sich eine sehr an die Vinculinfärbung erinnernde Paxillinverteilung. Teilweise unterbrochene Fluoreszenzlinien durchzogen, ausgerichtet wie Stressfasern, die ganze Zelle. An den vorderen Enden der sich in den Wundrand einschiebenden Zellen fanden sich dicke, punktförmige Paxillin-Ansammlungen, welche Paxillin-enthaltenden Fokalkontakten entsprachen.

Die Fokalkontakt-Kinase (FAK) zeigte in der Immunfärbung das gleiche Bild wie Paxillin.

6.2 Der FCS/Lovastatin-Versuch

Wie bereits beschrieben, blockiert Lovastatin den geschwindigkeitsbestimmenden HMG-CoA-Reduktase-abhängigen Schritt der Cholesterinsynthese und verhindert so die Bildung der Isoprene Farnesyl und Geranyl und damit konsekutiv deren Bindung an die GTP-bindende-Proteine (Essig et al., 1998; Koch et al., 1997; Fenton et al., 1992).

Durch serumfreies Medium können den Zellen einerseits die Ausgangsstoffe für die Synthese der Isoprene vorenthalten werden, andererseits fehlen dadurch Wachstumsfaktoren und GTP-Protein-Stimulatoren wie LPA.

Die Effekte von Lovastatinbehandlung und Serumentzug wurden isoliert und kombiniert betrachtet.

Im folgenden werden jeweils die Veränderungen der Zellen unter drei verschiedenen Versuchsbedingungen dargestellt:

- Zellen in serumfreiem Medium ohne Lovastatinzugabe
- Zellen in serumhaltigem Medium nach Lovastatinzugabe
- Zellen in serumfreiem Medium nach Lovastatinzugabe

6.2.1 Zellen in serumfreiem Medium ohne Lovastatinzugabe

6.2.1.1 Morphologie und Wanderungsverhalten

Die Zellen im Verband, denen FCS vorenthalten wurde, zeigten auch nach 20 h keinen morphologischen Unterschied zu den Kontrollzellen.

Zellen am Rand der Läsion wanderten ohne FCS die ersten Stunden zwar wie die Kontrollzellen, verlangsamten aber nach ca. 10 h ihre Migration deutlich und waren nicht in der Lage, den Spalt zu verschließen. Morphologisch unterschieden auch sie sich nicht von den Kontrollzellen.

6.2.1.1 Aktinfilamentsystem

In den ruhenden Zellen war kein entscheidender Einfluß des Serumentzugs auf das Aktinfilamentsystem festzustellen.

Die wandernden Zellen unterschieden sich von den Kontrollzellen durch dünnere und an Zahl leicht verminderte Stressfasern. Die Ausrichtung der Stressfasern schien dagegen nicht beeinflusst.

6.2.1.2 Zell-Zell-Kontaktproteine

Serumentzug wirkte sich auch nach 20 h Dauer nicht auf die Verteilung der Zell-Zell-Kontaktproteine wie der Catenine und VE-Cadherin aus.

6.2.1.3 Zell-Matrix-Kontaktproteine

Die Verteilung der Zell-Matrix-Kontaktproteine wurde ebenfalls nicht durch den Serumentzug beeinflusst.

6.2.2 Zellen in serumhaltigem Medium nach Lovastatinzugabe

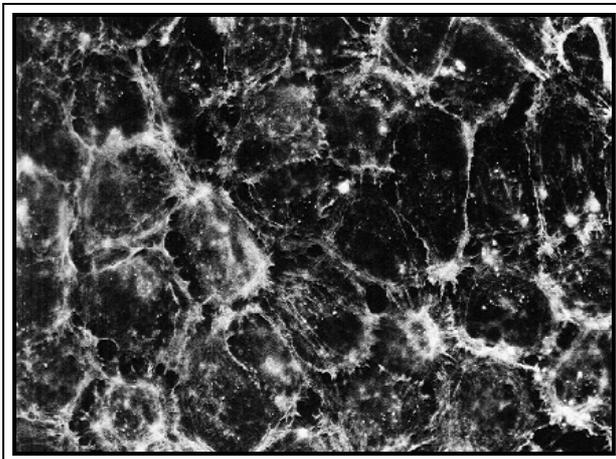
6.2.2.1 Morphologie und Wanderungsverhalten

In ruhenden Zellen zeigte sich kein Unterschied zu den Kontrollzellen.

Wandernde Zellen bildeten zwischeneinander größere Lücken als die Kontrollzellen, arborisierten und waren nicht in der Lage, die gesetzte Läsion zu überbrücken.

6.2.2.2 Aktinfilamentsystem

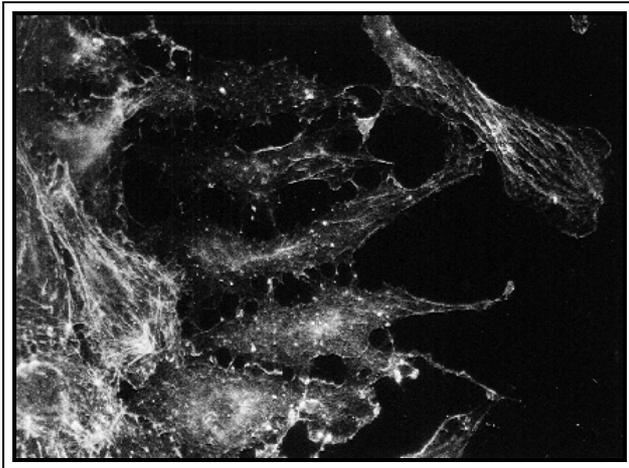
Zellen im Zellrasen, die mit Lovastatin behandelt wurden, zeigten bereits nach 5 h einen weitgehenden Zusammenbruch des Aktinfilamentsystems. Der in



den Kontrollzellen gut darstellbare periphere Aktinring war nun kaum noch nachzuweisen. Auch durch die Zelle laufende Stressfasern waren nur noch selten erkennbar.

Abb. 14: Lovastatinwirkung (30 µM) nach 5 h in der Phalloidin-TRITC-Färbung

Bei den in die Läsion einwandernden Zellen erschien die Zahl und Dicke der

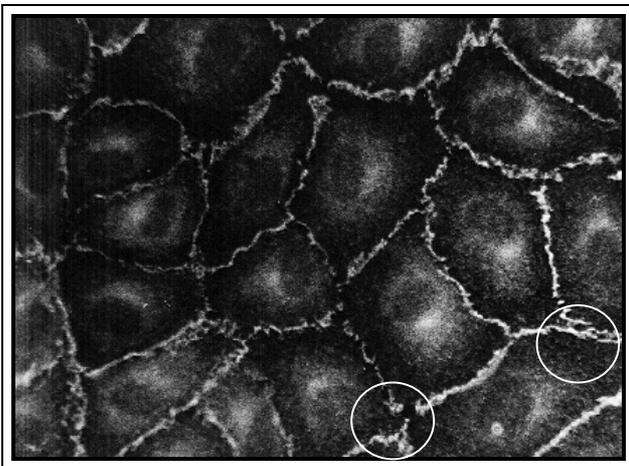


Stressfasern ebenfalls stark vermindert. Die Ausrichtung der Stressfasern gemäß den Migrationsphasen war nur vereinzelt nachweisbar.

Abb.15: Endothelzellen 20 h nach Setzen der Läsion (rechter Bildrand) und Lovastatinzugabe (30 μ M) in der Aktin-Färbung

6.2.2.3 Zell-Zell-Kontaktproteine

Die im Zellverband liegenden Zellen zeigten nach langer Einwirkzeit von Lovastatin (20 h) kleine Unterbrechungen in der sonst durchgängigen Immunfluoreszenz der Catenine um die Zellen. Es schienen kleine Lücken zwischen den Zellen entstanden zu sein. Eventuell handelte es sich hierbei



zumindest teilweise auch um transzelluläre Löcher. Immunocytochemisch war dies nicht einwandfrei zu klären.

Abb.16: Ruhende Endothelzellen in der alpha-Catenin-Färbung: Markiert sind Bereiche, in denen bei genauer Auflösung interzelluläre Lücken erkennbar sind.

Bei den wandernden Zellen erschienen die Lücken zwischen den Zellen größer als bei den Kontrollzellen. Ansonsten war kein wesentlicher Unterschied festzustellen.

VE-Cadherin verhielt sich wie die Catenine.

6.2.2.4 Zell-Matrix-Kontaktproteine

In den ruhenden Zellen erschien das mit Zell-Zell-Kontakten assoziierte Vinculin entlang der Zellgrenzen deutlich vermindert (vgl. Abb.9a).

In jenen Endothelzellen, die in die Läsion eingewandert und weitgehend arborisiert waren, zeigten sich die Vinculin-enthaltenden Zell-Matrix-Kontakte kaum vorhanden und deutlich weniger ausgerichtet als in den Kontrollzellen (vgl. Abb. 9b). Auch die Intensität ihrer Vinculin-Fluoreszenz war eindeutig schwächer ausgeprägt (Abb. 17).

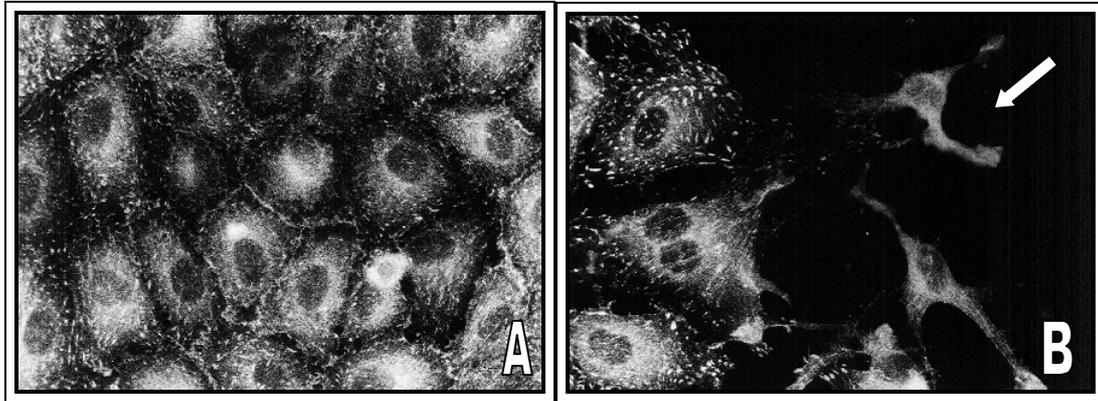


Abb. 17:

A) Ruhende Endothelzellen nach 20 h Lovastatineinwirkung ($30 \mu\text{M}$) in der Vinculin-Färbung

B) Wandernde Endothelzellen 20 h nach Setzen der Läsion (rechter Bildrand) und Lovastatinzugabe ($30 \mu\text{M}$). Die Zellen, die weit in die Läsion eingewandert sind, zeigen kaum Vinculin-enthaltende Fokalkontakte (Pfeil).

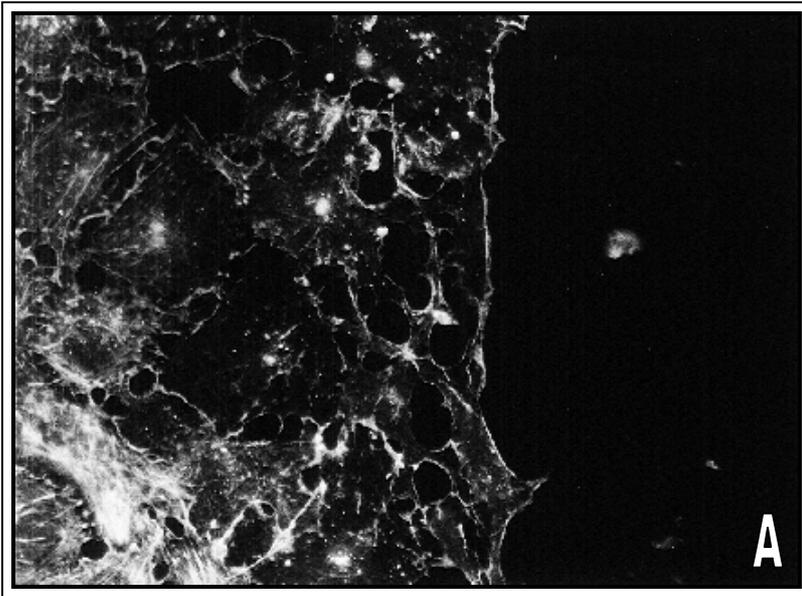
Ein Einfluß von Lovastatin auf die Paxillinverteilung in ruhenden Endothelzellen war nicht nachzuweisen.

