

**Funktionelle Charakterisierung des Vasodilatator stimulierten Phosphoproteins  
(VASP) für die Stabilität des Aktin-Zytoskeletts und die  
Integrin-abhängige Zelladhäsion**

Dissertation zur Erlangung  
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Annette Bettina Galler**

aus

Münster

Würzburg 2003

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender: .....

Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Walter

Gutachter: Prof. Dr. Ricardo Benavente

Betreuer: Dr. Matthias Reinhard

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

**Erklärung** gemäß § 4 Abs. 3 der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich habe bisher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

## Publikationen

Gisselmann G., **Galler A.**, Friedrich F., Hatt H, Bormann J. (2002). Cloning and functional characterization of two glycine receptor alpha-subunits from the perch retina. *Eur J Neurosci.* **16**(1): 69-80.

Teile der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sind bereits veröffentlicht worden:

García Arguinzonis, M. I., **Galler, A. B.**, Walter, U., Reinhard, M., Simm, A. (2002). Increased spreading, Rac/p21-activated kinase (PAK) activity, and compromised cell motility in cells deficient in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP). *J. Biol. Chem.* **277**(47): 45604-10.

Butt, E., Gambaryan, S., Gottfert, N., **Galler, A.**, Marcus, K., Meyer, H. E. (2003). Actin Binding of Human LIM and SH3 Protein Is Regulated by cGMP- and cAMP-dependent Protein Kinase Phosphorylation on Serine 146. *J. Biol. Chem.* **278**(18): 15601-7

**Galler, A. B.**, García Arguinzonis M. I., Baumgartner, W., Kuhn. M., Smolenski, A., Walter, U., Drenckhahn, D., Simm, A., Reinhard, M. (2003). VASP dependent regulation of cell adhesion, detachment, and actin cytoskeleton. eingereicht

## **Danksagung**

Diese Arbeit wurde am Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie des Klinikums der Universität Würzburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ulrich Walter durchgeführt, dem ich für seine freundliche Unterstützung und die zahlreichen Anregungen und Ermutigungen danken möchte.

Herrn Prof. Dr. Ricardo Benavente danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Matthias Reinhard, der die Betreuung dieser Arbeit übernommen hat. Ohne seine Ideen und unsere Diskussionen wäre sie nicht zu Stande gekommen. Frau PD Dr. Elke Butt möchte ich für die Einführung in die 2D-Gelelektrophorese und die Gespräche danken. Herrn Prof. Dr. Detlev Drenckhahn, Herrn PD Dr. Werner Baumgartner und Frau Agnes Weth vom Institut für Anatomie und Zellbiologie möchte ich für die sehr angenehme und erfolgreiche Zusammenarbeit bei den Experimenten mit dem Rasterkraftmikroskop und der optischen Pinzette danken. Auch bei Herrn Prof. Dr. Krohne möchte ich mich bedanken, der mir die Durchführung der Elektronenmikroskopie ermöglichte. Mein Dank gilt ferner Elke Baumeister von der Abteilung Nephrologie und Dr. Stepan Gambaryan für die Hilfe bei der Anzucht und Charakterisierung von Mesangial-Zellen.

Allen Mitarbeitern des Instituts gilt mein besonderer Dank, insbesondere Maísa, Catherine, Monika, Elfi und Lilo, die mich immer wieder aufzumuntern wussten. Jörg und René waren eine unersetzliche Hilfe bei zahlreichen Computerproblemen.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung meiner Arbeit und Finanzierung meiner Stelle bedanken (SFB 487/TP B4).

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
1.1.	Zusammenfassung-deutsch .....	1
1.2.	Summary-English .....	2
<b>2.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>3</b>
2.1	Überblick: Das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) .....	3
2.2.	Die Mitglieder der Ena/VASP-Proteinfamilie .....	6
2.2.1.	Drosophila Enabled (Ena) .....	6
2.2.2.	Mammalian Enabled (Mena) .....	6
2.2.3.	Ena/VASP-like (Evl) und RNB6 .....	7
2.2.4.	Avian Enabled (Avena).....	8
2.2.5.	Dictyostelium VASP (DdVASP).....	8
2.2.6.	Das Caenorhabditis Genprodukt Unc 34.....	8
2.3.	Struktur und Eigenschaften der VASP-Domänen.....	9
2.3.1.	Die Ena-VASP Homologie 1 (EVH1) Domäne .....	9
2.3.2.	Die Prolin-reiche Region .....	10
2.3.3.	Die Ena/VASP-Homologie 2 (EVH2) Domäne .....	10
2.4.	Die Phosphorylierung von VASP .....	11
2.4.1	Die Regulation der VASP-Phosphorylierung.....	12
2.4.2.	Die Bedeutung der VASP-Phosphorylierung.....	12
2.5.	Die Funktionen von VASP .....	13
2.5.1.	Die Bedeutung von VASP für die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts .....	13
2.5.2.	Die Bedeutung von VASP für die Aktin-Polymerisation.....	14
2.5.3.	Die Bedeutung von VASP bei der Thrombozyten-Aktivierung .....	14
2.5.4.	Die Bedeutung von VASP für die Adhäsion .....	15
2.5.4.1.	Die Bedeutung von VASP für die Zell-Substrat-Adhäsion.....	15
2.5.4.2.	Die Bedeutung von VASP für die Ausbildung von Zell-Zell Kontakten und die Kontrolle von Permeabilität .....	15
2.5.5.	Die Bedeutung von VASP für die Motilität .....	16
2.5.5.1.	Die Bedeutung von VASP für die Motilität von <i>Listeria monocytogenes</i> .....	16
2.5.5.2.	Die Bedeutung von VASP für die Motilität von Zellen .....	16
2.6.	Die Rolle von VASP in Signaltransduktionswegen der kleinen Rho GTPasen .....	18
2.8.	Aufgabenstellung.....	20
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
3.1.	Material .....	21
3.1.1.	Bakterien ( <i>E. coli</i> ) .....	21
3.1.1.1.	Bakterien-Stämme.....	21
3.1.1.2.	Medien und Agarplatten für Bakterien .....	21
3.1.1.3.	Zusätze für Medien und Agarplatten .....	22
3.1.2.	Kulturzellen.....	22
3.1.2.1.	Puffer, Lösungen, Medien und Seren für die Zellkultur .....	22
3.1.3.	Vektoren und Plasmide .....	23
3.1.3.1.	Vektoren .....	23
3.1.3.2.	Plasmide.....	23
3.1.4.	Chemikalien.....	24
3.1.5.	Peptide .....	24
3.1.6.	Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software .....	25

3.1.6.1.	Verbrauchsmaterialien .....	25
3.1.6.2.	Antikörper .....	25
3.1.6.3.	Geräte .....	26
3.1.6.5.	Software .....	27
3.2.	Methoden .....	28
3.2.1.	Proteinbiochemie.....	28
3.2.1.1.	Gelelektrophorese von Proteinen.....	28
3.2.1.2.	Methanol-Chloroform Proteinfällung.....	30
3.2.1.3.	Coomassie Blau-Färbung von Proteingelen.....	30
3.2.1.5.	Trocknung von Gelen .....	30
3.2.1.6.	Immunomarkierung spezifischer Proteine ( <i>Western Blot</i> ) .....	31
3.2.1.7.	Überexpression und Affinitätsreinigung von rekombinanten „His-tag“-VASP mit dem „QIAexpress-System“ (Qiagen) .....	32
3.2.1.8.	Reinigung von rekombinantem VASP und seinen Phosphomutanten (His-VASP, His-VASP S157A, His-VASP S239A, His-VASP T278A, His-VASP AAA) .....	33
3.2.1.9.	Aktin-Reinigung aus Schweine-Skelettmuskel .....	35
3.2.1.10.	Umpuffern von gereinigten Proteinen.....	37
3.2.1.11.	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	37
3.2.1.13.	Phosphorylierung von His-VASP .....	38
3.2.1.14.	Kosedimentation von VASP-Mutanten bzw. Block B Peptiden mit F-Aktin .....	38
3.2.1.15.	Kreuzvernetzung von Proteinen mit Sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat) .....	39
3.2.2.	Mikroskopie .....	39
3.2.2.1.	Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie .....	39
3.2.2.2.	Formaldehyd-Lösung: .....	40
3.2.2.3.	Mowiol-Lösung: .....	40
3.2.2.4.	Rasterelektronenmikroskopie .....	40
3.2.2.5.	Messungen mit der Laser-Pinzette ( <i>laser-tweezer</i> ).....	41
3.2.2.6.	Beschichtung von Polystyrol- <i>beads</i> .....	42
3.2.2.7.	Rasterkraftmikroskopie (engl: atomic force microscopy, AFM) .....	43
3.2.3.	Zellkultur .....	44
3.2.3.1.	Kulturbedingungen .....	44
3.2.3.2.	Anzucht von Mesangiumzellen.....	44
3.2.3.3.	Immunfärbung zur Charakterisierung von Mesangiumzellen .....	45
3.2.3.4.	Passagieren adhärenter Zellen: .....	45
3.2.3.5.	Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen: .....	46
3.2.3.6.	Mikroinjektion .....	46
3.2.3.7.	Transiente Transfektion von Zellen .....	47
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
4.1.	Die Phosphorylierung von VASP reduziert die F-Aktin Bindung und Bündelung in vitro .....	48
4.2.	VASP-Überexpression erzeugt verstärkte und stabilere Stressfasern .....	51
4.3.	VASP und Rho Überexpression erhöht den Expressionslevel von VASP.....	54
4.4.	Verstärkte Stressfasern und erhöhte Myosin-Leichte-Ketten-Phosphorylierung in VASP (-/-) gegenüber VASP (+/+) Fibroblasten .....	57
4.5.	Der Einfluss von VASP auf die Membranrigidität .....	60
4.5.1.	Die Rasterkraftmikroskopie .....	60
4.5.1.1.	Kraft-Distanz-Kurven .....	62
4.5.1.2.	Bedeutung des Aktin-Zytoskeletts für die Membranrigidität .....	64
4.5.1.3.	Die Bedeutung der Mikrotubuli für die Membranrigidität .....	66

4.6.	Bindung von Fibronectin-beschichteten Perlen an VASP (+/+) und VASP (-/-) Fibroblasten.....	66
4.6.1.	Die Ausbildung von elastischen Membranfortsätzen.....	69
4.6.1.1.	Bedeutung des Zytoskeletts für die Länge der elastischen Bindungen in VASP (+/+) und VASP (-/-) Fibroblasten.....	70
4.6.1.2.	Einfluss von dem cGMP-Analog 8p-CPT-cGMP und dem Epac-Aktivator 8CPT-2Me-cAMP auf die Länge von elastischen Membranfortsätzen .....	71
4.6.2.	Einfluss des Epac-Aktivators 8-(4-chloro-phenylthio)-2'-O-methyladenosin-3',5'-cyclisches Monophosphat (8CPT-2Me-cAMP) auf die Membranrigidität .....	75
4.7.	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Bindung von Fibronectin-beschichteten Perlen an VASP (+/+) und VASP (-/-) Fibroblasten.....	76
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>78</b>
5.1.	Die VASP-Phosphorylierung hemmt die Bündelung an F-Akin .....	78
5.2.	Überexpression von VASP induziert die Bildung von Stressfasern: Hinweise auf VASP als Scaffold-Protein.....	79
5.3.	Koexpression von VASP und Rho: Hinweise auf die Interaktion von VASP mit Signaltransduktionswegen der kleinen Rho-GTPasen .....	81
5.4.	Der Einfluss von VASP auf die Zelladhäsion.....	83
5.4.1.	Der Einfluss von VASP auf die Zellelastizität und Ausbildung von elastischen Membranfortsätzen .....	84
5.4.2.	Der Einfluss der kleinen GTPase Rap1 auf die Länge der elastischen Membranfortsätze .....	86
5.5.	Ausblick .....	89
<b>6.</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>90</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>103</b>



## 1. Zusammenfassung

### 1.1. Zusammenfassung-deutsch

Das Vasodilatator stimulierte Phosphoprotein (VASP) ist ein Zytoskelett-assoziiertes Protein der Ena (Enabled)/VASP-Proteinfamilie. Seine Funktionen bezüglich Aktin-Polymerisation, Thrombozyten-Aggregation, Wachstumskegel-Führungsprozessen und Motilität sowohl von Zellen als auch von Listerien sind bisher nur unvollständig charakterisiert.

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, wie die VASP-F-Aktin Interaktion *in vitro* durch die Phosphorylierung zweier Aminosäuren von VASP reguliert wird. Transfektions-Experimente mit VASP und RhoA deuten eine mögliche Beteiligung von VASP im Signalweg von RhoA an. Zudem führen Überexpression und Deletion von VASP in Zellen zu demselben Stressfaser-Phänotyp, der unabhängig vom stimulierenden Einfluss von Serum ist. In VASP-defizienten Fibroblasten ist außerdem die Membranrigidität und die Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins erhöht, was auf ein stabileres und stärker kontrahiertes Aktin-Zytoskelett in diesen Zellen schließen lässt. Die Regulation und Organisation des Aktin-Zytoskeletts beeinflusst auch die zelluläre Adhäsion, die in VASP-defizienten Zellen verändert ist. VASP-defiziente Zellen adhären signifikant stärker an Fibronektin-beschichtete Perlen als Wildtyp-Zellen. Der Widerstand dieser Perlen gegenüber mechanischen Kräften ist in VASP (-/-) Zellen signifikant erhöht. Dieser Unterschied beruht in erster Linie auf dem verstärkten Aktin-Zytoskelett in diesen Zellen und ist unabhängig von Mikrotubuli. Messungen mit rekonstituierten Zelllinien zeigen zudem eine VASP-Abhängigkeit dieses Effekts. Der GTPase Rap1 kommt eine wichtige Bedeutung bei der Integrin-abhängigen Adhäsion von Zellen zu. Aktivierung von Epac, einem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor von Rap1, führt in Wildtyp-Zellen zur Verstärkung des Widerstandes gegenüber mechanischen Kräften, die auf Fibronektin-beschichtete Perlen wirken, ohne dabei die Membranrigidität zu verändern. Diese Kraft-Verstärkung wird weder vom Aktin- noch vom Mikrotubuli-Zytoskelett beeinflusst. Es existiert daher ein Mechanismus, bei dem die Länge von elastischen Membranfortsätzen unabhängig von der Membranfestigkeit und dem Aktin-Zytoskelett reguliert wird.

Diese Experimente zeigen, dass VASP eine wichtige Rolle bei der Stabilität und Kontraktilität des Aktin-Zytoskeletts, der Membranrigidität sowie bei der zellulären Adhäsion spielt. Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass hierbei weniger die direkte Interaktion von VASP mit dem Aktin-Zytoskelett von Bedeutung ist, sondern viel mehr seine mögliche Funktion als Gerüstprotein (*Scaffold*), das eine geregelte Signaltransduktion organisiert.

## 1.2. Summary-English

The actin-cytoskeleton associated protein VASP (vasodilator stimulated phospho-protein) is a founding member of the Ena (enabled)/VASP protein family. Its function in actin-polymerisation, platelet aggregation, axon-guidance, cell motility and *Listeria monocytogenes* is yet not completely understood.

In this work I could show that the phosphorylation of two amino acid residues of VASP diminishes its interaction with F-actin. Transfection experiments with VASP and RhoA suggest a possible role for VASP in the RhoA signalling pathway. Both, overexpression and deletion of VASP results in a similar stressfiber phenotype, which is independent of the stimulatory effect of serum. Furthermore membrane rigidity and myosin light chain phosphorylation in VASP deficient cells is increased, indicating a more contracted and rigid cytoskeleton in these cells. Cell adhesion is influenced by the regulation and organisation of the actin-cytoskeleton. VASP deficient cells not only adhere significantly stronger to fibronectin-coated beads but also resistance to displacement by mechanical forces is enhanced. This effect results from greater stability of the actin-cytoskeleton while there is no evidence for microtubuli involvement. Experiments with reconstituted VASP (-/-) cell lines proof this effect being VASP-dependent. The GTPase Rap1 is an important regulator of integrin-dependent cell adhesion. Activation of Epac, a guanine nucleotid exchange factor for Rap1, in wildtyp cells leads to enhanced resisting forces to mechanical displacement of fibronectin-coated beads while membrane rigidity remains unchanged. This phenomenon is neither dependent on F-actin nor microtubuli indicating a modulation of membrane tethers independently of membrane rigidity. These results show that VASP is an important regulator of actin-cytoskeletal stability and contractility, as well as membrane rigidity and cell adhesion. Furthermore these data suggest a possible role for VASP as a scaffold protein organising intracellular signal transduction.

## 2. Einleitung

### 2.1 Überblick: Das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP)

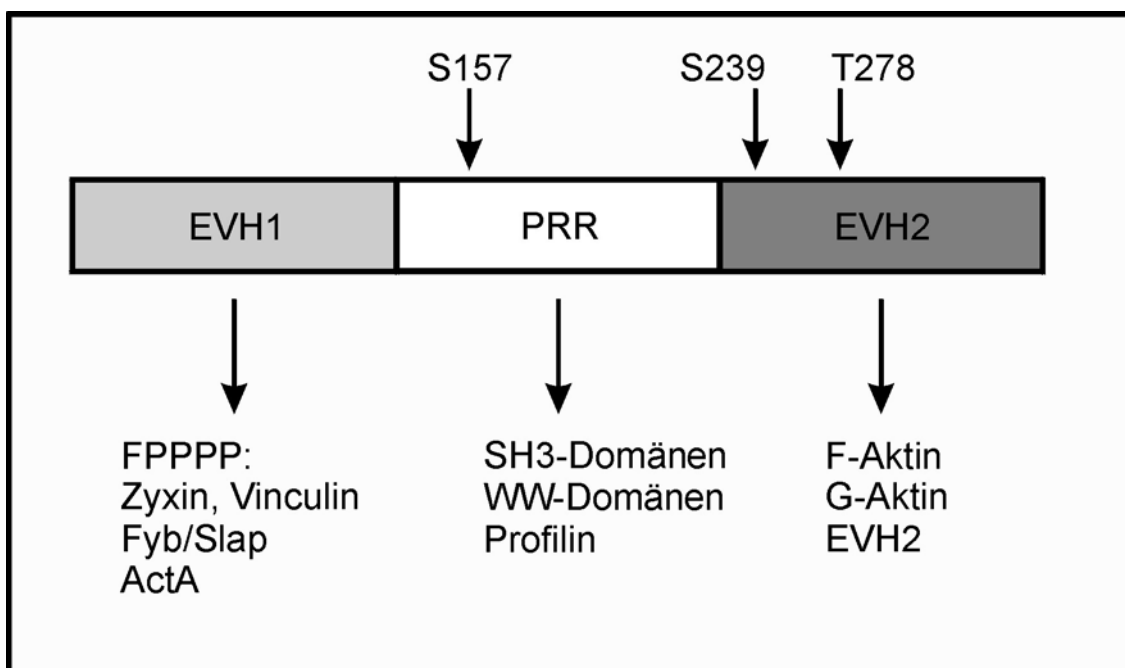
Das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) wurde ursprünglich als Substrat der cAMP- und cGMP- abhängigen Proteinkinasen (PKA und PKG) in humanen Thrombozyten identifiziert (Halbrugge *et al.*, 1990; Halbrugge and Walter, 1989) und gehört zu den Gründungsmitgliedern der Ena (Enabled)/VASP Proteinfamilie. Die Proteine der Ena/VASP-Familie sind wichtige Regulatoren der F-Aktin Dynamik (Krause *et al.*, 2000; Machesky, 2000; Reinhard *et al.*, 2001). Sie beeinflussen Eigenschaften wie Zell-Zell (Collard *et al.*, 2002; Comerford *et al.*, 2002; Lawrence *et al.*, 2002; Vasioukhin *et al.*, 2000) und Zell-Substrat Adhäsion (Ahern-Djamali *et al.*, 1998), Thrombozyten Aktivierung (Aszodi *et al.*, 1999; Hauser *et al.*, 1999), Axon-Führungsprozesse (Bashaw *et al.*, 2000) und die Motilität sowohl von Zellen (Bear *et al.*, 2000; Loureiro *et al.*, 2002) als auch die des pathogenen Bakteriums *Listeria monocytogenes* (Geese *et al.*, 2002; Laurent *et al.*, 1999; Loisel *et al.*, 1999; Niebuhr *et al.*, 1997) (Krause *et al.*, 2000; Machesky, 2000; Reinhard *et al.*, 2001). Neben den Gründungsmitgliedern *Drosophila* Ena (Gertler *et al.*, 1995) und humanem VASP besteht die Ena/VASP-Proteinfamilie aus den Ena Orthologen Mena (engl.: *mammalian ena*) (Gertler *et al.*, 1996) und Avena (engl.: *avian ena*), Evi (engl.: *ena-VASP-like*) (Gertler *et al.*, 1996), dem *Caenorhabditis unc 34* Genprodukt] und *Dictyostelium* VASP (DdVASP) (Han *et al.*, 2002).