In den wandernden Zellen führte Lovastatin allerdings, ähnlich wie bei Vinculin, zu einer schwächeren Ausrichtung von Paxillin-enthaltenden Fokalkontakten sowie zu einer Verkleinerung der gefärbten Bereiche.

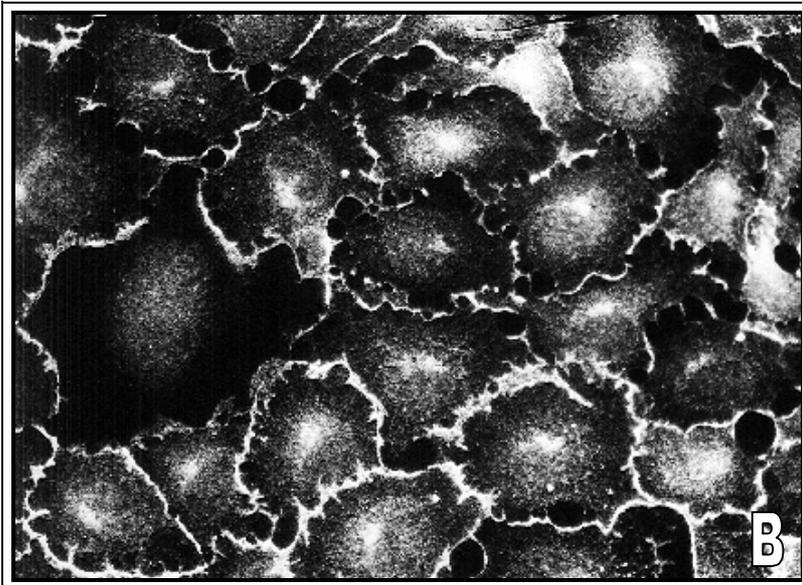
6.2.3 Zellen in serumfreiem Medium nach Lovastatinzugabe

Die Effekte des Entzugs von Serum zusätzlich zur Lovastatinbehandlung lagen in einer Verstärkung der bereits unter 6.2.2 beschriebenen Effekte.

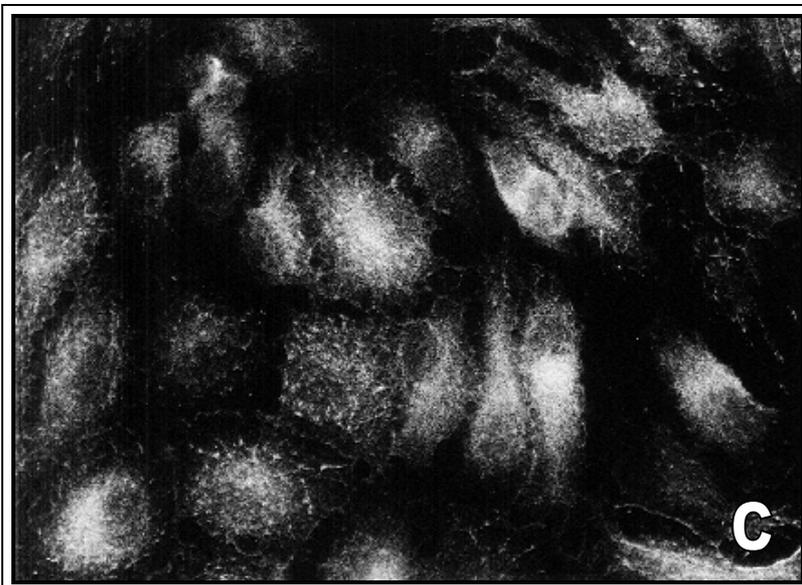
Die Zellen wanderten kaum in die Läsion ein, bildeten keine regelhaften Zellausläufer und waren auch nicht in der Lage, den Wundspalt zu verschließen. Das Stressfasersystem brach fast völlig zusammen, die Lückenbildung zwischen den Zellen war stärker ausgeprägt als bei alleiniger Lovastatin-Wirkung und auch die Zell-Matrix-Kontaktproteine waren sowohl in wandernden als auch in ruhenden Zellen in ihren typischen Lokalisationen deutlich vermindert (Abb. 18).

**Abb. 18:**

A: Phalloidin-TRITC-Färbung 15 h nach Serum-Entzug, Lovastatin-Zugabe und Setzen der Läsion.



B: Ruhende Zellen 20 h nach Serumentzug und Lovastatinzugabe in der alpha-Catenin-Färbung. Deutlich zu sehen ist eine interzelluläre oder intrazelluläre Lückenbildung.



C: Ruhende Zellen 20 h nach Serumentzug und Lovastatinzugabe (30 μ M) in der Vinculin-Immunfluoreszenz. Die regelhafte Vinculin-Verteilung scheint völlig aufgelöst (vgl. Abb. 9).

6.3 Der Toxin-B-Versuch

Das zellmembranpermeable Enterotoxin Toxin-B wurde in einer Wirkkonzentration von 50 µg/ml den Zellen zugegeben. Zu Versuchsbeginn wurde auch hier eine Verwundung in den Zellverband gesetzt, um später das Migrationsverhalten der Zellen mit beurteilen zu können. Die Zellen wurden nach 45 min, 1.5 und 2.5 h fixiert und immungefärbt.

Die Kontrollzellen für diesen Versuch zeigten das bereits unter 6.1 beschriebene reguläre Bild. Untersucht wurden die gleichen Parameter wie im Lovastatinversuch.

6.3.1 Morphologie und Wanderungsverhalten

Die Morphologie der Zellen konnte immunocytochemisch eindrucksvoller als rein kontrastmikroskopisch dargestellt werden.

Die konfluent gewachsenen Zellen wiesen bereits nach 45 min eine Lückenbildung auf.

Auch die wandernden Zellen zeigten eine verstärkte Lückenbildung. Die Lücken wurden sowohl im Zellverband als auch zwischen den Zellen am Rand der gesetzten Läsion im weiteren Beobachtungszeitraum größer und zahlreicher.

Diese Zellen erreichten, wie die Kontrollzellen, das erste und teilweise sogar das zweite Stadium der Migration. Sowohl Lamellopodien als auch Pseudopodien waren zu beobachten. Sie waren aber, anders als die Kontrollzellen, nicht in der Lage zu migrieren.

6.3.2 Aktinfilamentsystem

Bereits nach 45 min Toxin-B-Einwirkung waren nur einige wenige durch die Zelle verlaufenden Stressfasern zu erkennen und der periphere Aktinring erschien kondensiert. Nach 2.5 Stunden war das Aktinfilamentsystem in wandernden wie in ruhenden Endothelzellen völlig zusammengebrochen. Demnach war auch keine Ausrichtung der Stressfasern gemäß den Migrationsphasen zu erkennen. In den Zellen waren kleine runde Strukturen zur Darstellung gebracht, die bei stärkerer Vergrößerung ringförmig erschienen. Ob es sich dabei um Artefakte oder eine spezifische Aktin-Färbung handelte, war nicht zu entscheiden (*Abb.19*).

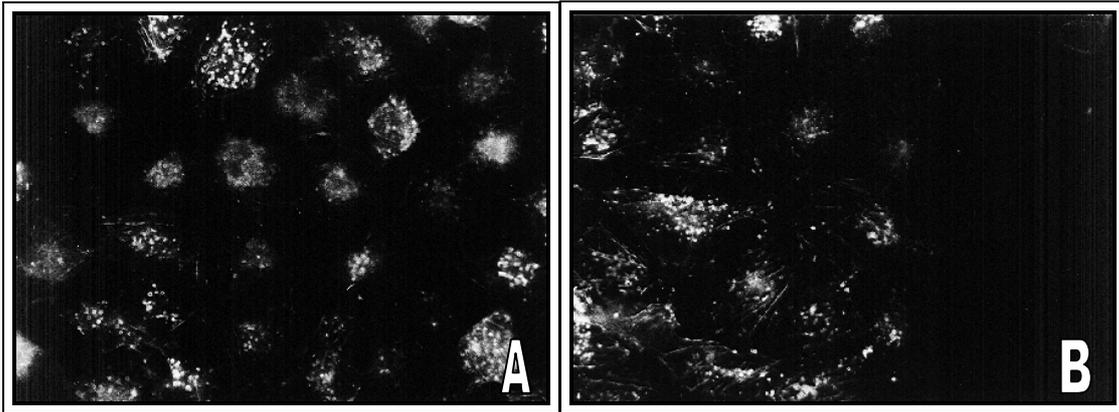


Abb. 19:

A) Ruhende Zellen, 2.5 h nach Toxin-B-Zugabe (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in der Phalloidin-TRITC-Färbung. Der Zell-Zell-Kontakt-assoziierte Aktinring ist nicht mehr nachzuweisen.

B) Migrierende Zellen, welche in eine 2.5 h zuvor gesetzte Läsion (rechter Bildrand) unter Toxin-B (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) einwanderten, ebenfalls in der Phalloidin-TRITC-Färbung. Es sind keine Stressfasern darstellbar.

6.3.3 Zell-Zell-Kontaktproteine

Aus der Gruppe der Catenine sei stellvertretend das p120 herausgegriffen. Die Verteilung von alpha-, beta- und gamma-Catenin unterschied sich in der Immunfluoreszenz nicht von der des p120.

Nach 45 min Toxin-B-Einwirkung war in der p120-Färbung sowohl bei ruhenden als auch bei wandernden Zellen eine deutliche Lückenbildung zu sehen. Auch hier war nicht eindeutig zu entscheiden, ob es sich um inter- oder intrazelluläre Löcher handelte. Der Effekt verstärkte sich mit längerer Einwirkzeit des Toxins noch weiter.

Die VE-Cadherin-Verteilung glich der der Catenine. Auch VE-Cadherin war in ruhenden und wandernden Zellen nicht kontinuierlich um die Zellgrenzen herum nachweisbar.

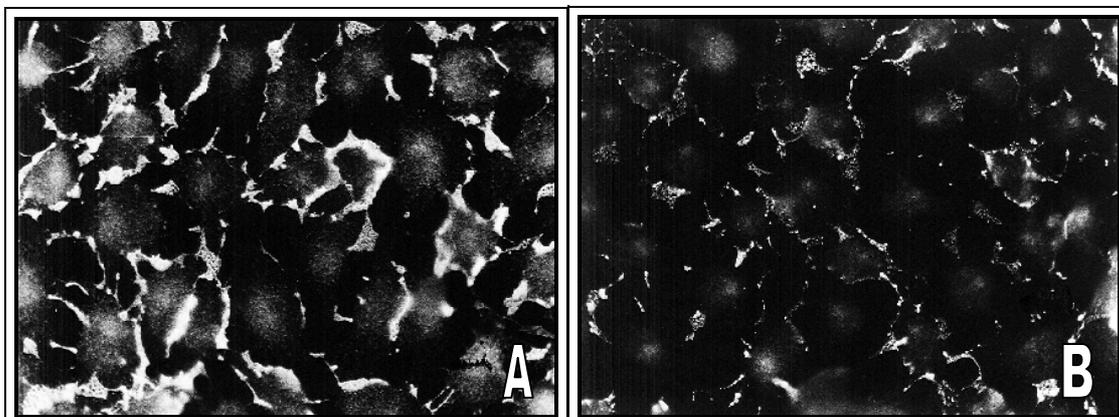


Abb. 20: Ruhende Zellen, 2.5 h nach Toxin-B-Zugabe (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in der p120 (**A**) und in der VE-Cadherin (**B**) Immunfärbung

6.3.4 Zell-Matrix-Kontaktproteine

Toxin-B-Einwirkung beeinflusste die Verteilung des in Fokalkontakten und Zell-Zell-Kontakten vorkommenden Vinculins.

Nach 45 min war in einigen Zellen bereits eine deutliche Minderung an Zahl und Intensität der fluoreszenzgefärbten Vinculin-enthaltenden Strukturen erkennbar. Im Vergleich zu den Kontrollzellen erschien besonders das sonst entlang der Zellgrenzen der ruhenden Zellen gehäuft dargestellte Vinculin vermindert (*Abb.21*).

Die migrierenden Zellen zeigten zwar die typische Verteilung von Vinculin in den Lamellopodien bzw. Pseudopodien und entlang der Stressfasern, allerdings erschienen die einzelnen Vinculin-gefärbten Bereiche deutlich weniger fluoreszierend. Über die Zeit verstärkte sich dieser Effekt (*Abb.21*).

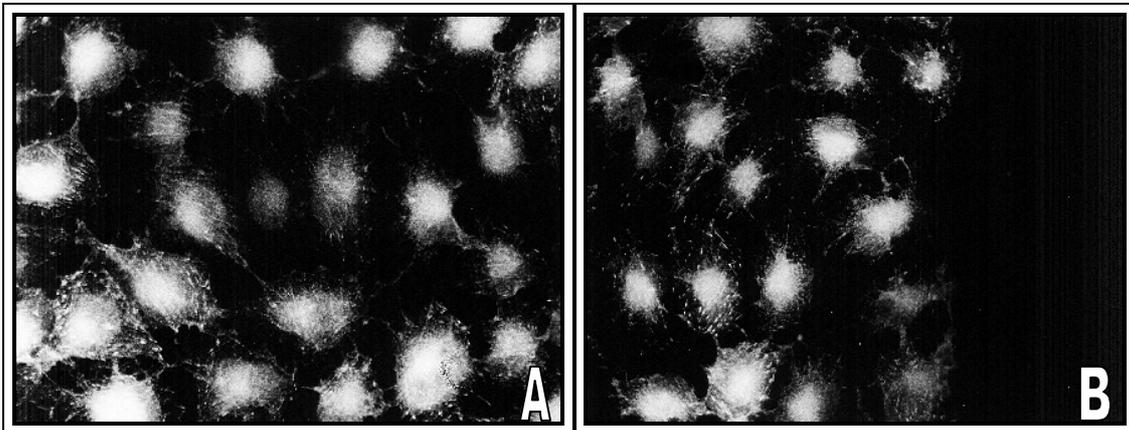


Abb.21: Ruhende (**A**) und in die gesetzte Läsion (rechter Bildrand) einwandernde (**B**) Zellen 2.5 h nach Toxin-B-Zugabe (50 µg/ml) in der Vinculin-Immunfärbung

Die Verteilung von Paxillin und FAK unterschied sich nach Toxin-B-Zugabe kaum von der des Vinculins.

6.4 Der C3-Toxin-Versuch

Die verwendeten Injektionslösungen und der Versuchsaufbau wurden bereits unter 5.3 abgehandelt.

Um einen Einfluß des bloßen Injektionsvorgangs vom Effekt der injizierten Substanz trennen zu können, wurden im Vorlauf Zellen mit PBS injiziert. Sie zeigten keine Auffälligkeiten im Vergleich zu nicht injizierten Zellen. Wie beschrieben, wurden die Kontrollzellen mit PBS und, um das Wiederfinden der injizierten Zellen zu ermöglichen, zusätzlich mit FITC-Dextran injiziert.

6.4.1 Morphologie und Wanderungsverhalten

Zellen im Verband, die mit C3-Toxin und Dextran injiziert waren, bildeten bereits nach 30 min Löcher unterschiedlicher Größe im Zytoplasma, die an Zahl und Größe zunahmen, bis nur noch schmale Zytoplasmabrücken zwischen ihnen bestanden. Diese Löcher befanden sich vornehmlich am Zellrand. Nach 20 h war das gesamte Zytoplasma wabig von Löchern durchsetzt.

Injizierte Zellen, die sich am Verwundungsrand befanden, migrierten kaum. Sie waren nicht in der Lage, die Läsion zu verschließen. Nicht injizierte Zellen wanderten an ihnen vorbei. In den am Verwundungsrand liegenden, injizierten Zellen entstanden ebenso zahlreiche Löcher (*Abb.21*).

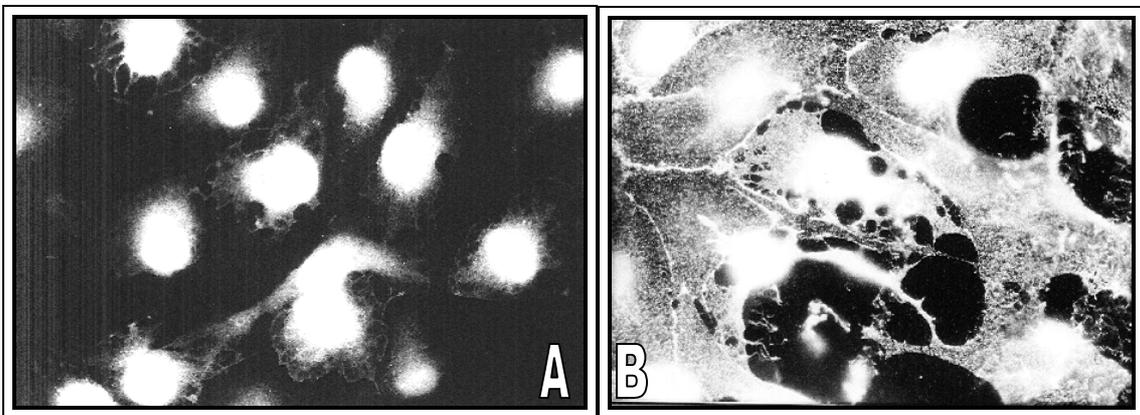


Abb.21: Ruhende (**A**) und am Rand der Läsion liegende und p120-immun-gefärbte (**B**) Endothelzellen. Die sichtbaren Zellen wurden mit einer Lösung aus PBS, Dextran-FITC und C3-Toxin (C3-Toxin Konzentration 10 µg/ml) injiziert und nach 20 h fixiert.

6.4.2 Aktinfilamentsystem

Das Aktinfilamentsystem in ruhenden und wandernden Zellen war bereits nach 5 h völlig zusammengebrochen. In den ruhenden Zellen war der Zell-Zell-Kontakt-assoziierte Aktinring nicht mehr nachweisbar. In wandernden Zellen konnten keine ausgerichteten Stressfasern mehr dargestellt werden. Lediglich entlang der Zellgrenzen färbte sich filamentäres Aktin als dünne, meist scharf begrenzte Fluoreszenzlinie (*Abb.22*).

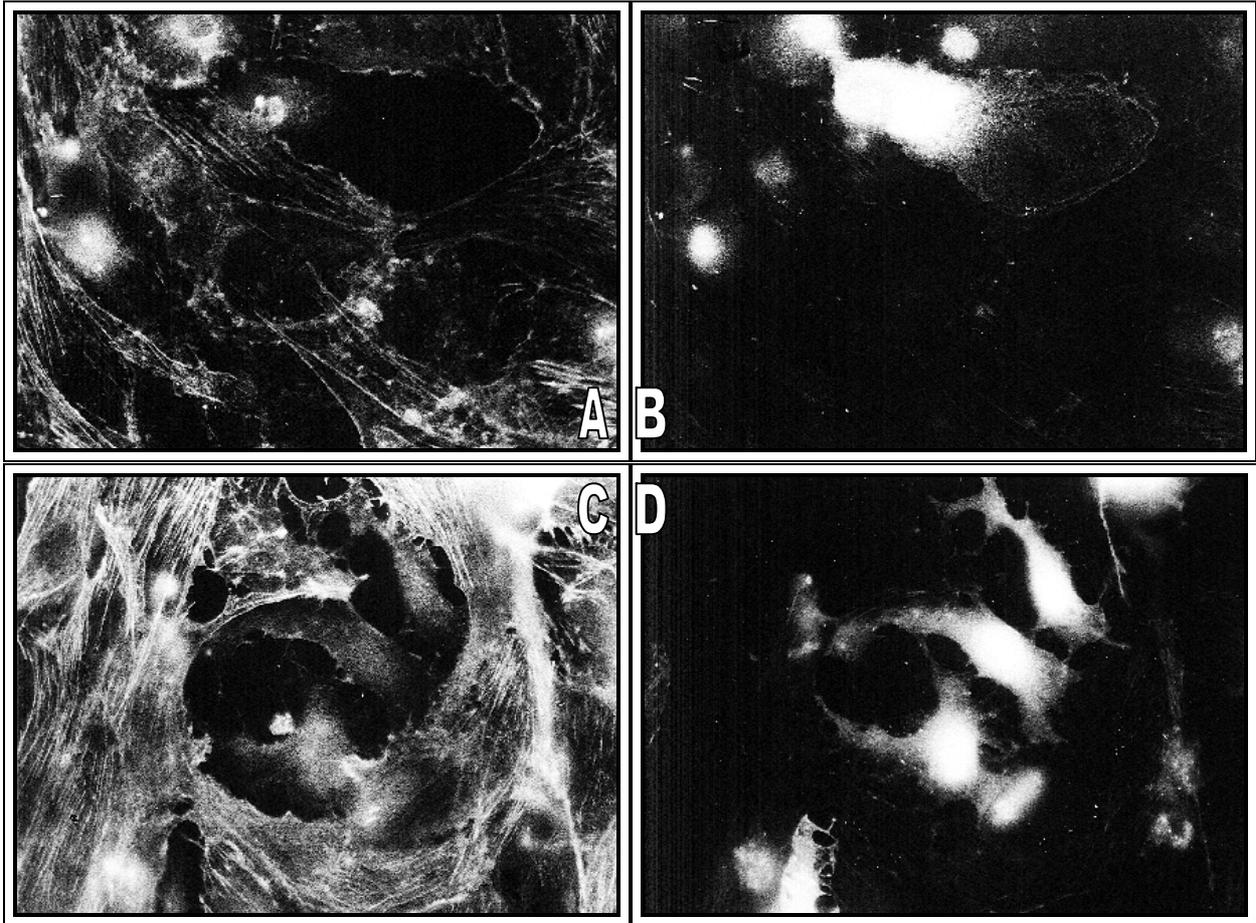


Abb.22: Abgebildet sind ruhende (**A,B**) und am Rand der Läsion gelegene (**C,D**) Endothelzellen. Die Phalloidin-TRITC-Färbung (**A,C**) stellt das Aktinfilamentsystem dar. Zur Identifizierung der injizierten Zellen dient die Kontrolle im FITC-Filter (**B,D**) (vgl. 5.3). In den injizierten Zellen ist kein filamentäres Aktin mehr nachweisbar.

6.4.3 Zell-Zell-Kontaktproteine

Die Wirkung der Injektion von C3-Toxin auf die Catenine soll beispielhaft an der p120-Immunfluoreszenzfärbung gezeigt werden.

Alpha-, beta- und gamma-Catenin unterschieden sich in der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung nicht von p120. Die in den Kontrollzellen breit gefächerte und aufgelockert erscheinende Fluoreszenzzone entlang der Zellgrenzen erschien bei mit C3-Toxin injizierten Zellen schmaler und schärfer begrenzt. P120 blieb allerdings im Gegensatz zu den mit Toxin-B behandelten Endothelzellen auch nach 20 h noch an den Zellkontaktzonen als weitgehend durchgehende Linie lokalisiert und war deutlich nachzuweisen. Dies galt für migrierende wie für im Verband wachsende Zellen. In der Immunfluoreszenz verhielt sich VE-Cadherin wie die Catenine. Die dargestellte, VE-Cadherin enthaltende Zone entlang der Zellgrenzen wurde schmaler und schärfer begrenzt, blieb aber erhalten (vgl. Abb.8). Auch hier unterschieden sich migrierende und wandernde Zellen nicht (Abb.23).