Alle Mitglieder dieser Proteinfamilie besitzen eine einheitliche, dreigeteilte Domänenstruktur bestehend aus einer N-terminalen Ena-VASP Homologie 1 (EVH1)-Domäne und einer C-terminalen EVH2-Domäne, die durch eine Prolin-reiche Region (PRR) voneinander getrennt sind (Gertler *et al.*, 1996; Haffner *et al.*, 1995).

VASP bindet über die EVH1-Domäne Prolin-reiche Liganden (Abschnitt 2.3.1.), wie die Fokalen Kontakt Proteine Vinculin (Reinhard *et al.*, 1996) und Zyxin (Reinhard *et al.*, 1995b), das Adaptorprotein Fyb/Slap (Krause *et al.*, 2000; Oberfell *et al.*, 2001) und das Listerien Oberflächenprotein ActA (Niebuhr *et al.*, 1997). Die PRR von VASP interagiert mit SH3-Domänen (Ahern-Djamali *et al.*, 1998) sowie mit dem G-Aktin bindenden Protein Profilin (Reinhard *et al.*, 1995a) (Abschnitt 2.3.2.). Die EVH2-Domäne vermittelt neben, der Tetramerisierung und Hetero-Oligomerisierung, die Bindung sowohl an G- als auch an F-Aktin (Bachmann *et al.*, 1999; Walders-Harbeck *et al.*, 2002) (Abschnitt 2.3.3.). VASP besitzt *in vitro* geringe Aktin-Nukleations und -Polymerisations Aktivität, die durch die Zugabe des Aktin-bindenden Proteins Profilin erhöht wird (Walders-Harbeck *et al.*, 2002). Abb. 1 zeigt den schematischen Aufbau von humanem VASP und dessen Bindungspartnern.

VASP besitzt drei Konsensussequenzen (Ser157; Ser239; Thr278 in humanem VASP) für die Phosphorylierung durch die cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinasen (Butt *et al.*, 1994) (Abb. 1). Phosphorylierung einer oder mehrerer dieser Stellen reguliert Protein-Interaktionen und Funktionen von VASP (Geese *et al.*, 2002; Harbeck *et al.*, 2000; Loureiro *et al.*, 2002) (Abschnitt 2.4.).

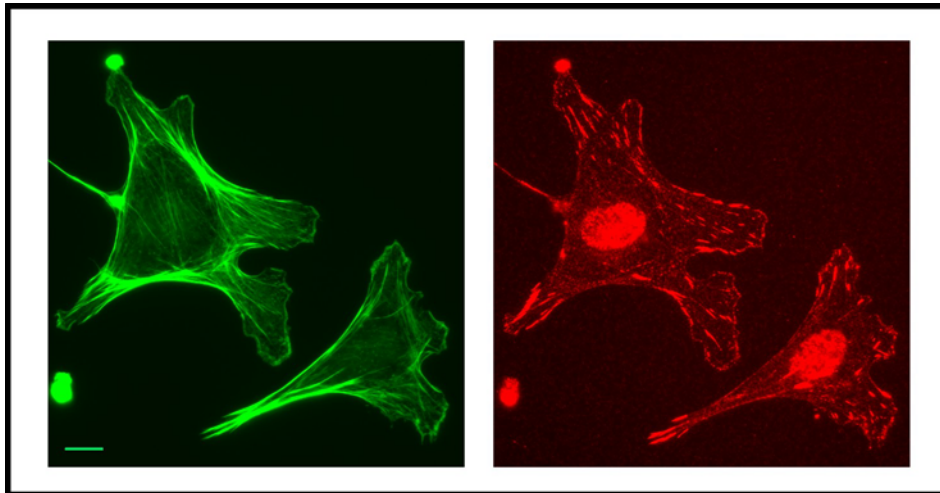
VASP lokalisiert an Zell-Zell (Comerford *et al.*, 2002; Lawrence *et al.*, 2002; Vasioukhin *et al.*, 2000) und Zell-Matrix-Kontakten (Ahern-Djamali *et al.*, 1998; Reinhard *et al.*, 1992), F-Aktin-Strukturen und Regionen dynamischer Aktin-Polymerisation und – Reorganisation (Bear *et al.*, 2000; Reinhard *et al.*, 1995a; Rottner *et al.*, 1999). So findet sich VASP an Zell-Zell-*Adherens junctions* und den Endpunkten von Stressfasern, den Fokalen Kontakten. VASP kolokalisiert mit Zyxin an Stressfasern an den Stellen, die den Z-Scheiben des Skelettmuskels entsprechen, wodurch das typische periodische Muster entsteht (Reinhard *et al.*, 2001). Außerdem ist VASP an der Spitze von Filopodien (Svitkina *et al.*, 2003), und am äußerstem Rand sich fortbewegender Lamellipodien lokalisiert (Rottner *et al.*, 1999).



**Abb. 1: Das Vasodilatator stimulierte Phosphoprotein (VASP)**

Schematische Darstellung der Domänenstruktur des ca. 380 AS großen humanen VASPs mit dessen Bindungspartnern.

Die Phosphorylierungsstellen der PKA und PKG sind mit Pfeilen markiert (Ser157; Ser239 und Thr278). Die N-terminale EVH1-Domäne vermittelt die Bindung an Prolin-reiche Liganden, die das Sequenzmotiv FPPPP enthalten, wie z.B. Vinculin, Zyxin, ActA und Fyb/Slap. Die mittlere Prolin-reiche Region interagiert mit Profilin sowie SH3- und WW-Domänen. Die C-terminale EVH2-Domäne bindet an G- und F-Aktin und ist für die Tetramerisierung verantwortlich, wodurch Interaktionen mit VASP-Bindungspartnern stabilisiert werden.



**Abb. 2: Lokalisation von VASP in murinen Mesangialzellen**

Dargestellt sind murine Mesangialzellen, die sowohl mit einem Antikörper gegen VASP (rechts) und gleichzeitig mit Fluoreszenz-markiertem Phalloidin für F-Aktin (links) gefärbt wurden. Zu erkennen ist die Ko-Lokalisation von VASP mit F-Aktin an Stressfasern, Fokalen Kontakten und im Rand von Lamellipodien. Balken: 10  $\mu\text{m}$ .

VASP-defiziente Mäuse sind lebensfähig und fruchtbar und zeigen einen milden Phänotyp, der sich durch eine leichte Megakaryozyten-Hyperplasie im Knochenmark und in der Milz äußert (Hauser *et al.*, 1999). Desweiteren wurde an isolierten VASP-defizienten Plättchen eine erhöhte Aktivierung durch Kollagen und Thrombin sowie eine verminderte Inhibierung der Thrombozyten-Aggregation durch zyklische Nukleotide festgestellt (Aszodi *et al.*, 1999; Hauser *et al.*, 1999). Isolierte Thrombozyten aus VASP (-/-) Mäusen zeigen ferner eine erhöhte Agonisten-induzierte Expression von P-Selektin und Fibrinogen-Bindung an das Integrin GPIIb-IIIa (Aszodi *et al.*, 1999; Hauser *et al.*, 1999). Zudem adhäreren VASP (-/-) Thrombozyten verstärkt an Endothel und subendothelialer extrazellulärer Matrix *in vivo* (Massberg *et al.*, 2003) (Abschnitt 2.3.1.). Obwohl die Expression der anderen Familienmitglieder Mena und Evl in VASP (-/-) Mäusen nicht erhöht ist, besteht die Möglichkeit, dass die Funktion von VASP durch Mena oder Evl kompensiert wird (Aszodi *et al.*, 1999; Hauser *et al.*, 1999).

Die Mitglieder der Ena/VASP-Proteinfamilie zeichnen sich nicht nur durch strukturelle Ähnlichkeit sowie durch überlappende Interaktionen mit einer Vielzahl von Liganden aus, sondern können einander zumindest teilweise auch funktionell ersetzen (Ahern-Djamali *et al.*, 1998; Lanier and Gertler, 2000; Laurent *et al.*, 1999; Loureiro *et al.*, 2002). Eine Reihe experimenteller Ergebnisse deuten darauf hin, dass VASP und andere Familienmitglieder für die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts von Bedeutung sind und ein Bindeglied zwischen Signaltransduktionswegen und dem Aktin-Zytoskelett darstellen (Garcia Arguinzonis *et al.*, 2002; Griffiths and Penninger, 2002b; Grosse *et al.*, 2003; Krugmann *et al.*, 2001; Abschnitt 2.6.).

## 2.2. Die Mitglieder der Ena/VASP-Proteinfamilie

### 2.2.1. *Drosophila* Enabled (Ena)

*Drosophila* Ena wurde als Suppressor von Mutanten der Abelson Tyrosinkinase (Abl) entdeckt (Gertler *et al.*, 1995; Gertler *et al.*, 1990). Über die PRR bindet Ena Chickadee (*Drosophila* Profilin) und die *src homology 3* (SH3)-Domänen der Tyrosinkinasen Abl und Src (Ahern-Djamali *et al.*, 1999). Die EVH1-Domäne vermittelt *in vitro* die Bindung an die Prolinreiche Region von Zyxin (Ahern-Djamali *et al.*, 1998) und *in vivo* die Bindung an die cytoplasmatische LPPPP-Sequenz des Transmembranrezeptors Roundabout (Robo) (Bashaw *et al.*, 2000). Diese Interaktion spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung axonaler Verbindungen und ist entscheidend für die durch Robo vermittelte Abstoßung neuronaler Wachstumskegel (Bashaw *et al.*, 2000). Während der Morphogenese interagiert Ena genetisch mit dem *Adherens junction*-Protein Armadillo (Grevengoed *et al.*, 2001).

Ena wird *in vivo* abhängig und unabhängig von Abl an Tyrosinresten phosphoryliert (Ahern-Djamali *et al.*, 1999; Gertler *et al.*, 1996). Die Tyrosinphosphorylierung durch Abl nahe der PRR hemmt die Bindung an die SH3-Domänen von Abl und Src (Comer *et al.*, 1998).

In *Drosophila* befindet sich Ena an den axonalen Trakten des sich entwickelnden Zentralen Nervensystems (ZNS) sowie an *Adherens junctions* von Epithelzellen (Gertler *et al.*, 1995; Grevengoed *et al.*, 2001). Nach Transfektion in Säugerzellen lokalisiert Ena wie VASP an Fokale Kontakte und Stressfasern (Ahern-Djamali *et al.*, 1998).