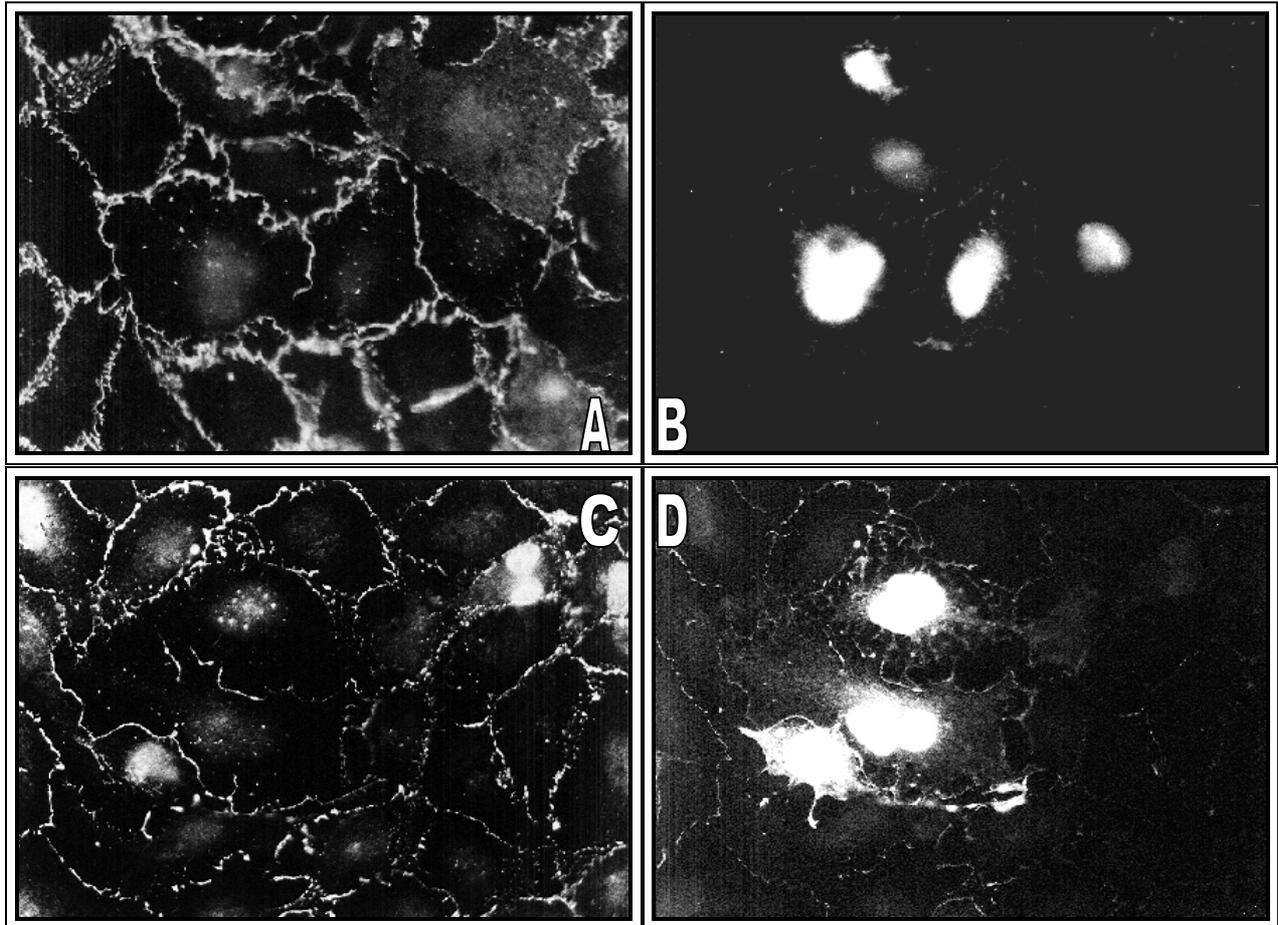


Abb.23: Gezeigt sind ruhende, im Verband liegende Endothelzellen in der p120- **(A)** und der VE-Cadherin-**(C)**Färbung 5 h nach C3-Toxin-Injektion.

B und **D** zeigen die selben Ausschnitte aus dem Zellrasen im FITC-Filter photographiert, um die injizierten Zellen zu identifizieren. Die Zell-Zell-Kontaktproteine werden in ihrer Verteilung nicht von C3-Toxin beeinflusst.

6.4.4 Zell-Matrix-Kontaktproteine

Die Verteilung von Vinculin wurde sehr stark durch die C3-Toxin-Injektion beeinflusst. Bereits nach 5 h war in ruhenden Endothelzellen weniger Vinculin entlang der Zellgrenzen nachweisbar. Auch in den am Verwundungsrand liegenden Zellen war nach 5 h kaum noch Vinculin zur Darstellung zu bringen. In ruhenden und in wandernden Zellen waren nur selten und wenige Vinculin-enhaltende Zell-Matrix-Kontakte nachweisbar, geschweige denn eine regelhafte Verteilung derselben (*Abb.24*).

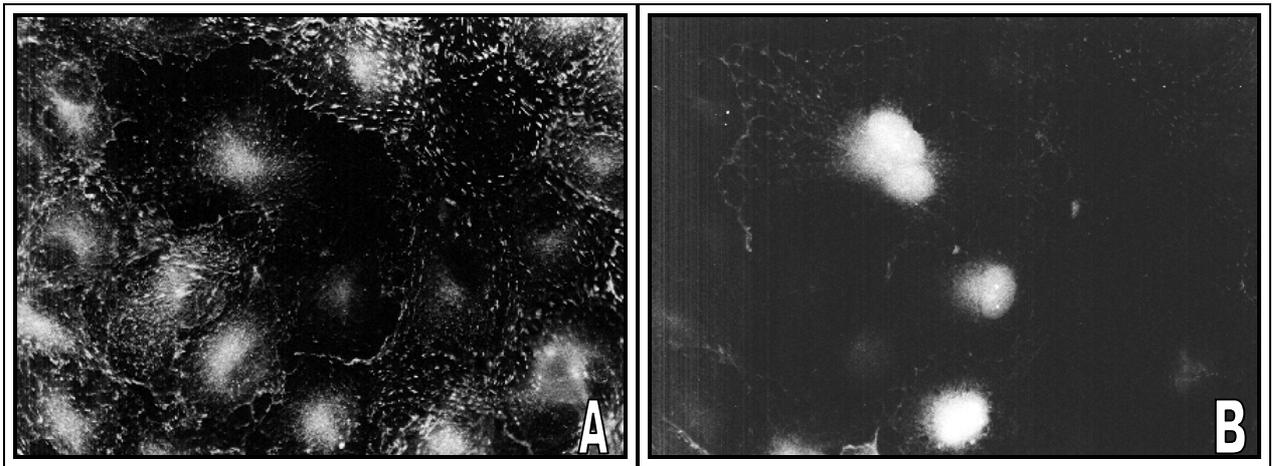


Abb.24: Ruhende Endothelzellen in der Vinculin-Immunfärbung (**A**) und mit dem FITC-Filter photographiert (**B**), 5 h nach C3-Toxin-Injektion. Vinculin enthaltende Zell-Matrixkontakte sind in den injizierten Zellen kaum noch nachzuweisen.

7. Diskussion

7.1 Der FCS/Lovastatinversuch

7.1.1 Zellen in serumfreiem Medium ohne Lovastatinzugabe

Der Serumentzug und damit der Entzug verschiedener Wachstumsfaktoren wie LPA, für das die Aktivierung von Rho-Proteinen belegt ist (Ridley und Hall, 1992), zeigte in ruhenden Zellen keinen Einfluß auf die Morphologie, das Aktinfilamentsystem, die Zell-Zell- und die Zell-Matrix-Kontaktproteine.

Das Wanderungsverhalten der Zellen wurde allerdings dahingehend beeinflusst, daß sie zwar begannen, in die Läsion einzuwandern, nach ca. 10 h aber liegen blieben und nicht in der Lage waren, die Läsion zu überbrücken.

Auch die Ausbildung der Stressfasern schien in diesen Zellen leicht vermindert. Anscheinend sind für die Migration von Endothelzellen Serumbestandteile wie LPA unabdingbar. Wie bereits geschildert, wirkt LPA über eine durch RhoA vermittelte Aktivierung von Proteinkinasen, wie beispielsweise der Rho-Kinase. Die Phosphorylierung von verschiedenen Zell-Kontakt-Proteinen ist für die Migrationsfähigkeit von Endothelzellen unerlässlich (Romer et al., 1994).

Die gemachte Beobachtung deckt sich desweiteren mit der für Fibroblasten gezeigten Wirkung von LPA und anderen Wachstumsfaktoren. Diese sind in der Lage, in Swiss-3T3-Fibroblasten über eine Rho-Protein-Aktivierung die Polymerisierung von Aktin und damit die Bildung von Stressfasern zu induzieren (Ridley und Hall, 1992). Im Umkehrschluß kann angenommen werden, daß bei dem Entzug von LPA und anderen Wachstumsfaktoren die Ausbildung eines regulären Aktinfilamentsystems vermindert sein müßte. Da dieses Aktinfilamentsystem in Form von Stressfasern und noch mehr in Form von kontraktile Aktin-Myosin-Einheiten aber den Migrationsmotor darstellt, mit dem sich die Zelle fortbewegen kann, ist es den Zellen unmöglich, weiter in die Läsion einzuwandern, wenn die Aktinfilamentbildung gehemmt wird. Inwieweit das Fehlen anderer Serumbestandteile einen Einfluß auf die verringerte Migrationsfähigkeit der Endothelzellen hatte, bleibt unklar.

7.1.2 Zellen in serumhaltigem Medium nach Lovastatinzugabe

Endothelzellen, die mit Lovastatin behandelt wurden, zeigten verschiedene Reaktionen.

Ruhende Zellen wiesen morphologisch zwar keinen wesentlichen Unterschied zu den Kontrollzellen auf, wandernde Zellen blieben allerdings nach kurzer Strecke liegen und arborisierten.

Bei diesen Zellen war eine deutliche Verringerung der Stressfasern zu beobachten.

Die HMG-CoA-Reduktase-Hemmung scheint also auch in Endothelzellen eventuell durch eine verminderte Geranylierung der Rho-Proteine zu einer verminderten Stressfaserpolymerisierung zu führen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen überein, die an Swiss-3T3-Fibroblasten und anderen Zelllinien gemacht wurden. Auch dort sind ein Aktinfilament-zusammenbruch und eine Arborisierung der Zellen nach Lovastatinzugabe beschrieben worden (Fenton et al., 1992; Chong et al., 1994; Koch et al., 1997). Nachdem vornehmlich Rac und RhoA durch Geranylierung aktiviert und somit durch Lovastatin gehemmt werden (Yoshida et al., 1991), könnte eines oder könnten beide Proteine in geranylierter Form für die Ausbildung der Stressfasern verantwortlich sein. Neben diesen wird aber eine Vielzahl anderer Proteine ebenfalls prenyliert. Inwieweit diese Proteine in die von den Rho-Proteinen regulierten Abläufe eingreifen, wurde nicht weiter abgeklärt. Ein Einfluß dieser Proteine kann also allgemein nicht ausgeschlossen werden. Nach längerer Einwirkzeit (20 h) führte Lovastatin neben einer Stressfaserverminderung zusätzlich zu einer Unterbrechung der Kontinuität der Zell-Zell-Kontaktproteine (Catenin, VE-Cadherin). Zwischen den Zellen bildeten sich Lücken. Ob diese Lückenbildung ein vom Zusammenbruch des Aktinfilamentsystems losgelöster Lovastatin-Effekt ist, ist nicht eindeutig zu erklären, da beide Effekte zeitgleich auftraten. Nachdem in Endothelzellen allerdings ein durch selektive RhoA-Blockade ausgelöster völliger F-Aktin-Zusammenbruch über mehr als 15 h hinweg bei erhaltenen Zell-Zell-Kontakten beobachtet werden konnte (s.u.), liegt nahe, daß dieser Effekt Rac- und/oder CDC42-vermittelt ist. Für Rac und beta-Catenin ist ein damit übereinstimmender Zusammenhang belegt (Takaishi et al., 1997). Auch CDC42 scheint an der Regulation von Catenin- und Cadherin-haltigen Zell-Zell-Kontakten beteiligt zu sein (Fukata et al., 1999).

Da, wie bereits in der Einleitung beschrieben, beta-Catenin in die Regulation von VE-Cadherin eingreift, das eventuell auch über RhoA gesteuert wird

(Hordijk et al., 1999) und die Gruppe der Catenine über verschiedene Proteinkinasen, welche wiederum auch über RhoA aktiviert werden, reguliert sind, bleibt eine definitive Zuordnung dieses Effekts zu einem speziellen Rho-Protein schwierig.

Ähnlich verhält es sich mit dem Einfluß von Lovastatin auf die Zell-Matrix-Kontaktproteine. Eine Verkleinerung der Fokalkontakte war, besonders in wandernden Zellen, durch Vinculin- und Paxillin-Darstellung nachzuweisen. Dies stimmt mit für Swiss-3T3-Fibroblasten beschriebenen Effekten überein. Als Substrate der LPA-vermittelten Phosphorylierung über Tyrosinkinasen wurden dort die Fokalkontaktproteine Paxillin und FAK beschrieben (Chong et al., 1994). Diese durch RhoA stimulierte Phosphorylierung schien jedoch von einem intakten Aktinfilamentsystem abhängig zu sein (Seufferlein und Rozengurt, 1994; Barry und Critchley, 1994). Rac wurde in verschiedenen Zellreihen für die Ausbildung von Fokalkomplexen und RhoA für deren weiteren Ausbau zu Fokalkontakten verantwortlich gemacht (s. 1.3). Auch in Endothelzellen scheint die Prenylierung der Rho-Proteine, eventuell auch anderer Proteine, für eine Phosphorylierung der Fokalkontaktproteine und somit für die Entstehung bzw. Aufrechterhaltung der Zell-Matrix-Kontakte notwendig zu sein.

Insgesamt bleibt der Effekt von Lovastatin schwer zu beurteilen. Nicht nur, daß weitere Proteine, auch außerhalb der Rho-Familie, physiologischerweise prenyliert vorliegen, sondern auch die Tatsache, daß mit der Hemmung der Synthese von Geranyl zwangsläufig auch die Hemmung der Synthese von Cholesterin, einem wichtigen Bestandteil der Zellmembran, einhergeht, erlaubt weitere Interpretation der Ergebnisse.

7.1.3 Zellen in serumfreiem Medium nach Lovastatinzugabe

Die Effekte, die in diesen Zellen gesehen wurden, unterschieden sich qualitativ nicht von den oben beschriebenen. Sie waren allerdings stärker ausgeprägt, was sich durch eine Addition der Effekte des Serumentzugs und der Lovastatinwirkung erklären läßt.

7.2 Der Toxin-B-Versuch

Toxin-B, das die Rho-Proteine RhoA, Rac und CDC42 durch Glykosilierung inaktiviert, zeigte eindrucksvolle Wirkung auf alle untersuchten Funktionseinheiten der Zelle.

Bereits nach einer Einwirkdauer von 45 min entstanden Lücken im Monolayer, die sich bei längerer Einwirkzeit weiter vergrößerten. Dies steht im Einklang mit Arbeiten, die eine Permeabilitätszunahme von Endothelzellrasen unter Toxin-B beschrieben. Die Permeabilitätszunahme wurde auf den ebenfalls unter Toxin-B gesehenen Stressfaserzusammenbruch zurückgeführt (Hippenstiel et al., 1997).

Die Zellen am Verwundungsrand waren unter Toxin-B nicht in der Lage, zu migrieren. Sie änderten allenfalls ihre polygonale Form in eine längliche. Sie waren zwar noch in der Lage, Lamellopodien und Pseudopodien in die Läsion einfließen zu lassen, blieben aber ortsständig. Dies ist, mit dem Lovastatinversuch vergleichbar, wahrscheinlich auf die durch die Rho-Blockade verhinderte Aktinpolymerisierung bzw. Fokalkontaktprotein-Phosphorylierung zurückzuführen (Aepfelbacher et al., 1997). Da das Toxin-B sowohl Rac, RhoA als auch CDC42 inhibiert, ist dieser Effekt zwar eindeutig der Inaktivierung eines oder mehrerer dieser Proteine zuzuschreiben; nachdem eine selektive RhoA-Blockade, wie später gezeigt ausreichte, um die Migration zu verhindern, scheint RhoA hierbei aber den wesentlichen Einfluß zu haben.

Wie bereits angedeutet, kam es unter Toxin-B zu einem Zusammenbruch des Aktinfilamentsystems. In ruhenden Zellen waren durch die Zellen laufende Stressfasern und der periphere Aktinring nach einer Einwirkzeit von 45 min bereits deutlich vermindert und nach 2.5 h kaum noch nachzuweisen. Auch die wandernden Zellen verloren ihre Stressfasern und es kam kaum zu der typischen Ausrichtung der Stressfasern gemäß den Migrationsphasen.

Diese Wirkung von Toxin-B wurde in verschiedenen Arbeiten auf die Blockade der Rho-Proteine zurückgeführt (Just et al., 1994 und 1995, Hippenstiel et al., 1997). Wie einleitend beschrieben, fördern die Rho-Proteine, insbesondere RhoA, über die Aktivierung von Kinasen bzw. die Hemmung von Serinphosphatasen die Phosphorylierung und Aktivierung von Myosin und so die Bildung und Ausrichtung von Stressfasern. Dies konnte vor allem für Fibroblasten belegt werden.

Auch in Endothelzellen spielen die Rho-Proteine am ehesten über die gesteigerte Myosin-Phosphorylierung durch erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität eine entscheidende Rolle beim Aufbau und der Aufrechterhaltung des Aktinfilamentsystems.

Auch die Zell-Zell-Kontakte wurden durch die Inaktivierung der Rho-Proteine beeinflusst. Bereits 45 min nach Toxin-B-Applikation kam es zu einer Lückenbildung im Zellrasen. Diese Lücken bzw. Löcher schienen teilweise intra-, teilweise interzellulär zu liegen. Für Endothelzellen konnte bereits gezeigt werden, daß das eingangs erwähnte Tyrosinkinase-hemmende und damit in die Rho-Kaskade eingreifende Genistein die Verteilung von beta-Catenin dahingehend veränderte, daß es zu einer Lückenbildung zwischen Endothelzellen kam (Carbajal und Schaeffer, 1998). Da auch Toxin-B in den gleichen Regelkreis eingreift, scheinen hier Parallelen zu bestehen.

In der Immunfluoreszenz waren Unterbrechungen der Zellkontaktzonen zu erkennen, wobei die Verteilungen von alpha-, beta- und gamma-Catenin und VE-Cadherin keine Unterschiede zeigten. Diese Beobachtungen liefern eine Erklärung für die Beobachtung, daß die Permeabilität von Endothelzellen aus der Arteria pulmonalis des Schweins nach Toxin-B Zugabe deutlich anstieg (Hippenstiel et al., 1997). Es wurde dort gezeigt, daß diese Permeabilitätssteigerung nach Toxin-B-Zugabe durch die Stabilisierung des Aktinfilamentsystems mittels Phalloidin verhindert werden konnte. Bisher wurde eine Permeabilitätssteigerung von Endothel oder Epithel einem intakten, kontraktionsfähigen Aktinfilamentsystem zugeschrieben (Schnittler et al., 1990; Gerhard et al., 1998). Allerdings konnte in anderen Arbeiten gezeigt werden, daß eine Permeabilitätssteigerung, unabhängig vom Aktinfilamentsystem, auch von einer verstärkten Phosphorylierung von beta-Catenin und VE-Cadherin begleitet wird (Tinsley et al., 1999).

Sicher ist, daß die Blockade zumindest eines der Rho-Proteine direkt oder indirekt durch Veränderung der Zell-Zell-Kontaktprotein-Lokalisation für die Permeabilitätssteigerung des Endothels verantwortlich ist. Ob dieser Effekt direkt über die Rho-Protein-Blockade oder durch die mangelnde Stabilisierung der Zell-Zell-Kontakte durch das Fehlen des Aktinfilamentsystems der Zelle ausgelöst wurde, bleibt noch zu klären.

Auch für die Fokalkontakte wird angenommen, daß sie über eine Aktivierung der Rho-Proteine in ihrer Ausbildung gefördert werden. Das Vorhandensein von Fokalkontakten wiederum ermöglicht die Ausrichtung von Stressfasern in der Zelle.

Nachdem die Fokalkontakte nach Toxin-B-Zugabe deutlich kleiner erschienen, schreiben wir den Rho-Proteinen auch hier eine direkte oder indirekte Einflußnahme zu. Sowohl FAK, Paxillin als auch Vinculin waren nach 2.5 h Toxin-B Einwirkung kaum noch regelhaft verteilt. Für Fibroblasten konnte bereits belegt werden, daß sie Rho-Protein-vermittelt Fokalkontakte ausbilden bzw. stabilisieren (Nobes und Hall, 1995).

Auch für Endothelzellen scheinen hierfür diese Proteine essentiell zu sein. Nachdem der F-Aktinzusammenbruch und die Abnahme der Fokalkontakte zeitgleich geschahen, ist es schwer zu beurteilen, ob sich diese Effekte eventuell gegenseitig bedingen, oder ob sie unabhängig zu Stande kommen. Sicher ist allerdings auch hier, daß die Zell-Matrixkontakte von einem oder mehreren der Rho-Proteine regulieren.

7.3 Der C3-Toxin-Versuch

Um nun zwischen Effekten von RhoA und den anderen Rho-Proteinen unterscheiden zu können, wurde das RhoA-Protein durch C3-Toxin-Injektion selektiv blockiert und die Auswirkung beobachtet.

Die Morphologie der injizierten Zellen änderte sich bereits nach wenigen Minuten. Es entstanden anscheinend transzelluläre Löcher in wandernden und ruhenden Zellen, die meist in der Zellperipherie lokalisiert waren. Nach 2.5 h war das gesamte Zytoplasma wabig durchsetzt. Ob es sich nun um große Vesikel oder tatsächlich um transzelluläre Löcher handelte, ist nicht mit letzter Sicherheit zu sagen. Für die transzellulären Löcher spräche die Beobachtung, daß es in perfundierten C2-Toxin behandelten Hasenlungen zu einer deutlichen Permeabilitätserhöhung des Endothels kam. Der Effekt wurde hier auf den C2-Toxin vermittelten F-Aktin-Zusammenbruch zurückgeführt (Ermert et al., 1995).

In den Zellen wurde bereits nach 5 h ein eindrucksvoller F-Aktin-Zusammenbruch offensichtlich. Intrazellulär war kein filamentäres Aktin mehr nachzuweisen. Lediglich am Zellrand fand sich noch eine dünne F-Aktin-Linie.

Dieser Effekt von C3-Toxin in Endothelzellen wurde bereits beschrieben (Aepfelbacher et al., 1997). Die einleitend dargestellte Wirkung von RhoA auf die Aktinpolymerisation in Fibroblasten scheint also auch in Endothelzellen wichtig zu sein.

Die Zell-Zell-Kontakte in Zellen am Rand der Läsion und im Zellrasen blieben von C3-Toxin weitgehend unbeeinflusst. Dies galt sowohl für die Catenine als auch für VE-Cadherin. Die Kontaktzone zwischen den Zellen erschien jedoch schmaler und schärfer begrenzt. Für die Catenine liegen bisher keine vergleichbaren Arbeiten vor. Die gemachte Beobachtung deckt sich allerdings zumindest mit der für VE-Cadherin beschriebenen Unabhängigkeit von RhoA (Takaishi et al., 1997; Vouret-Craviari et al., 1999; Braga et al., 1999). Andererseits wurden nach C3-Toxin-Zugabe auch eine diffuse VE-Cadherin-Verteilung und ein Verlust von VE-Cadherin im Bereich der Zellkontakte, begleitet von einer Lückenbildung zwischen den Zellen, in humanen Endothelzellen beobachtet (Hordijk et al., 1999).

Für MDCK-Zellen wurde gezeigt, daß beta-Catenin und E-Cadherin nicht über RhoA und CDC42, wohl aber über Rac reguliert werden. Sollten sich Endothelzellen ähnlich verhalten, würde sich so der beschriebene Verlust der Zell-Zell-Kontakte unter Toxin-B (RhoA-, Rac- und CDC42-Blockade) und deren Bestehenbleiben unter C3-Toxin (selektive RhoA-Blockade) erklären. Eine Bildung von Löchern in den Zellen selbst ist unter C3-Toxin nämlich zwar durchaus zu sehen, allerdings keine Lückenbildung zwischen den einzelnen Zellen. Ob die bestehenbleibenden Zell-Zell-Kontakte allerdings ohne die Stabilisierung durch F-Aktin Scherstress widerstehen könnten, scheint unwahrscheinlich (Navarro et al., 1995).

Die Fokalkontakte, beispielhaft das Vinculin, waren in mit C3-Toxin-injizierten Zellen sehr stark vermindert. Zellen am Läsionsrand bildeten keine neuen Fokalkontakte aus und auch die bestehenden Fokalkontakte in ruhenden Zellen waren nach C3-Toxin-Injektion stark vermindert.

Bisher konnte an bovinen Endothelzellen eine verringerte Phosphorylierung der Fokalkontaktproteine FAK und Paxillin nach C3-Toxin-Zugabe nachgewiesen werden (Yano et al., 1996). Desweiteren wurde allgemein eine Verringerung der Stressfaser-assoziierten Fokalkontakte, insbesondere derer, die 2 bis 24 h nach Migrationsbeginn ausgebildet wurden, beschrieben (Aepfelbacher et al., 1997).

Die Effekte der Rho-Proteine auf Fokalkontakte sind bisher an Swiss-3T3-Fibroblasten genauer erforscht. Es ist beschrieben, daß CDC42 und Rac für die Neubildung von Fokalkomplexen zuständig sind und RhoA für deren Stabilisierung (Nobes und Hall, 1995). Die Aktivierung von Tyrosinkinasen und damit die Phosphorylierung der Fokalkontaktproteine wird als der entscheidende Mechanismus angenommen.

Vergleichbar scheint es sich in Endothelzellen zu verhalten. Die Blockade aller Rho-Proteine und die selektive Blockade von RhoA zeigten ähnliche Ergebnisse. In Endothelzellen scheint also RhoA der wesentliche Regulator der Fokalkontakte zu sein.

8. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der Rho-Proteine, insbesondere die von RhoA, in Endothelzellen zu beurteilen.

Die Endothelzellen erfüllen im Organismus eine Reihe wichtiger Aufgaben. Sie sind beispielsweise zur Migration fähig und können so Endotheldefekte verschließen oder im Rahmen der Angiogenese in nicht vaskularisiertes Gewebe einwandern.

Außerdem ist das Endothel einerseits für den Austausch von Stoffen und Zellen zwischen intravasalem und extravasalem Raum verantwortlich, andererseits besteht aber eine wesentliche Aufgabe in der Barrierenbildung zwischen diesen beiden Räumen, um vor allem unkontrollierten Flüssigkeitsaustritt aus den Gefäßen ins Interstitium zu verhindern.