*Drosophila* ena (-/-) Mutanten sind embryonal letal und weisen große Defekte in den axonalen Strukturen des ZNS auf. Dieser Phänotyp kann vollständig durch Ena und teilweise sowohl durch VASP als auch durch eine Ena-Mutante aufgehoben werden, die keine Tyrosin-Phosphorylierungsstellen enthält (Ahern-Djamali *et al.*, 1998).

### 2.2.2. Mammalian Enabled (Mena)

Mena wurde auf der Suche nach Ena-Orthologen in der Maus entdeckt (Gertler *et al.*, 1996). Neben der EVH1- und EVH2-Domäne und der PRR enthält es zwischen der EVH1-Domäne und der PRR zusätzlich eine Region geringer Sequenz-Komplexität (engl.: *Low Complexity Region*; LCR), in der sich die Aminosäuresequenz LERER (Einbuchstabencode) fünf mal wiederholt (Gertler *et al.*, 1996; Reinhard *et al.*, 2001). Durch alternatives Splicen entstehen drei verschiedene Isoformen von Mena, die im *Western Blot* bei 140, 88 und 80 kDa detektiert werden. Die 80 und 88 kDa großen Isoformen werden ubiquitär exprimiert, wohingegen die 140 kDa große Isoform ausschließlich in Neuronen nachgewiesen wurde. Letztere wird zudem an Tyrosinresten phosphoryliert, wohingegen die

ubiquitäre 80 kDa große Isoform scheinbar an Serinresten phosphoryliert wird (Gertler *et al.*, 1996).

Wie VASP bindet Mena über die EVH1-Domäne Zyxin, Vinculin und ActA. Die PRR von Mena vermittelt die Bindung an das G-Aktin bindende Protein Profilin, den SH3-Domänen der Tyrosinkinase Abl und Src (Gertler *et al.*, 1996) und die WW-Domäne des neuronalen Proteins FE65 (Ermekova *et al.*, 1997). Letzteres spielt durch Bindung an APP (engl.: *Alzheimer amyloid precursor protein*) eine Rolle bei der Alzheimer-Krankheit. Des Weiteren interagiert Mena über die PRR mit dem Insulinrezeptor Substrat IRSp53, das wiederum an die kleine Rho-GTPase Cdc42 bindet. Mena und IRSp53 agieren synergistisch bei der Cdc42-induzierten Bildung von Filopodien (Krugmann *et al.*, 2001)

Mena lokalisiert wie VASP an Zell-Zell- (Vasioukhin *et al.*, 2000) und Zell-Matrix-Kontakten (Fokale Kontakte), und in Regionen aktiver Aktin-Polymerisation, wie zum Beispiel an der Oberfläche von Listerien (Gertler *et al.*, 1996), der Vorderfront neuronaler Wachstumskegel (Lanier *et al.*, 1999) und am Rand sich ausbreitender Lamellipodien (Rottner *et al.*, 1999). In geringerem Maß findet sich Mena zudem an Stressfasern (Gertler *et al.*, 1996).

Mena (-/-) Mäuse sind lebensfähig und fruchtbar und zeigen einen milden Phänotyp, der sich in geringer neuronaler Dysfunktion äußert (Lanier *et al.*, 1999). Allerdings führt eine zusätzliche Heterozygotie in Profilin I zum pränatalen Tod aufgrund von Neurulations-Defekten (Lanier *et al.*, 1999; Lanier and Gertler, 2000).

### **2.2.3. Ena/VASP-like (Evl) und RNB6**

Evl wurde, wie auch Mena, bei der Suche nach Orthologen von Ena in der Maus entdeckt (Gertler *et al.*, 1996). Evl bindet ein Mitglied der Axon-Führungsrezeptoren der Semaphorin-Familie, Semaphorin 6A-1 (Klostermann *et al.*, 2000). Über die Prolin-reiche Region interagiert Evl mit den SH3-Domänen der Abl-, Lyn- und nSrc-Tyrosin-Kinasen, der WW-Domäne von FE65 und Profilin. Die Bindungsstellen der SH3-Domänen und von Profilin überlappen teilweise, wodurch die Interaktionen mit diesen Liganden kompetitiv sind (Lambrechts *et al.*, 2000).

Evl besitzt eine Phosphorylierungsstelle für die PKA in der PRR, wodurch die Interaktion mit seinen Liganden reguliert wird. So werden die Bindungen an die SH3-Domänen von Abl und nSrc durch die Phosphorylierung inhibiert, jedoch nicht die Bindungen an Profilin oder anderer SH3-Domänen (Lambrechts *et al.*, 2000). Evl besitzt im Gegensatz zu VASP Aktin-Nukleations Aktivität unter physiologischen Bedingungen. Diese wird wie die Polymerisations-fördernde Aktivität durch Phosphorylierung von Evl reduziert (Lambrechts *et al.*, 2000).

Zwei Isoformen, Evi und Evi-1 werden in den hämatopoetischen Zellen von Thymus und Milz stark exprimiert. In CD3-aktivierten T-Zellen lokalisiert EVL an F-Aktin-reichen Strukturen und den Spitzen von Mikrospeikes, die sich an der aktivierten Seite der T-Lymphocyten bilden. Wie die anderen Familienmitglieder findet sich EVL nach Transfektion in Fibroblasten an Fokalen Kontakten und am Rand von Lamellipodien (Lambrechts *et al.*, 2000).

RNB6 wurde durch Differenziellen *Display* auf der Such nach Genen in der Ratte identifiziert, die die neuronale Zellentwicklung im ZNS kontrollieren. RNB6 zeigt 99% Homologie zu murinem Evi und wird in den Neuronen des neonatalen Gehirns sowie in der Milz, dem Testis und dem Thymus exprimiert (Ohta *et al.*, 1997).

#### **2.2.4. Avian Enabled (Avena)**

Neben der Sequenz von Avena (Huhn) (GenBank BAA33016.1) ist bekannt, dass die EVH2-Domäne von Avena nach Überexpression am Rand von Lamellipodien lokalisiert und dort insbesondere an die Spitze der sogenannten *mikrospikes* (Nakagawa *et al.*, 2001).

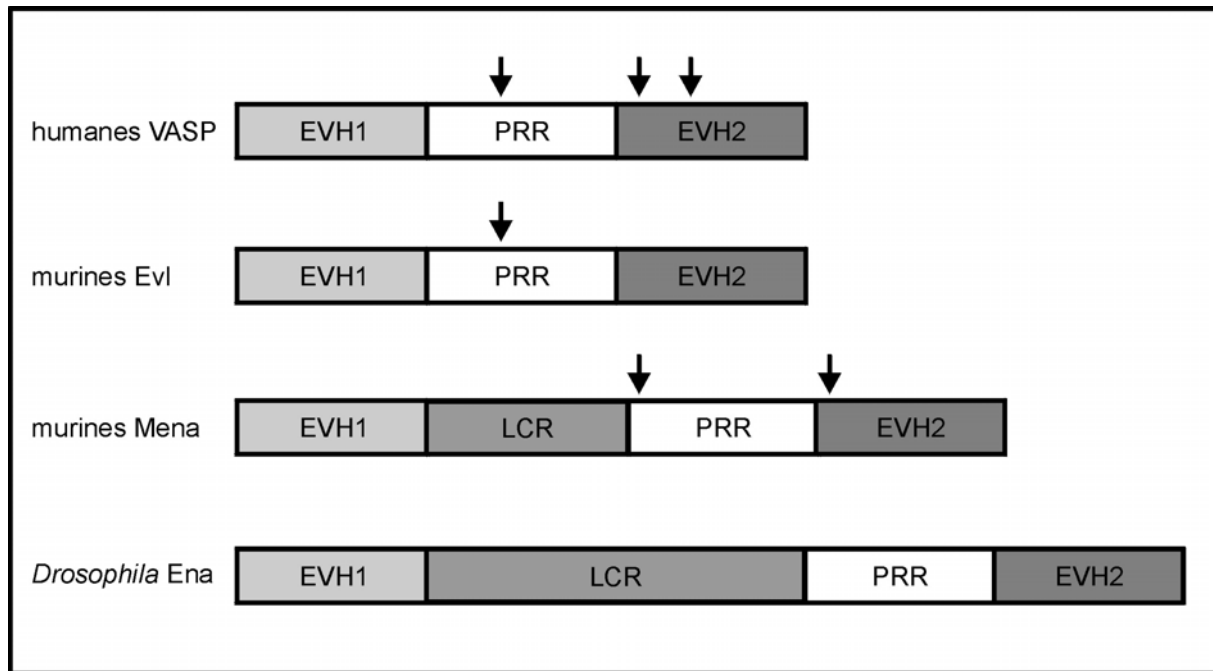
#### **2.2.5. Dictyostelium VASP (DdVASP)**

Das *Dictyostelium* Ortholog von VASP wurde durch eine Datenbank-Suche entdeckt. DdVASP beeinflusst die Ausbildung von Filopodien, die Chemotaxis und die Adhäsion von Partikeln. DdVASP-defiziente Zellen bilden weniger Filopodien aus (ein Phänotyp, der dem der Cdc42-defizienten embryonalen Stammzellen der Maus sehr ähnelt), wohingegen die Membranlokalisierung von DdVASP die Anzahl von Filopodien erhöht. Sowohl für die Bildung der Filopodien als auch für die Aktin-Polymerisation sind die Prolin-reiche Region und die EVH2-Domäne von Bedeutung. Die Effizienz der Chemotaxis ist in DdVASP (-/-) Zellen deutlich verringert. Dieser Defekt wird scheinbar durch gestörte Adhäsion und die Unfähigkeit, laterale Pseudopodien-Ausläufer zu unterdrücken, verursacht. Des Weiteren zeigen DdVASP-defiziente Zellen geringere Partikel-Adhäsion, wohingegen die Internalisation jedoch unverändert ist (Han *et al.*, 2002).

#### **2.2.6. Das Caenorhabditis Genprodukt Unc 34**

Unc 34 ist ein *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) Ortholog zu *Drosophila* Ena und ist wie Ena in Axon-Führungsprozesse involviert. Unc 34 interagiert hierbei mit dem Rezeptor SAX-3, dem *C. elegans* Ortholog zu *Drosophila* Robo (Yu *et al.*, 2002).





**Abb. 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Mitglieder der Ena/VASP-Proteinfamilie.**

Die PKA/PKG-Phosphorylierungsstellen von VASP sowie die entsprechend konservierten Stellen in Evl und Mena sind durch Pfeile gekennzeichnet.