Diese Aufgaben erfüllt das Endothel unter besonderer mechanischer Belastung, der es durch Druck und Strömung im Gefäßsystem ausgesetzt ist. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, verfügt das Endothel im wesentlichen über drei dynamische Funktionseinheiten:

- Ein intrazelluläres Gerüst, bestehend einerseits aus den sogenannten Stressfasern, welche die Zelle durchziehen und vornehmlich an Zell-Zell-Kontakten und Zell-Matrix-Kontakten anhaften und so der Zelle Stabilität geben, und andererseits aus kontraktile Aktin-Myosinbündeln, welche die Zelle befähigen, sich fortzubewegen oder ihre Form zu ändern, beispielsweise Ausläufer zu bilden.
- Zell-Zell-Kontakte, die es den Zellen ermöglichen, fest aneinander zu haften und sich so einerseits gegenseitig zu stützen und andererseits eine regulierbare Barriere zwischen intravasalem Raum und Interstitium zu bilden.
- Zell-Matrix-Kontakte, welche die Zelle fest mit dem Untergrund verankern und ein Unterspülen der Zelle verhindern.

Besonders während der Migration der Endothelzelle unterliegen diese Systeme ständigem Auf- und Abbau.

In verschiedenen Arbeiten konnte bisher gezeigt werden, daß diese Funktionseinheiten im wesentlichen durch eine Gruppe von kleinen GTP-bindenden und GTP-spaltenden Proteinen, den sogenannten Rho-Proteinen reguliert werden. Man unterscheidet drei wichtige Vertreter dieser Gruppe: Rac, CDC42 und RhoA.

Nachdem die Funktion dieser Proteine in Fibroblasten bereits klar belegt ist, war die Frage zu klären, welche Rolle diese Proteine in Endothelzellen spielen.

Hierfür wurden zwei experimentelle Ansätze gewählt.

In einem ersten Versuchsschema wurde die Prenylierung von Proteinen und damit auch die Prenylierung von Rho-Proteinen durch den HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Lovastatin unterdrückt. Es war für Fibroblasten gezeigt worden, daß vor allem die Rho-Proteine Rac und RhoA dieser Geranyl-Prenylierung an ihrem C-Terminus bedürfen, um sich mit diesem lipophilen Anteil in der Plasmamembran zu verankern und aktiv zu werden.

In einer zweiten Versuchsserie wurden alle Rho-Proteine unselektiv durch Toxin-B, einem Toxin aus *Clostridium difficile*, und anschließend selektiv RhoA durch C3-Toxin aus *Clostridium botulinum* inaktiviert.

Es wurden die Effekte auf Primärkulturen von Endothelzellen aus dem Truncus pulmonalis des Schweins, besonders im Hinblick auf Migration, Stressfasersystem, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte, mit Hilfe immunocytochemischer Methoden beobachtet.

Endothelzellen, die in eine gesetzte Läsion einwanderten, zeigten sowohl unter Prenylierungs (Geranylierungs)-Hemmung als auch unter selektiver und nicht selektiver Blockierung der Rho-Proteine deutliche morphologische Änderungen. Sie arborisierten, d.h. sie konnten keine normalen Ausläufer bilden und sie waren nicht in der Lage, die gesetzte Läsion zu überbrücken oder zu verschließen. Daraus wurde auf eine der Funktion in Fibroblasten vergleichbare Funktion der Rho-Proteine in Endothelzellen geschlossen. Es konnte gezeigt werden, daß die Rho-Proteine wesentlich für die Bildung von Zellausläufern, wie zum Beispiel Lamellopodien, und die Migration in Endothelzellen sind.

Zudem konnte belegt werden, daß Aufbau und Aufrechterhaltung des Aktinfilamentsystems und des kontraktiven Apparates der Endothelzellen im Wesentlichen über das geranylierte RhoA reguliert werden, da bei Inaktivierung desselben kaum noch filamentäres Aktin nachgewiesen werden konnte. Die Effekte der unselektiven Rho-Protein-Hemmung unterschieden sich hier kaum von denen der selektiven RhoA-Hemmung. Auch die Unterdrückung der Geranyl-Prenylierung zeigte vergleichbare Ergebnisse.

Die Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte ist allerdings RhoA-unabhängig, da es trotz selektiver RhoA-Hemmung durch C3-Toxin nicht zur Auflösung der Zell-Zell-Kontakte kam. Diese werden vielmehr über Rac und/oder CDC42 gesteuert, denn erst durch die Blockierung aller Rho-Proteine durch Toxin-B kam es zur Lückenbildung zwischen den Zellen. Auch hier spielt die Geranylierung der Rho-Proteine eine wichtige Rolle, da die

Geranylierungshemmung ähnliche Effekte wie die Hemmung durch Toxin-B zeigte. Inwieweit allerdings die nach der selektiven RhoA-Blockade bestehenden Zell-Zell-Kontakte, welche nun nicht mehr über Aktinfilamentbündel stabilisiert sind, mechanischen Belastungen widerstehen können, muß noch geprüft werden.

Die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Fokalkontakte erfolgt im wesentlichen auch über die geranylierten Rho-Proteine, wobei RhoA hier die entscheidende Rolle zuzukommen scheint. Zwar war unter Lovastatin eine Verringerung der Zell-Matrix-Kontakte zu beobachten, durch die generalisierte Hemmung aller Rho-Proteine und selbst unter der selektiven RhoA-Hemmung war dieser Effekt jedoch bei weitem stärker ausgeprägt.

Somit konnte in dieser Arbeit die entscheidende Rolle der Rho-Proteine und im speziellen die des RhoA-Proteins bei der Regulation wesentlicher Funktionseinheiten der Endothelzelle aufgezeigt werden.

9. Literaturverzeichnis

- Aberle H, Schwartz H, Hoschuetzky H, Kemler R
 "Single amino acid substitutions in proteins of the armadillo gene family abolish their binding to alpha-catenin"
 J Biol Chem 1996; 271:1520-6
- Aepfelbacher M, Essler M, Huber E, Sugai M, Weber PC
 „Bacterial toxins block endothelial wound repair. Evidence that Rho GTPases control cytoskeletal rearrangements in migrating endothelial cells“
 Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17:1623-9
- Allen WE, Jones GE, Pollard JW, Ridley AJ
 "Rho, Rac and CDC42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages"
 J Cell Sci 1997;110:707-20
- Amano M, Mukai H, Ono Y, Chihara K, Matsui T, Hamajima Y, Okawa K, Iwamatsu A
 „Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase protein N“
 Science 1996; 271:648-50
- Anderson JM, Balda MS, Fanning AS
 "The structure and regulation of tight junctions"
 Curr Opin Cell Biol 1993; 5:772-8
- Arkenau C
 „Expression und Synthese verschiedener Konstrukte des Zytoskelettproteins "VASP" durch Mikroinjektion von cDNA-Plasmiden in Gefäßendothelzellen“
 Dissertationsschrift an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg 2000
- Aullo P, Giry M, Olsnes S, Popoff MR, Kocks C, Boquet P
 „A chimeric toxin to study the role of the 21 kD GTP binding protein rho in the control of actin microfilament assembly“
 EMBO J 1993; 12:921-31
- Aunis D, Bader M-F
 "The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells"
 J Exp Biol 1988; 139:253-66
- Barry ST, Critchley DR
 "The RhoA-dependent assembly of focal adhesions in Swiss 3T3 cells is associated with increased tyrosine phosphorylation and the recruitment of both pp125FAK and a protein kinase C-delta to focal adhesions"
 J Cell Sci 1994; 107:2033-45
- Barth AI, Nathke IS, Nelson WJ
 "Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways"
 Curr Opin Cell Biol 1997; 9:683-90
- Bendori R, Salomon D, Geiger B
 "Identification of two distinct functional domains on vinculin involved in its association with focal contacts"
 J Cell Biol 1989; 108:2383-93
- Benninghoff Anatomie, Band I, 15. Aufl., Urban & Schwarzenberg
 Drenckhahn D, Zenker W
- Bixby JL, Zhang R
 "Purified N-cadherin is a potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth"
 J Cell Biol 1990; 110:1253-60
- Briehner WM, Yap AS, Gumbiner BM
 "Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-Cadherin"
 J Cell Biol 1996; 135:487-96
- Braga VM, Del Maschio A, Machesky L, Dejana E
 „Regulation of cadherin function by Rho and Rac: modulation by junction maturation and cellular context.“
 Mol Biol Cell 1999; 10:9-22
- Butz S, Kemler R
 "Distinct cadherin-catenin complexes in Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion"
 FEBS Lett 1994; 355:195-200
- Carbajal JM, Schaeffer RC Jr
 „H₂O₂ and genistein differentially modulate protein tyrosine phosphorylation, endothelial morphology, and monolayer barrier function.“

Biochem Biophys Res Commun 1998; 249:461-6

Chaponnier C, Janmey PA, Yin HL
„The actin filament-severing domain of plasma gelsolin“
J Cell Biol 1986; 103:1473-81

Chardin P, Boquet P, Madaule P, Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM
„The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by Clostridium botulinum exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells“
EMBO 1989; 8:1087-92

Chong L, Traynor-Kaplan A, Bokoch GM, Schwartz MA
„The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells“
Cell 1994; 79:507-13

Clark EA, King WG, Brugge JS, Symons M, Hynes RO
"Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases"
J Cell Biol 1998;142:573-86

Clarke S, Vogel JP, Deschenes RJ, Stock J
"Posttranslational modification of the Ha-ras oncogene proteine: evidence for a third class of proteine carboxyl methyltransferases"
Proc. Natl.Acad. Sci. USA 1988; 85:4643-7

Contamin S, Galmiche A, Doye A, Flatau G, Benmerah A, Boquet P
„The p21 rho-activating toxin cytotoxic necrotizing factor 1 is endocytosed by a clathrin-independent mechanism and enters the cytosol by an acidic-dependent membrane translocation step“
Mol Biol Cell 2000; 11:1775-1787

Cowin P, Burke B
"Cytoskeleton-membrane interactions"
Curr Opin Cell Biol 1996; 8:56-65

Cursiefen C
„Untersuchungen zur Substrathaftung von Gefäßendothelzellen unter Flüssigkeitsscherstress und ATP-Verarmung“ Dissertationsschrift 1996

Dartsch PC, Betz E
"Response of cultured endothelial cells to mechanical stimulation"
Basic Res Cardiol 1989; 84:268-81

Dartsch PC, Hämmerle H
"Orientation response of arterial smooth muscle cells to mechanical stimulation"
Eur J Cell Biol 1986; 41:339-46

Davies PF
"Flow mediated endothelial mechanotransduction"
Physiological Review 1995; 75: 519-60

Dejana E, Corada M, Lampugnani MG
"Endothelial cell to cell junctions"
FASEB J 1995; 9:910-8

Delaunay J
"Genetic disorders of the red cell membranes"
FEBS Let 1995; 369:34-7

Desrosiers RR, Gauthier F, Lanthier J, Beliveau R
„Modulation of Rho and cytoskeletal protein attachment to membranes by a prenylcysteine analog“
J Biol Chem 2000; 275:14949-57

Drenckhahn D
"Cell motility and cytoplasmic filaments in vascular endothelium"
Prog Appl Microcirc 1983; 1:53-70

Drenckhahn D, Gröschel-Stewart U, Kendrick-Jones J, Scholey JM
"Vascular endothelial stress fibres: their potential role in protecting the vessel wall from rheological damage"
Klin Wochenschr 1986; 64:986-8

Drenckhahn D, Jöns T, Püschel B, Schmitz F
"Role of cytoskeleton in the development of epithelial polarity"
The Cytoskeleton. Hesketh JE, Pryme IF, eds. London: Jai Press Inc 1996; 141-65

Drenckhahn D, Ness W

- "The endothelial contractile cytoskeleton"
 Vascular Endothelium: Physiology, Pathology, and Therapeutic Opportunities
 New Horizon Series (Schattauer Stuttgart) 1997; 3:1-25
- Drenckhahn D, Wagner HJ
 "Stress fibres in the splenic sinus endothelium in situ: Molecular structure, relationship to the extracellular matrix, contractility"
 J Cell Biol 1986; 102:1738-47
- Ermert L, Bruckner H, Walmrath D, Grimminger F, Aktories K, Suttorp N, Duncker HR, Seeger W
 „Role of endothelial cytoskeleton in high-permeability edema due to botulinum C2 toxin in perfused rabbit lungs“
 Am J Physiol 1995; 268:753-61
- Essig M, Vrtovsniak F, Nguyen G, Sraer JD, Friedlander G
 "Lovastatin modulates in vivo and in vitro the plasminogen activator/plasmin system of rat proximal tubular cells: role of geranylgeranylation and Rho Proteins"
 J. Am. Soc. Nephrol. 1998; 9:1377-88
- Feng J, Ito M, Ichikawa K, Isaka N, Nishikawa M, Hartshorne DJ, Nakano T
 „Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase“
 J Biol Chem 1999; 274:37385-90
- Fenton RG, Hsiang-fu Kung, Dan L Longo, Smith MR
 "regulation of intracellular actin polymerization by prenylated cellular proteins"
 The Journal of Cell Biology 1992; 117:347-56
- Flinn HM, Ridley AJ
 "Rho stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, p130 and paxillin"
 J Cell Sci 1996; 109:1133-41
- Franke WW, Goldschmidt MD, Zimbelmann R, Mueller HM, Schiller DL, Cowin P
 "Molecular cloning and amino acid sequence of human plakoglobin, the common junctional plaque protein"
 Proc Natl Acad Sci 1989; 86:4027-31
- Fukata M, Nakagawa M, Kuroda S, Kaibuchi K
 „Cell adhesion and Rho small GTPases.“
 J Cell Sci 1999; 112:4491-500
- Gabbiani G, Badonnel M-C, Rona
 "Cytoplasmic contractile apparatus in aortic endothelial cells of hypertensive rats"
 Lab Invest 1975; 32:227-43
- Gabbiani G, Elemer G, Guelpa C, Vallotton MB, Badonnel M-C, Huttner I
 "Morphologic and functional changes in aortic intima during experimental hypertension"
 Am J Pathol 1979; 96:399-422
- Garcia JGN, Schaphorst KL
 "Regulation of endothelial cell gap formation and paracellular permeability"
 J. Investig. Med. 1995; 43:117-26
- Garcia LJ, Rosado JA, Gonzalez A, Jensen RT
 "Cholecystokinin-stimulated tyrosine phosphorylation of p125FAK and paxillin is mediated by phospholipase C-dependent and -independent mechanisms and requires the integrity of the actin cytoskeleton and participation of p21rho"
 Biochem J 1997; 327:461-72
- Geiger B, Tokuyasu KT, Dutton AH, Singer SJ
 "Vinculin, an intracellular protein localized at specialized sites where microfilament bundles terminate at cell membranes"
 Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77:4127-31
- Gilmore AP, Burridge K
 "Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate"
 Nature 1996; 386:531-5
- Gingras D, Lamy S, Beliveau R
 „Tyrosine phosphorylation of the vascular-endothelial-growth-factor-receptor 2 (VEGFR-2) is modulated by rho proteins.“
 Biochem J 2000; 2:273-80
- Goldschmidt-Clermont PJ, Furman MI, Wachsstock D, Safer D, Nachmias VT, Pollard TD
 „The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymeration in cells“
 Mol Biol Cell 1992; 3:1015-24

- Gotlieb AI, Langille BL, Wong MKK, Kim DW
 "Biology of disease. Structure and function of the endothelial cytoskeleton."
 Lab Invest 1991; 65:123-37
- Gottlieb TA, Ivanov IE, Adesnik M, Sabatini DD
 "Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells"
 J Cell Biol 1993; 120:695-710
- Gulino D, Delachanal E, Concord E, Genoux Y, Morand B, Valiron MO, Sulpice E, Scaife R, Alemany M, Vernet T
 "Alteration of endothelial cell monolayer integrity triggers resynthesis of vascular endothelium cadherin"
 J Biol Chem 1998; 273:29786-93
- Gutierrez L, Magee AI, Marshal CJ, Hancock JF
 "Posttranslational processing of p21^{ras} is two-step and involves carboxymethylation and carboxy-terminal proteolysis"
 Eur. Mol. Organ. J. 1989; 8:1093-8
- Hall A (a)
 „GTPases and the cytoskeleton“
 Annu Rev Cell Biol 1994; 10:30-54
- Hall A (b)
 „Signal transduction through small GTPases-a tale of two GAPs“
 Annu Rev Cell Biol 1994; 10:31-54
- Hansson A, Skoglund G, Lassing I, Lindberg U, Ingelman-Sundberg M
 „Protein kinase C-dependent phosphorylation of profilin is specifically stimulated by phosphatidylinositol biphosphate (PIP2)“
 Biochem Bioohys Res Commun 1988; 159:526-31
- Hippenstiel S, Tannert-Otto S, Vollrath N, Krull M, Just I, Aktories K, von Eichel-Streiber C, Suttrop N
 „Glucosylation of small GTP-binding Rho proteins disrupts endothelial barrier function“
 Am J Physiol 1997; 272:38-43
- Gerhard R, Schmidt G, Hofmann F, Aktories K
 „Activation of Rho-GTPases by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 increases intestinal permeability in Caco-2 cells.“
 Infect Immun 1998; 66:5125-31
- Glenney JR Jr, Zokas L
 "Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton"
 J Cell Biol 1989; 108:2401-8
- Hofmann F, Busch C, Prepens U, Just I, Aktories K
 „Localization of the glucosyltransferase activity of Clostridium difficile Toxin-B to the N-terminal part of the holotoxin“
 J Biol Chem 1997; 272:11074-8
- Hordijk PL, Anthony E, Mul FPJ, Rientsma R, Oomen LCJM, Roos D
 "Vascular-endothelial-cadherin modulates endothelial monolayer permeability"
 J Cell Sci 1999; 112:1915-23
- Huber AH, Nelson WJ, Weis WI
 "Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin"
 Cell 1997; 90:871-82
- Iba T, Scumpio BE
 "Morphology of human endothelial cells subjected to cyclic strain in vitro"
 Microvasc Res 1991; 42:245-54
- Ives CL, Eskin SG, McIntire LV
 "Mechanical effects on endothelial cell morphology: an in vitro assessment"
 In Vitro Cell Dev Biol 1986; 22:500-7
- Janmey PA, Stossel TP
 „Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol-4,5-phosphate“
 Nature 1987; 325:362-4
- Jantsch-Plunger V, Gonczy P, Romano A, Schnabel H, Hamill D, Schnabel R, Hymann AA, Glotzer M
 „Cyk-4. A rho family gtpase activating protein (gap) required for central spindle formation and cytokinesis.“
 J Cell Biol 2000; 149:1391-1404

- Jou TS, Stewart DB, Stappert J, Nelson WJ, Marris JA
"Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin-catenin complex"
Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:5067-71
- Just I, Fritz G, Aktories K, Giry M, Popoff MR, Boquet P, Hegenbarth S, von Eichel-Streiber C
„Clostridium difficile toxin B acts on the GTP-binding protein Rho.“
J Biol Chem 1994; 269:10706-12
- Just I (a), Selzer J, von Eichel-Streiber C, Aktories K
"The low molecular mass GTP-binding protein Rho is affected by toxin A from Clostridium difficile"
J Clin Invest 1995; 3:1026-31
- Just I (b), Wilm M, Selzer J, Rex G, von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K
"The Enterotoxin from Clostridium difficile (TOX A) monoglucosylates the Rho proteins"
J Biol Chem 1995; 23:13932-6
- Just I (c), Selzer J, Wilm M, von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K
„Glycosylation of rho proteins by Clostridium difficile Toxin-B“
Nature 1995; 375:500-3
- Kanamori T, Hayakawa T, Suzuki M, Titani K
„Identification of two 17-kDa rat parotid gland phosphoproteins, subjects for dephosphorylation upon beta.adrenergic stimulation, as destrin- and cofilin-like proteins“
J Biol Chem 1995; 270:8061-7
- Kandabashi T, Shimokawa H, Miyata K, Kunihiro I, Kawano Y, Fukata Y, Higo T, Egashira K, Takahashi S, Kaibuchi K, Takeshita A
„Inhibition of myosin phosphatase by upregulated rho-kinase plays a key role for coronary artery spasm in a porcine model with interleukin-1beta“
Circulation 2000; 101:1319-23
- Kemler R
"From Cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion"
Trends Genet 1993; 9:317-21
- Kim DW, Gotlieb AI, Langille BL
"In vivo modulation of endothelial F-actin by experimental alterations in shear stress"
Arteriosclerosis 1989; 9:439-45
- Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K
„Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)“
Science 1996; 273:245-8
- Kobayashi N, Sakai T
"Heterogeneity in the distribution of aktin filaments in the endothelial cells of arteries and arteriols in the rat kidney"
Eur J Cell Biol 1993; 60:57-66
- Koch G, Benz C, Schmidt G, Olenik C, Aktories K
"Role of Rho protein in lovastatin-induced breakdown of actin cytoskeleton"
J Pharmacol Exp Ther 1997; 283: 901-9
- Kotani H, Takaishi H, Sasaki T, Takai y
„Rho regulates association of both the ERM family and vinculin with the plasma membrane in MDCK cells“
Oncogene 1997; 14:1705-13
- Knudsen KA, Soler AP, Johnson KR, Wheelock MJ
"Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin"
J Cell Biol 1995; 130:67-77
- Knudsen KA, Wheelock MJ
"Plakoglobin, or an 83-kD homologue distinct from beta-catenin, interacts with E-Cadherin and N-Cadherin"
J Cell Biol 1992; 118:671-9
- Kreft B, Berndorff B, Bottinger A, Finnemann FS, Wedlich D, Hortsch M, Tauber R, Gebner R
"Cadherin mediated cell-cell adhesion does not require cytoplasmic interactions"
J Cell Biol 1997; 136:1109-21
- Kwiatkowski DJ, Janmey PA, Mole JE, Yin HL
„Isolation and properties of two actin-binding domains in gelsolin“
J Biol Chem 1985; 260:15232-8

- Lassing I, Lindberg U
„Evidence that the phosphatidylinositol cycle is linked to cell motility“
Exp Cell Res 1988; 174:1-15
- Laufs U, Endres M, Liao JK
„Regulation der endothelialen NO-Produktion durch Rho-GTPasen“
Med Klein 1999; 94:211-18
- Lee T-Y J, Rosenthal A, Gotlieb AI
"Transition of aortic endothelial cells from resting to migrating cells is associated with three sequential patterns of microfilament organisation"
J Vasc Res 1996; 33:13-24
- Luna EJ, Hitt AL
"Cytoskeleton-plasma membrane interactions"
Science 1992; 258:955-63
- Madaule P, Axel R
„A novel ras-related gene family“
Cell 1985; 41:31-40
- Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S
„Signalling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM.kinase“
Science 1999; 285:895-8
- Miura Y, Yatomi Y, Rile G, Ohmori T, Satho K, Ozaki Y
„Rho-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase and myosin light chain in human endothelial cells stimulated with sphingosine-1-phosphate, a bioactive lysophospholipid released from activated platelets“
J Biochem 2000; 127:909-14
- Morgan TE, Lockerbie RO, Minamide LS, Browning MD, Bamburg JR
„Isolation and characterization of a regulated form of actin depolymerizing factor“
J Cell Biol 1993; 122:623-33
- Morita T, Kurihara H, Maemura K, Yoshizumi M, Yazaki J
"Disruption of cytoskeletal structures mediates shear stress-induced endothelin-1 gene expression in cultured porcine aortic endothelial cells"
J Clin Invest 1993; 92:1706-12
- Muallem S, Kwiatkowska K, Xu X, Yin HL
"Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells"
J Cell Biol 1995; 128:589-98
- Navarro P, Caveda L, Breviaro F, Mandoteanu I, Lampugnani MG, Delana E
"Catenin-dependent and -independent functions of vascular endothelial cadherin"
J Biol Chem 1995; 270:30965-72
- van Nieuw Amerongen GP, Draijer R, Vermeer MA, van Hinsbergh VWM
„Transient and prolonged increase in endothelial permeability induced by histamine and thrombin“
Circ Res 1998; 83:1115-23
- Nobes CD, Hall A
"Rho, Rac and CDC 42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia and filopodia"
Cell 1995; 81:53-62
- Nobes CD, Hall A
"Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement"
J Cell Biol 1999; 144:1235-44
- Nusrat A, Giry M, Turner JR, Colgan SP, Parkos CA, Carnes D, Lemichez E, Boquet P, Madara JL
„Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia“
Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:10629-33
- Okabe S, Hirokawa N
„Incorporation and turnover of biotin-labelled actin microinjected into fibroblastic cells: an immunoelectron microscope study“
J Cell Biol 1989; 109:1581-95
- Ozawa M, Terada H, Pedraza C
"The fourth armadillo repeat of plakoglobin (gamma-catenin) is required for its high affinity binding to the cytoplasmic domains of E-Cadherin and desmosomal cadherin Dsg2, and the tumor suppressor APC protein"
J Biochem (Tokyo) 1995; 118:1077-82