EVH1: Ena/VASP Homologie 1; EVH2: Ena/VASP Homologie 2; PRR: Prolin-reiche Region

### 2.3. Struktur und Eigenschaften der VASP-Domänen

#### 2.3.1. Die Ena-VASP Homologie 1 (EVH1) Domäne

Die EVH1-Domäne umfasst ca. 115 Aminosäuren und befindet sich am N-Terminus der Ena/VASP-Proteinfamilie und der entfernt verwandten Proteinen der Homer/Vesl (Reinhard *et al.*, 2001; Renfranz and Beckerle, 2002) und Spred (engl.: *Sprouty related protein with EVH1 domain*) Proteinfamilien (Wakioka *et al.*, 2001). Strukturanalysen der EVH1-Domänen von Mena (Prehoda *et al.*, 1999), Evl (Fedorov *et al.*, 1999) VASP (Ball *et al.*, 2000) und Homer/Vesl (Barzik *et al.*, 2001; Barzik *et al.*, 2000) zeigen starke Strukturhomologien zu Pleckstrin-Homologie (PH), Phosphotyrosin-bindenden (PTB) und Ran-bindenden (RanBD) Domänen, obwohl nur geringe Sequenzhomologien vorhanden sind (Callebaut *et al.*, 1998). Die EVH1-Domäne erkennt, wie auch Profilin, SH3- und WW-Domänen, Prolin-reiche Liganden (Niebuhr *et al.*, 1997). Bei den Mitgliedern der Ena/VASP-Proteinfamilie vermittelt die EVH1-Domäne die Bindung an das Sequenzmotiv E/DFPPPPXD/E, das eine Typ II Polyprolin-Helix ausbildet (eine linkshändige Helix mit drei Aminosäuren pro Umdrehung). Die N-terminale hydrophobe Aminosäure Phenylalanin bindet hierbei in eine hydrophobe Tasche der EVH1-Domäne und erhöht so die Spezifität (Fedorov *et al.*, 1999). Das Sequenzmotiv ist z. B. in dem Listerien Oberflächenprotein ActA (Niebuhr *et al.*, 1997), den Fokalen Kontakt-Proteinen Zyxin (Reinhard *et al.*, 1995b) und Vinculin

(Reinhard *et al.*, 1996), den Axon-Führungsproteinen Roundabout (Robo) (Bashaw *et al.*, 2000) und Semaphorin 6A-1 (Klostermann *et al.*, 2000) und dem Fyn-bindenden Protein/SLP-76 assoziierten Protein (Fyb/SLAP) (Krause *et al.*, 2000; Obergfell *et al.*, 2001) enthalten. Ein zweites Affinitäts-bestimmendes Epitop in den erweiterten Bindungsmotiven von ActA erhöht die Affinität des Listerienproteins gegenüber der endogenen Liganden Zyxin und Vinculin (Ball *et al.*, 2000).

Die EVH1-Domäne wird für die Lokalisation von VASP, Mena und Ena an die Fokalen Kontakte, die Peripherie sich ausbreitender Lamellipodien und die Oberfläche von Listerien benötigt (Drees *et al.*, 2000; Gertler *et al.*, 1996; Niebuhr *et al.*, 1997; Reinhard *et al.*, 2001), jedoch nicht für die ungerichtete Motilität von Fibroblasten (Loureiro *et al.*, 2002).

Für die WASP Homologie 1 (WH1) Domäne der Wiskott-Aldrich-Syndrom Proteine (WASP und N (neuronal)-WASP) wird eine Strukturhomologie zu EVH1-Domänen vorausgesagt (Callebaut *et al.*, 1998; Zettl and Way, 2002). Zudem sind die für die Ligandenbindung essentiellen Aminosäuren der EVH1-Domäne in der WH1-Domäne konserviert. Entgegen den Erwartungen binden WH1-Domänen jedoch nicht Prolin-reiche Liganden sondern das Sequenzmotiv ESRFYFHPISD, bei dem die beiden Phenylalanine (fett markiert) von besonderer Bedeutung sind (Zettl and Way, 2002).

### **2.3.2. Die Prolin-reiche Region**

Ena/VASP-Proteine binden nicht nur Prolin-reiche Liganden, sondern enthalten selber eine PRR. Diese zentrale, weniger homologe Region enthält viermal das Sequenzmotiv GPPPPP (GP<sub>5</sub>), von denen drei in Wiederholung (*tandem repeats*) auftreten (Kang *et al.*, 1997). Die PRR bindet an SH3- (z.B. in Abl und Src) (Ahern-Djamali *et al.*, 1998) und WW-Domänen (z.B. in FE65) (Ermekova *et al.*, 1997) sowie an Profilin (Kang *et al.*, 1997; Reinhard *et al.*, 1995a)). Die PRR ist, neben Phosphorylierung und der mutmaßlichen G-Aktin Bindungsstelle, für die Motilität von Listerien in ihren Wirtszellen essentiell (Geese *et al.*, 2002). Deletion des (GP<sub>5</sub>)<sub>3</sub>-Motivs, das die Bindung von Profilin vermittelt (Kang *et al.*, 1997), reduziert die Motilität auf ein mittleres Maß (Geese *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu ist die PRR von Mena entbehrlich für die ungerichtete Motilität von Fibroblasten (Loureiro *et al.*, 2002).

### **2.3.3. Die Ena/VASP-Homologie 2 (EVH2) Domäne**

Die EVH2-Domäne ist bisher einzigartig für die Mitglieder der Ena/VASP-Familie. Sie vermittelt die Bindung an F-Aktin und ist über eine C-terminale *coiled-coiled* Region (AS 336-380 in humanem VASP) für die Tetramerisierung bzw. Hetero-Oligomerisierung von Ena/VASP-Proteinen verantwortlich (Bachmann *et al.*, 1999; Zimmermann *et al.*, 2002). Die

hochsymmetrische und extrem stabile Tetramerisierung moduliert die F-Aktin Bündelung und stabilisiert Protein-Interaktionen der PRR und der EVH1-Domäne (Ahern-Djamali *et al.*, 1998; Bachmann *et al.*, 1999; Huttelmaier *et al.*, 1999; Zimmermann *et al.*, 2002).

Die EVH2-Domäne besitzt im N-terminalen Teil eine G-Aktin Bindungsstelle (KLKR), wie sie auch in dem G-Aktin-bindenden Protein Thymosin  $\beta$ 4 enthalten ist (Gertler *et al.*, 1996; Walders-Harbeck *et al.*, 2002). Deletion der G-Aktin Bindungsstelle reduziert die Motilität von Listerien in ihren Wirtszellen. Dagegen besitzt die Deletion der *coiled-coiled* Region keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit des Pathogens und die Deletion der F-Aktin-Bindungsstelle erhöht sogar die Motilität leicht (Geese *et al.*, 2002).

Die Tetramerisierungs- und F-Aktin-Bindungsdomäne der EVH2-Domäne sind bei der Regulation der Permeabilität von Endothel- und Epithelzellen von Bedeutung. So führt die Überexpression von VASP-Mutanten, denen diese Domänen fehlen, zur Reduktion der Permeabilität (Comerford *et al.*, 2002; Lawrence *et al.*, 2002).

Nach Überexpression lokalisiert die EVH2-Domäne an Stressfasern und in Lamellipodien jedoch nicht an Fokalen Kontakten (Bachmann *et al.*, 1999; Huttelmaier *et al.*, 1999; Loureiro *et al.*, 2002). Die Expression der EVH2-Domäne von Mena in Ena/VASP-defizienten Fibroblasten reduziert die Zell-Motilität im gleichen Maß wie die Expression des *full-lengths* Proteins. Hierbei spielt insbesondere die F-Aktin Bindung eine Rolle (Loureiro *et al.*, 2002). Für die Überexpression des C-terminalen EVH2-Fragments wird bezüglich der Mena/VASP-abhängigen Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten eine dominant-negative Wirkung beschrieben (Vasioukhin *et al.*, 2000).

#### **2.4. Die Phosphorylierung von VASP**

VASP besitzt drei Konsensussequenzen für die PKA und PKG (Ser157, Ser239 und Thr278 in humanem VASP), die sowohl *in vitro* als auch in intakten Thrombozyten mit unterschiedlicher Präferenz phosphoryliert werden (Halbrugge *et al.*, 1990; Halbrugge and Walter, 1989): Ser157 ist die bevorzugte Phosphorylierungsstelle der PKA, wohingegen Ser239 von der PKG bevorzugt wird. Thr278 wird von beiden Kinasen nur schlecht phosphoryliert. Die Phosphorylierung an Ser157 führt in der SDS-PAGE zu einem *shift* im Molekulargewicht von scheinbaren 46 auf 50 kDa (Butt *et al.*, 1994).

Die Dephosphorylierung erfolgt durch die Protein-Phosphatasen (PP) PP2A, PP2B und PP2C *in vitro* und vermutlich durch die PP2A in humanen Thrombozyten (Abel *et al.*, 1995).

Von den drei Ser/Thr-Phosphorylierungsstellen in VASP (Ser157, Ser239 und Thr278 für humanes VASP) sind in Mena zwei (die Ser157 und Ser239 entsprechen) und in Evi eine

(die Ser157 entspricht) konserviert (Abb. 3). Mena wird im Gegensatz zu VASP zusätzlich an Tyrosinresten phosphoryliert (Gertler *et al.*, 1996; Lambrechts *et al.*, 2000).

#### **2.4.1 Die Regulation der VASP-Phosphorylierung**

Prostacyclin und Stickstoffmonoxid (NO) inhibieren die Thrombozyten-Aggregation über die Aktivierung der cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinasen. Als Substrat dieser Kinasen ist VASP für die Inhibierung der Thrombozyten-Aggregation von Bedeutung (Aszodi *et al.*, 1999; Hauser *et al.*, 1999).

In der Zellkultur werden die Phosphorylierung durch die PKA und die Dephosphorylierung von VASP durch die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix reguliert. Das Ablösen von kultivierten Zellen stimuliert die PKA und induziert die PKA-abhängige Phosphorylierung an Ser157 sowohl von VASP als auch von Mena. Nach erneutem Aussäen werden VASP und Mena sowohl an Ser157 und Ser239 dephosphoryliert, während sie beim Ausbreiten der Zellen teilweise wieder phosphoryliert werden. (Howe *et al.*, 2002; Lawrence and Pryzwansky, 2001). Dies beeinflusst auch die Interaktion von Abl mit VASP. So interagieren Abl und VASP in adhärenenten, jedoch nicht in suspendierten Zellen. Nach Hemmung der PKA konnte Abl auch in VASP-Immunpräzipitaten von suspendierten Zellen nachgewiesen werden, wohingegen PKA-Aktivierung in adhärenenten Zellen die Bindung von Abl an VASP verhinderte (Howe *et al.*, 2002).