- Paterson HF, Self AJ, Garrett MD, Just I, Aktories K, Hall A
"Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology"
J. Cell. Biol. 1990; 111:1001-7
- von Pawel-Rammingen U, Telepnev MV, Schmidt G, Aktories K, Wolf-Watz H, Rosqvist R
„GAP activity of the yersinia YopE cytotoxin specifically targets the rho pathway: a mechanism for disruption of actin micrifiament structure“
Mol Microbiol 2000; 36:737-48
- Rankin S, Morii N, Narumiya S, Rozengurt E
"Botulinum C3 exoenzyme blocks the tyrosine phosphorylation of p125FAK and paxillin induced by bombesin and endothelin"
FEBS Lett 1994; 354:315-9
- Ratcliffe MJ, Smales C, Staddon JM
"Dephosphorylation of the catenins p120 and p100 in endothelial cells in response to inflammatory stimuli"
Biochem J 1999; 338:471-8
- Ridley A and Hall A
„The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors.“
Cell 1992; 70:389-99
- Rodriguez-Boulan E, Nelson WJ
"Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype"
Science 1989; 245:718-25
- Romer LH, McLean N, Turner CE, Burr ridge K
„Tyrosine kinase activity, cytoskeletal organisation, and motility in human vascular endothelial cells.“
Mol Biol Cell 1994; 5:349-61
- Rottner K, Hall A, Small JV,
„Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics“
Curr Biol 1999; 9:640-8
- Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, van der Kammen RA, Collard JG
„Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior“
J Cell Biol 1999; 147:1009-22
- Sacco PA, McGranahan TM, Wheelock MJ, Johnson KR
"Identification of plakoglobin domains required for association with N-cadherin and alpha-Catenin"
J Biol Chem 1995; 270:20201-6
- Sato M, Levesque MJ, Nerem RM, Ohshima N
"Mechanical properties of cultured endothelial cells exposed to shear stress"
Front Med Biol Eng 1990; 2:171-5
- Schaller MD, Borgmann CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, Parsons JT
"pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions"
Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:5192-6
- Schaller MD, Parsons JT
"Focal adhesion kinase and associated proteins"
Curr Opin Cell Biol 1994; 6:705-10
- Schnittler H-J, Franke RP, Drenckhahn D
„Role of the endothelial actin filament cytoskeleton in rheology and permeability.“
Z Kardiol. 1989; 6:1-4
- Schnittler H-J, Püschel B, Drenckhahn D
"Role of cadherins and plakoglobin in interendothelial adhesion under resting conditions and shear stress"
Am Physiol Soc 1997; H2396
- Schnittler H-J, Wilke A, Gress T, Suttorp N, Drenckhahn D
"Role of the actin and myosin in the control of the paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium"
J Physiol 1990; 431:379-401
- Seckl MJ, Morii N, Narumiya S, Rozengurt E
"Guanosine 5'-3-O(thio)triphosphate stimulates tyrosine phosphorylation of p125FAK and paxillin in permeabilized Swiss 3T3 cells. Role of p21 rho"
J Biol Chem 1995; 270:6984-90

- Seufferlein T, Rozengurt E
„Lysophosphatidic acid stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, and p130. Signaling pathways and cross-talk with platelet-derived growth factor“
J Biol Chem 1994; 269:9345-51
- Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grubel G, Legrand F, Als-Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA
"Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins"
Nature 1995; 374:327-37
- Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Miyazawa K, Kitamura N, Johnson KR, Wheelock MJ, Matsuyoshi N, Takeici M
"Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes"
J Cell Biol 1995; 128:949-57
- Shirinsky VP, Antonow AS, Birukow KG, Sobolevsky AV, Romanov YA, Kabaeva NV, Antonova GN, Smirnov VN
"Mechano-chemical control of human endothelium orientation and size"
J Cell Biol 1989; 109:331-9
- Stolz DB, Jacobson BS
"Examination of transcellular membrane protein of bovine aortic endothelial cells in vitro using the cationic colloidal silica microbead membrane-isolation procedure"
J Cell Sci 1992; 103:39-51
- Strauss BI, Langille BL, Gotlieb AI
„In situ localisation of F-actin microfilaments in the vasculature of the porcine retina"
Exp Eye Res 1987; 45:533-544
- Sugimoto K, Fujii S, Yamashita K
"Expression of stress fibres in bullfrog mesothelial cells in response to tension"
Exp Cell Res 1991; 196:353-61
- Symons MH, Mitchison TJ
„Controle of actin polymerization in live and permeabilized fibroblasts“
J Cell Biol 1991; 114:503-13
- Takai Y
„Regulators of small GTPases“
Ciba Found Symp 1993; 176:128-46
- Takaishi K, Sasaki T, Kotani H, Nishioka H, Takai Y
"Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells"
J cell Biol 1997; 139:1047-59
- Tinsley JH, Wu MH, Ma W, Taulmann AC, Yuan SY
„Activated neutrophils induce hyperpermeability and phosphorylation of adherens junction proteins in coronary venular endothelial cells.“
J Biol Chem 1999; 274:24930-4
- Turner CE
"Paxillin is a major phosphotyrosine-containing protein during embryonic development"
J Cell Biol 1991; 115:201-7
- Turner CE, Glenney JR Jr, Burridge K
"Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions"
J Cell Biol 1990; 111:1059-68
- Turner EC, Miller JT
"Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain binding motifs and multiple LIM domains: identification of a vinculin and pp125Fak-binding region"
J Cell Sci 1994; 107:1583-91
- Uchida S, Watanabe G, Shimada Y, Maeda M, Kawabe A, Mori A, Arai S, Uehata M, Kishimoto T, Oikawa T, Imamura M
„The suppression of small GTP-ase rho signal transduction pathway inhibits angiogenesis in vitro and in vivo“
Biochem Biophys Res Commun 2000; 269:633-40
- Vandekerkhove J
„Aktin binding proteins“
Curr Opin Cell Biol 1990; 2:41-50
- Varnum Finney B, Reichart LF
"Vinculin-deficient OC12 cell lines extend unstable lamellopodia and filopodia and have a reduced rate of

- neurite outgrowth"
J Cell Biol 1994; 127:1071-84
- Vestal DJ, Ranscht B
"Glycosyl phosphatidylinositol-anchored T-cadherin mediates calcium-dependant, homophilic cell adhesion"
J Cell Biol 1992; 119:451-61
- Vincent S, Settleman J
„Inhibition of RhoGAP activity is sufficient for the induction of Rho-mediated actin reorganization“
Eur J Cell Biol 1999; 78:539-48
- Vouret-Craviari V, Grall D, Flatau G, Pouyssegur J, Boquet P, Van Obberghen-Schilling E
"Effects of cytotoxic necrotizing factor 1 and lethal toxin on actin cytoskeleton and VE-cadherin localization in human endothelial cell monolayers"
Infect Immun 1999; 67:3002-8
- Wang F, Nobes CD, Hall A, Spiegel S
"Sphingosine 1-phosphate stimulates rho-mediated tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin in Swiss 3T3 fibroblasts"
Biochem J 1997; 324:481-8
- Wang N, Butler JP, Ingber DE
"Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton"
Science 1993; 260:1124-7
- Walpole PL, Gotlieb AJ, Langille BL
"Monocyte adhesion and changes in endothelial cell number, morphology, and F-actin distribution elicited by low shear stress in vivo"
Am J Pathol 1993; 142: 1392-1400
- Watanabe G, Saito Y, Madaule P, Ishizaki T, Fujisawa K, Morii N, Mukai H, Ono Y, Kakizuka A, Narumiya S
„Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein rophillin as targets of small GTPase Rho.“
Science 1996; 271:645-8
- Wheelock MJ, Buck CA, Bechtol KB, Damsky CH
"Soluble 80-kd fragment of cell CAM 120/80 disrupts cell-cell adhesion"
J Cell Biochem 1987; 34:187-202
- White GE, Gimbrone MA, Fujiwara K
"Factors influencing the expression of stress fibres in vascular endothelial cells in situ"
J Cell Biol 1983; 97:416-24
- Wong AJ, Pollard TD, Herman IM
"Actin filament stress fibers in vascular endothelial cells in vivo"
Science 1983; 219:867-9
- Wong MKK, Gotlieb AI
"Endothelial cell monolayer integrity. Characterization of dense peripheral band of microfilaments"
Arteriosclerosis 1986; 6:212-9
- Wood CK, Turner CE, Jackson P, Critchey DR
"Characterization of the paxillin-binding site and the C-terminal focal adhesion targeting sequence in vinculin"
J Cell Sci 1994; 107:709-17
- Wysolmersky RB, Lagunoff D
"Inhibition endothelial cell retraction by ATP depletion"
Am J Pathol 1988; 132:28-37
- Yamakawa T, Tanaka S, Numaguchi K, Motley ED, Ichihara S, Inagami T
„Involvement of Rho-kinase in angiotensin II-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells“
Hypertension 2000; 35:313-8
- Yamamoto M, Marui N, Sakai T, Morii N, Kozaki S, Ikai K, Imamura S, Narumiya S
„ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle“
Oncogene 1993; 8:1449-55
- Yamamoto M, Morii N, Ikai K, Imamura S
"Effect of botulinum C3 exoenzyme on cell growth and cytoskeleton organization in transformed human epidermal cells in culture: a possible role for rho protein in epidermal cells"
J Dermatol Sci 1994; 8:103-9
- Yano Y, Saito Y, Narumiya S, Sumpio BE
"Involvement of rho p21 in cyclic strain-induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase

(pp125FAK), morphological changes and migration of endothelial cells"
Biochem Biophys Res Commun 1996; 224:508-15

Yap AS, Briehner WM, Pruschy M, Gumbiner BM
"Lateral clustering of adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function"
Curr Biol 1997; 7:308-15

Yoshida Y, Kawata M, Katayama , Horiuchi H, Kita Y, Takai Y
"A geranylgeranyltransferase for rhoA p21 distinct from the farnesyltransferase for ras p21S"
Biochem Biophys Research Commun 1991; 175:720-8

Yuan Y, Meng FY, Huang Q, Hawker J, Wu HM
"Tyrosine phosphorylation of paxillin/pp125FAK and microvascular endothelial barrier function"
Am J Physiol 1998; 275:84-93

Zhang B, Zhang Y, Wang ZX, Zheng Y
„The role of Mg²⁺ cofactor in the guanine nucleotide exchange and GTP-hydrolysis reactions of Rho family GTP-binding proteins“
J Biol Chem 2000; p S0021-9258

Zigmond SH
"Signal transduction and filament organization"
Current Opinion in Cell Biology 1996; 8:66-73

Zondag GC, Evers EE, ten Klooster JP, Janssen L, van der Kammen RA, Collard JG
„Oncogenic Ras downregulates Rac activity, which leads to increased Rho activity and epithelial-mesenchymal transition“
J Cell Biol 2000; 149:775-82

11. Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mir bei der Planung und der Durchführung der Versuche mit Rat und Tat zur Seite standen.

Besonders Gaby und Heike, die in unendlicher Geduld Fragen beantworteten, in Techniken einwiesen und mir den ein oder anderen großen Gefallen taten.

Besonderen Dank verdient Winni, über den ich nicht mehr sagen möchte, als daß man sich beileibe keinen besseren Betreuer wünschen kann.

Auch bei Cord, dem ich die Einführung in die Mikroinjektionstechnik verdanke und bei Micha, der mich bei dem ein oder anderen Computerproblem unterstützte, möchte ich mich auf diesem Wege bedanken.

Nicht zuletzt zolle ich Prof. Drenckhahn meinen aufrechten Dank dafür, daß er immer, tatsächlich immer, ein offenes Ohr für seinen Doktoranden hatte und durch seine Planung und seinen Rat diese Promotionsarbeit erst ermöglicht hat.

10. Curriculum vitae

Name, Vorname: Daigeler, Adrien

Geburtsdatum: 01.05.1974

Geburtsort: Würzburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

1980-1984 Grundschule Würzburg und Gollhofen

1984-1993 Gymnasium, Christian-von-Bomhard-Schule, Uffenheim

08.1993 Allgemeine Hochschulreife

03.1994 Beginn des Medizinstudiums an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg

16.09.96 Ärztliche Vorprüfung

28.08.97 1. Staatsexamen

06.1998 Amerikanisches Staatsexamen USMLE Step 1

10.04.00 2. Staatsexamen

28.06.00 Amerikanisches Staatsexamen USMLE Step 2

10.05.01 3. Staatsexamen

Praktisches Jahr:

1. Terial in der Abteilung für Anästhesie der Universitätsklinik Würzburg
2. Terial in der Abteilung für Chirurgie der Universitätsklinik Würzburg
3. Terial in der Inneren Abteilung des Kantonsspitals Winterthur/Schweiz