#### **2.4.2. Die Bedeutung der VASP-Phosphorylierung**

Die VASP-Phosphorylierung verhindert *in vitro* die VASP induzierte Aktin-Filament Bildung (Walders-Harbeck *et al.*, 2002) und reduziert die Interaktion mit G- und F-Aktin (Harbeck *et al.*, 2000; Walders-Harbeck *et al.*, 2002 und diese Arbeit), wohingegen die Bindung der Liganden Zyxin, Vinculin und Profilin nicht beeinflusst wird (Harbeck *et al.*, 2000).

Die Phosphorylierung von VASP korreliert zudem deutlich mit der Inhibierung der Plättchen-Aggregation und der verringerten Affinität des Fibrinogen-Rezeptors Glykoprotein (GP) IIb-IIIa (Aszodi *et al.*, 1999; Halbrugge *et al.*, 1990; Hauser *et al.*, 1999; Horstrup *et al.*, 1994).

Die Phosphorylierung von VASP führt in einigen Zellen zur subzellulären Relokalisation des Proteins. So führt die Stimulation der PKG in HUVECs zum Ablösen von wt-VASP aus Fokalen Kontakten. Eine VASP-Mutante, in der alle drei Phosphorylierungsstellen zu Alanin mutiert wurden, lokalisiert jedoch weiterhin in Fokalen Kontakten (Smolenski *et al.*, 2000). In Endothel- und Epithelzellen wandert VASP nach Phosphorylierung in Zell-Zell Kontakte und kolokalisiert mit dem *tight junction* Protein Zonula occludens-1 (ZO-1) (Comerford *et al.*, 2002; Lawrence *et al.*, 2002), was mit einer Reduktion

der Permeabilität einhergeht (Collard *et al.*, 2002; Comerford *et al.*, 2002; Lawrence *et al.*, 2002).

Die Phosphorylierung von Ena/VASP-Proteinen ist zudem für die ungerichtete Motilität von Fibroblasten (Loureiro *et al.*, 2002) (Abschnitt 2.5.5.) und die Motilität von Listerien in ihren Wirtszellen von essentieller Bedeutung (Geese *et al.*, 2002). Gegenüber wt-Mena und VASP erhöhen Phosphorylierung-imitierende Mutanten (Mena-DD und VASP-DDD) nach Transfektion in Ena/VASP-defiziente Zellen die Geschwindigkeit der Bakterien deutlich. Ein ähnlicher Effekt wurde nach Deletion der F-Aktin-Bindungsstelle erzielt (Geese *et al.*, 2002). Die Wirkung der Phosphorylierung-imitierender Mutanten wird möglicherweise durch die verminderte Bindung von phosphoryliertem VASP an F-Aktin (Harbeck *et al.*, 2000 und diese Arbeit) verursacht.

## **2.5. Die Funktionen von VASP**

### **2.5.1. Die Bedeutung von VASP für die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts**

Die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts reguliert wesentliche zelluläre Vorgänge wie die Thrombozyten-Aktivierung, Zell-Substrat- und Zell-Zell-Adhäsion, Änderung der Zellform sowie Motilität und Zellteilung. Für diese Prozesse ist die räumlich und zeitlich kontrollierte De- und Neupolymerisation von Aktinfilamenten erforderlich. Hierfür werden eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen und Komponenten des Zytoskeletts benötigt (Machesky, 2002; Pollard and Borisy, 2003; Vasioukhin and Fuchs, 2001).

Die Mitglieder der Ena/VASP-Proteinfamilie sind bei der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt. Sie scheinen neben WASP und dem Arp 2/3 Komplex ein entscheidender Faktor für das räumlich und zeitlich kontrollierte *Remodelling* der Mikrofilamente zu sein (Bear *et al.*, 2001). Es existieren ferner einige Hinweise, dass Ena/VASP-Proteine in die Signaltransduktionswege der kleinen GTPasen der Rho-Familie involviert sind (Abschnitt 2.6.) (Garcia Arguinzonis *et al.*, 2002; Grosse *et al.*, 2003; Krugmann *et al.*, 2001). Die Rho-GTPasen, Rho, Rac und Cdc42 regulieren die Bildung von Stressfasern, Lamellipodien und Filopodien (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Das kontrollierte Zusammenspiel dieser GTPasen ist ebenfalls entscheidend für die korrekte Reorganisation des Zytoskeletts und durch *Cross-talk* dieser Moleküle werden wichtige zelluläre Funktionen wie Adhäsion und Motilität gesteuert (Sahai *et al.*, 2001). Ebenso scheinen Ena/VASP-Proteine über ihren Einfluss auf die Aktin-Polymerisation und Reorganisation diese zellulären Eigenschaften zu regulieren (Renfranz and Beckerle, 2002).

Im Folgendem soll ein Überblick über die bisherigen Erkenntnisse von VASP und dessen Bedeutung für die Reorganisation des Zytoskeletts gegeben werden.

### **2.5.2. Die Bedeutung von VASP für die Aktin-Polymerisation**

Ena/VASP-Proteine werden oft mit einer positiven Beeinflussung der Aktin-Polymerisation von Verbindung gebracht. So beschleunigen sie die Geschwindigkeit von Listerien *in vitro* und sind essentiell für die Fortbewegung des Pathogens *in vivo* (Laurent *et al.*, 1999; Loisel *et al.*, 1999; Niebuhr *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1996) (Abschnitt 2.5.5.). Auch für die Elongation der Aktin-Schweife intrazellulärer Vesikel, die den Aktin-Schweifen von Listerien sehr stark ähneln, ist VASP erforderlich (Southwick *et al.*, 2003). In Säugerzellen lokalisiert GFP-VASP und GFP-Mena zudem an der Vorderfront sich fortbewegender, jedoch nicht an sich zurückziehender Lamellipodien. Des Weiteren korreliert die Konzentration von GFP-VASP sehr gut mit der Geschwindigkeit des Lamellipodiums (Rottner *et al.*, 1999).

Ein möglicher Mechanismus, durch den VASP die Aktin-Polymerisation verstärkt, ist die Bindung von VASP an Profilin und Profilaktin (Reinhard *et al.*, 1995a). Profilin bindet G-Aktin und fördert den Austausch von ADP zu ATP an G-Aktin, wodurch die Bindung von ATP-Aktin an die stumpfen Enden der Aktin-Filamente verbessert wird (Pollard *et al.*, 2000). Diese Hypothese wird von den Beobachtungen unterstützt, dass sowohl Ena/VASP-Proteine als auch Profilin die Motilität von Listerien in zellfreien Systemen erhöhen können (Loisel *et al.*, 1999) und dass die Rekrutierung von Profilin proportional zur intrazellulären Geschwindigkeit des Pathogens ist (Geese *et al.*, 2000).

### **2.5.3. Die Bedeutung von VASP bei der Thrombozyten-Aktivierung**

VASP-defiziente Thrombozyten zeigen *in vitro* eine erhöhte Aktivierung durch Kollagen und Thrombin sowie eine erhöhte Bindung an Fibrinogen durch das Integrin GPIIb-IIIa (Aszodi *et al.*, 1999; Hauser *et al.*, 1999).

Auch *in vivo* ist die Adhäsion von Thrombozyten an das vaskuläre Endothel unter physiologischen Bedingungen in VASP-defizienten Mäusen gegenüber Wildtyp-Tieren deutlich erhöht. Die erhöhte Adhäsion VASP-defizienter Thrombozyten an das Endothel wurde auch unter pathophysiologischen Bedingungen nach intestinaler Ischämie und bei früher Atherosklerose festgestellt. Zudem adhären VASP (-/-) Plättchen nach vaskulären Verletzungen stärker an die subendotheliale Matrix und diese Adhäsion kann in VASP-defizienten im Gegensatz zu Wildtyp-Thrombozyten nicht durch den Guanylylcyclase-Aktivator NO inhibiert werden (Massberg *et al.*, 2003).

Eine mögliche Erklärung für die Thrombozyten-inhibierende Funktion von VASP konnte durch Experimente von Bearer *et al.* (Bearer *et al.*, 2000) geliefert werden: Der Aktivierung von Thrombozyten folgt eine Änderung ihrer Form (engl.: *shape-change*), die durch Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts verursacht wird. Gelsolin fördert diesen *shape-change* durch Bindung und Auflösung von Aktin-Filamenten, wodurch Aktin-Monomere für

die erneute Polymerisation bereitgestellt werden. VASP bindet *in vitro* gleichzeitig mit Gelsolin an die stumpfen Enden von Aktin-Filamenten und hemmt dabei dessen Aktin-auflösende Funktion. Außerdem kolokalisieren VASP und Gelsolin an den Filopodien und Lamellipodien in sich ausbreitenden Thrombozyten, was eine physiologische Bedeutung der *in vitro* Daten nahe legt (Bearer *et al.*, 2000).

#### **2.5.4. Die Bedeutung von VASP für die Adhäsion**

##### **2.5.4.1. Die Bedeutung von VASP für die Zell-Substrat-Adhäsion**

Die Reorganisation des Zytoskeletts ist auch für die Integrin-Aktivierung nach der Aktivierung von T-Zellen essentiell. VASP stellt über die Bindung an das Adaptorprotein ADAP/FYB/SLAP ein mögliches Bindeglied zwischen dem T-Zell-Rezeptor und dem Aktin-Zytoskelett dar (Griffiths and Penninger, 2002a; Griffiths and Penninger, 2002b; Krause *et al.*, 2000). Auch bei der Phagozytose von Makrophagen kolokalisiert VASP mit ADAP/FYB/SLAP an den Phagosomen und wird für die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, die Ausbildung von Pseudopodien und die effiziente Partikel-Internalisierung benötigt (Coppolino *et al.*, 2001).

Auch in Dictyostelium wird die Substrat-Adhäsion scheinbar durch VASP beeinflusst. So wird der Chemotaxis-Defekt in VASP-defizienten Zellen unter anderem durch verringerte Adhäsion dieser Zellen verursacht (Han *et al.*, 2002).

##### **2.5.4.2. Die Bedeutung von VASP für die Ausbildung von Zell-Zell Kontakten und die Kontrolle von Permeabilität**

Ena/VASP-Proteine sind des Weiteren entscheidend für die Ausbildung von Zell-Zell Kontakten (Renfranz and Beckerle, 2002; Vasioukhin *et al.*, 2000; Vasioukhin and Fuchs, 2001). Die Bildung von Zell-Zell Kontakten in sich differenzierenden Keratinozyten benötigt die durch  $\text{Ca}^{2+}$  ausgelöste, Cadherin-abhängige Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und F-Aktin Polymerisation. Nach Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  zu kultivierten murinen Keratinozyten bilden die Zellen schnell Filopodien aus. Die Filopodien benachbarter Zellen gleiten Reißverschluss-ähnlich aneinander entlang, um dann in Form von Membrantaschen in die gegenüberliegende Zelle einzudringen. Die Kontaktstellen der Spitze der Filopodien mit dem Boden der Taschen bilden sogenannte *puncta*, die im Laufe der Zeit die *Adherens junctions* ausbilden. Die *puncta* enthalten unter anderem E-Cadherin, Mena und VASP, wobei letztere bei der Reorganisation des F-Aktin Zytoskeletts in den entstehenden *Adherens junctions* eine Rolle spielen könnten. Transfektion von dominant negativen, C-terminalen VASP Fragmenten verhindert die Bildung der Zell-Zell Kontakte (Renfranz and Beckerle, 2002; Vasioukhin *et al.*, 2000; Vasioukhin and Fuchs, 2001).

Das Aktin-Zytoskelett beeinflusst desweiteren die dynamischen Veränderungen der endothelialen und epithelialen Permeabilität. Auch mit der Regulation dieser Prozesse wird VASP in Verbindung gebracht. So korreliert die Reduktion der Permeabilität mit der PKA-abhängigen Phosphorylierung von VASP (Collard *et al.*, 2002; Comerford *et al.*, 2002; Lawrence *et al.*, 2002). Nach Phosphorylierung wandert VASP in Zell-Zell Kontakte und kolokalisiert mit dem *tight junction* Protein Zonula occludens-1 (ZO-1) (Comerford *et al.*, 2002; Lawrence *et al.*, 2002). Für das Wiedererlangen der Barriere spielen die Tetramerisierungs- und F-Aktin-Bindungs-Domänen von VASP eine Rolle (Comerford *et al.*, 2002; Lawrence *et al.*, 2002).

### **2.5.5. Die Bedeutung von VASP für die Motilität**

#### **2.5.5.1. Die Bedeutung von VASP für die Motilität von *Listeria monocytogenes***

Über die Bindung an das Listerien Oberflächenprotein ActA beschleunigen Ena/VASP-Proteine die Motilität dieses Pathogens sowohl in infizierten Zellen als auch in zellfreien Extrakten (Laurent *et al.*, 1999; Loisel *et al.*, 1999; Niebuhr *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1996). Ena/VASP-Proteine werden für Ausbildung ausreichend langer Aktin-Schweife an *Listeria monocytogenes* benötigt und die Geschwindigkeit der Bakterien korreliert direkt mit dem Expressionslevel sowohl von Mena als auch VASP (Geese *et al.*, 2002). Ferner ist die Phosphorylierung von Ena/VASP-Proteinen für die Motilität von Listerien in ihren Wirtszellen von essentieller Bedeutung (Geese *et al.*, 2002). Phosphorylierung-imitierende Mutanten (Mena-DD und VASP-DDD) erhöhten die Geschwindigkeit des Pathogens gegenüber wt-Mena und wt-VASP deutlich. Da ein ähnlicher Effekt auch nach Deletion der F-Aktin-Bindungsstelle verursacht wurde (Geese *et al.*, 2002), ist zu vermuten, dass die verminderte F-Aktin-Bindung von phosphoryliertem VASP (Harbeck *et al.*, 2000 und diese Arbeit) die erhöhte Listerien-Geschwindigkeit verursacht.

ActA besitzt eine G-Aktin Bindungsstelle, die *in vitro* für die Arp2/3 abhängige Aktin-Nukleation benötigt wird. Die G-Aktin-Bindungsstelle ist jedoch entbehrlich für die Aktin-Nukleation in Zellen und kann durch VASP und dessen Bindung an Profilin und Profilaktin kompensiert werden. *In vitro* erhöht VASP die Aktin-Nukleations-Aktivität von ActA und Arp2/3 und verringert gleichzeitig die Verzweigung der Aktin-Schweife (Skoble *et al.*, 2001).

#### **2.5.5.2. Die Bedeutung von VASP für die Motilität von Zellen**

Motilität von Zellen beruht auf dem räumlich und zeitlich kontrollierten Zusammenspiel von Adhäsion und Aktin-Polymerisation. Die Aktin-Polymerisation ist die treibende Kraft, die die Plasmamembran vorschiebt. Außerdem benötigen die Zellen an ihrer



Front neue Kontakte zur extrazellulären Matrix (Fokale Komplexe), um die Fortbewegung relativ zum Substrat zu gewährleisten. Während sich an der Vorderfront neue Adhäsions Komplexe bilden, müssen am hinteren Ende der Zelle Fokale Kontakte kontrolliert wieder aufgelöst werden (Pollard and Borisy, 2003).

Aktin-Polymerisation ohne Verbindung zur ECM führt somit nicht zur Fortbewegung von Zellen. Bear *et al* (Bear *et al.*, 2000) beobachteten, dass Ena/VASP-defiziente Zellen sich schneller ungerichtet fortbewegten als Wildtyp-Zellen. Sie entdeckten ferner, dass Ena/VASP-Proteine *in vitro* an die stumpfen, schnell wachsenden F-Aktin Enden binden und hierdurch als Anti-Capping-Proteine wirken (Bear *et al.*, 2002). Capping-Proteine sind F-Aktin bindende Proteine, die die weitere Polymerisation an den stumpfen Enden hemmen und das Auseinanderbrechen und die Depolymerisation der Filamente fördern. Möglicherweise sind durch diesen Mechanismus Aktin-Strukturen in Lamellipodien bei Anwesenheit von Ena/VASP länger und weniger verzweigt als in Zellen, denen Ena/VASP-Proteine fehlen (Bear *et al.*, 2002). Lamellipodien von Ena/VASP-defizienten Zellen strecken sich langsamer, aber anhaltender vor als dieselben Zellen nach Reexpression von Mena oder VASP (Bear *et al.*, 2002).

Im Gegensatz dazu führt die Überexpression von Mena und VASP dosisabhängig zur langsameren Fortbewegung von Rat2 Fibroblasten. Insbesondere Mena/VASP-Konstrukte, die über eine CAAX-Box an die Plasmamembran binden, reduzieren die Geschwindigkeit. FP<sub>4</sub>-Konstrukte, die Ena/VASP-Proteine an die Mitochondrienmembran lokalisieren, erhöhen wiederum die ungerichtete Motilität der Zellen. Dagegen beeinflusst die selektive Delokalisation aus Fokalen Kontakten mit Hilfe cytosolischer FP<sub>4</sub>-Konstrukte die Motilität nicht. Des Weiteren bewegen sich Mena/VASP-defiziente Fibroblasten schneller fort als nach Reexpression von Mena und VASP in denselben Zellen (Bear *et al.*, 2000).

Detaillierte Analysen mit Hilfe verschiedener Mena-Mutanten ergaben, dass für die Reduktion der Zell-Geschwindigkeit Ena/VASP-defizienter Zellen die Phosphorylierung des konservierten Serins (Ser157 in humanem VASP und Ser236 in murinem Mena) und die F-Aktin Bindung von entscheidender Bedeutung sind. Allein die Expression der EVH2-Domäne verringert die Zell-Motilität, wohingegen die PRR und damit die Bindung von Profilin und Profilaktin keinen Einfluss ausüben (Loureiro *et al.*, 2002).

VASP-defiziente kardiale Fibroblasten sind aufgrund größerer Lamellipodien ausgebreiteter und flacher als die entsprechenden wildtyp Zellen (Garcia Arguinzonis *et al.*, 2002). Dieser Phänotyp entsteht aufgrund einer verlängerten Aktivität der kleinen GTPase Rac, die die Ausbildung von Lamellipodien reguliert, und seines Signaltransduktionsweges über Pak (engl.: *p21 activated kinase*). Des Weiteren zeigen VASP-defiziente Fibroblasten Defekte in der gerichteten Zellmigration in einem sogenannten Wund-Heilungs-Assay. VASP (+/+) Zellen orientieren sich nach einem Kratzer in einem konfluenten Zellrasen parallel zur

Wunde, wohingegen VASP (-/-) Fibroblasten unfähig sind, ihr Aktin-Zytoskelett zu reorganisieren und sich parallel zur Wunde auszurichten. Obwohl beide Zelllinien in der Lage sind, die Wunde im selben Zeitraum zu schließen, geschieht dies auf unterschiedliche Art und Weise: VASP (+/+) Fibroblasten wandern in die Wunde ein, indem sie sich von den Nachbar-Zellen lösen, aktive frontale Lamellipodien bilden, die Zell-Enden vom Substrat ablösen und zurückziehen. In VASP-defizienten Zellen wandern lediglich frontale Lamellipodien in die Wunde ein. Die Zellen bewegen sich jedoch nicht fort, da sich die Zell-Enden nicht vom Substrat ablösen. Die Wunde wird schließlich durch Zellteilungen aufgefüllt. Diese Effekte sind VASP-abhängig, da die Reexpression von VASP in VASP-defizienten Fibroblasten zum Wiedererlangen des VASP (+/+)-Phänotyp führte (Garcia Arguinzonis *et al.*, 2002).

Neben den Lamellipodien sind auch Filopodien bei der Zellmotilität von entscheidender Bedeutung. Filopodien sind Finger-förmige Membranausstülpungen, in denen die langen und parallelen Aktin-Filamente in Bündel organisiert sind. VASP (und auch Mena) spielt auch bei der Ausbildung von Filopodien eine entscheidende Rolle. Versuche von Svitkina *et al.* (Svitkina *et al.*, 2003) zeigten, dass Filopodien nicht durch Nukleation, sondern durch Reorganisation des dendritischen Netzwerk von Lamellipodien entstehen. VASP und Mena sind -im Gegensatz zu dem Arp2/3 Komplex- frühe Marker für die Entstehung von Filopodien. Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass Ena/VASP-Proteine über Interaktion mit den (+)-Enden der Aktin-Filamente, die das *Capping* verhindert, die Verbindung mehrerer (+)-Enden miteinander vermitteln, wodurch Filopodien entstehen (Svitkina *et al.*, 2003).

## **2.6. Die Rolle von VASP in Signaltransduktionswegen der kleinen Rho GTPasen**

Aus der Familie der kleinen Rho GTPasen sind die drei Mitglieder Rho, Rac und Cdc42 am besten charakterisiert. Hierbei reguliert Rho über seine Effektoren Rho Kinase und mDia (engl.: *mammalian Diaphanus*) die Bildung von Stressfasern. Die Rho Kinase erhöht dabei die Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins (engl.: *myosin light chain*, MLC) direkt durch Phosphorylierung der MLC und indirekt durch Phosphorylierung und Inhibition der MLC-Phosphatase (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Die kleine GTPase Rac kontrolliert die Ausbreitung von Lamellipodien, wobei der p21-aktivierten Kinase (Pak) eine wichtige Bedeutung zukommt. Cdc42 reguliert die Ausbildung von Filopodien (Etienne-Manneville and Hall, 2002).

Kleine GTPasen existieren in einer inaktiven, GDP-gebundenen und einer aktiven, GTP-gebundenen Form, die spezifisch mit den Effektoren interagiert. Der Austausch der GDP- zur GTP-gebundenen Form erfolgt nach Stimulation verschiedener Rezeptoren durch sogenannte Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (engl.: *guanine nucleotide exchange factors*, GEF). Die geringe intrinsische Hydrolyse-Aktivität der GTPasen wird durch GTPasen aktivierende Proteine (GAP) erhöht (Etienne-Manneville and Hall, 2002).

Es existieren einige Hinweise, dass Ena/VASP-Proteine in die Signaltransduktionswege der kleinen GTPasen der Rho-Familie involviert sind (Garcia Arguinzonis *et al.*, 2002; Krugmann *et al.*, 2001). Die kleine GTPase Cdc42 induziert die Ausbildung von Filopodien über die synergistische Interaktion von Mena mit IRSp53 (Krugmann *et al.*, 2001).

Einen direkten Zusammenhang zwischen VASP und den Signalwegen der kleinen GTPase Rac konnten García Arguinzonis *et al.* (Garcia Arguinzonis *et al.*, 2002) zeigen: Die Abwesenheit von VASP in kardialen Fibroblasten führt zur verstärkten und verlängerten Aktivität von Rac und dessen Effektor Pak. Dies erklärt den stärker ausgebreiteten Phänotyp dieser Zellen (Garcia Arguinzonis *et al.*, 2002).

Erst kürzlich konnte eine direkte Bindung von VASP an den RhoA-Effektor mDia gezeigt werden. Die Interaktion von VASP und mDia spielt bei der VASP-induzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors SRF (engl.: *serum response factor*) eine wichtige Rolle (Grosse *et al.*, 2003).

## **2.8. Aufgabenstellung**

Zu Beginn dieser Arbeit war über die Funktion des Aktin-bindenden Proteins VASP noch wenig bekannt. Der Einfluss des Proteins auf verschiedene zelluläre Funktionen zeichnete sich nur ansatzweise ab.

Ziel dieser Arbeit war es daher, weitere funktionelle Eigenschaften des Zytoskelett-assoziierten Proteins VASP zu charakterisieren. Im Einzelnen sollte die Phosphorylierungsabhängigkeit der direkten Interaktion von VASP mit F-Aktin und ein möglicher Beitrag von VASP zur Regulation von Signalwegen untersucht werden. Ferner sollte die Bedeutung von VASP für den Aufbau, die Organisation und Stabilität des Aktin-Zytoskeletts sowie die mechanischen Eigenschaften der Plasmamembran erforscht werden. Auch die Klärung der Frage, welche Bedeutung VASP in Verbindung mit dem Aktin-Zytoskelett für die zelluläre Adhäsion hat, war Gegenstand dieser Arbeit.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Bakterien (E. coli)

##### 3.1.1.1. Bakterien-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz	Verwendungszweck
XL-1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac<sup>-</sup> F'[proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔ M15 Tn10(tet<sup>R</sup>)]</i>	(Bullock <i>et al.</i> , 1987)	Klonierung
BL21 (DE3)	<i>hsdS gal (λc lts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)</i>	(Studier and Moffatt, 1986)	Expression rekombinanter Proteine

##### 3.1.1.2. Medien und Agarplatten für Bakterien

Trypton (Bacto Tryptone) und Hefe-Extrakt wurden von der Firma Becton Dickinson bezogen.

##### LB-Medium

1 % (w/v) Trypton  
 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt  
 1 % (w/v) NaCl  
 in dH<sub>2</sub>O

##### 2 x YT-Medium

1,6 % (w/v) Trypton  
 1 % (w/v) Hefe-Extrakt  
 0,5 % (w/v) NaCl  
 in dH<sub>2</sub>O

Zum Gießen von Agarplatten wurden 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

### 3.1.1.3. Zusätze für Medien und Agarplatten

#### verwendete Endkonzentrationen:

100 µg/ml	Ampicillin
25 µg/ml	Kanamycin
1 mM	IPTG

#### Stammlösungen:

100 mg/ml	in 50 % Ethanol
50 mg/ml	in dH <sub>2</sub> O, sterilfiltriert
1 M	in dH <sub>2</sub> O, sterilfiltriert

Die Stammlösungen wurden bei – 20°C gelagert.

Die Zugabe der Antibiotika und anderer Zusätze erfolgte jeweils nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums bzw. des Agars auf ca. 45 °C oder durch Verteilen der entsprechenden Medienzusätze auf eine feste Agarplatte.

### 3.1.2. Kulturzellen

#### PtK<sub>2</sub>-Zellen (ATCC CCL-56)

Diese epitheliale Zelllinie aus der Niere der Beutelratte wurde von Herrn Prof. Dr. Wehland (GBF Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

#### Kardiale Maus-Fibroblasten (MCFB)

Diese Fibroblasten-Zelllinie aus VASP (+/+) bzw. VASP (-/-) Mäusen wurde von Maísa García Arguinzonis aus unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt (Garcia Arguinzonis *et al.*, 2002).

#### Mesangiumzellen

Diese Primärzellen wurden wie im Abschnitt 3.2.3.2. beschrieben gewonnen und kultiviert.

#### Humane Fibroblasten

Diese Zellen wurden mir freundlicherweise von Dr. Albert Smolenski aus unserer Arbeitsgruppe überlassen.

Die Kulturbedingungen sind im Abschnitt 3.2.3.1. beschrieben.

#### 3.1.2.1. Puffer, Lösungen, Medien und Seren für die Zellkultur

Die aufgeführten Produkte wurden, falls nicht anders angegeben, von der Firma Invitrogen bezogen:

- *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM, mit 4,5 g/l Glukose)

- RPMI 1640 mit stabilem Glutamat
- Fötale Kälberserum (FCS)
- Dulbecco-PBS
- Trypsin und Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin; 0,2 g/l EDTA)
- ITS (10 mg/l Insulin, 5,5 mg/l Transferrin, 5 ng/l Natrium Selenit)
- Antibiotikum/Antimykotikum (0,1 U/l Penicillin, 0,1 µg/l Streptomycin, 0,25 ng/l Amphotericin B)

### 3.1.3. Vektoren und Plasmide

#### 3.1.3.1. Vektoren

Vektor	Resistenz	Bezugsquelle	Verwendungszweck
pcDNA3	Amp <sup>r</sup>	Invitrogen	eukaryotische Expression
pQE-30	Amp <sup>r</sup>	QIAGEN	prokaryotische Expression
pREP4	Kan <sup>r</sup>	QIAGEN	Repressorplasmid für Expression mit pQE-30
pRK5myc	Amp <sup>r</sup>	A. Hall, London	eukaryotische Expression

#### 3.1.3.2. Plasmide

Plasmid (Bezeichnung)	Ausgangsplasmid	Beschreibung des Inserts	Quelle
pcD-VASP (wt-VASP oder SST-VASP)	pcDNA3	<i>Full-lengths</i> -VASP mit N-terminalem VSV-tag	C. Bachmann, gleiche Arbeitsgruppe
pcD-VASP S157A (AST-VASP)	pcDNA3	s. o. mit Mutation Ser157Ala	C. Bachmann, gleiche Arbeitsgruppe
pcD-VASP S239A (SAT-VASP)	pcDNA3	s. o. mit Mutation Ser239Ala	C. Bachmann, gleiche Arbeitsgruppe
pcD-VASP T278A (SSA-VASP)	pcDNA3	s. o. mit Mutation Thr278Ala	C. Bachmann, gleiche Arbeitsgruppe
pcD-VASP S157A, S239A, T278A (AAA-VASP)	pcDNA3	s. o. mit Mutation Ser157Ala, Ser239Ala und Thr278Ala	A. Smolenski, gleiche Arbeitsgruppe

---

## Material und Methoden

---

pRK5myc RhoA (wt-RhoA)	pRK5myc	humanes wt-RhoA	A. Hall, London
pRK5myc T19N (dnRhoA)	pRK5myc	humanes, dominant negatives RhoA	A. Hall, London

### 3.1.4. Chemikalien

8CPT-2Me-cAMP	BioLog
8p-CPT-cGMP	BioLog
BSA	Sigma
Collagenase IV	Sigma
Complete mini (EDTA-free) Proteasen Inhibitor	Roche Diagnostics
Coomassie Brilliant Blau R250	BioRad
Fibronectin	Sigma
FuGENE™	Roche Diagnostics
ITS	Sigma
Kreuzvernetzer: Sulfo-SMCC	Pierce
Milchpulver	Biorad
Mowiol 4-88	Hoechst
n-Propylgallat	Sigma
Ponceau S	Sigma
Sigmacote (Silikonisierlösung)	Sigma
Texas-Red Ovalbumin	Molecular Probes

Alle anderen, nicht aufgelisteten Chemikalien wurden in der Regel von den Firmen Sigma, Roche Diagnostics, Serva oder Roth bezogen.

### 3.1.5. Peptide

Die Block B Peptide wurden von Sigma Genosys bezogen und entsprechen den AS 259-283 von humanem VASP.

Dephospho-Peptid: GGGGLMEEMNAMLARRRKATQVGEC

Phospho-Peptid: GGGGLMEEMNAMLARRRKA[pThr]QVGEC



### 3.1.6. Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software

#### 3.1.6.1. Verbrauchsmaterialien

Dialyseschläuche	Visking 20/32 (Roth)
Dialysekassetten	Slide-A-Lyser (Pierce), MWCO 10 kDa
Röntgenfilme	X-OMAT AR (Kodak) ; Medical Film (Konica)
Gel Blotting Papier	Schleicher & Schüll
Gelfiltrationssäulen	PD-10 (Amersham Pharmacia Biotech)
Hi-Trap™ Chelatsäulen (1 ml)	Amersham Pharmacia Biotech
Kryoröhrchen	Nunc
Mikrokonzentratoren (Centricon und Microcon für die Konzentrierung von Proteinen)	Amicon
Nitrocellulose für Western Blots (Porengröße 0,45 µm)	Schleicher & Schüll
Sterilfilter (Millex-GV)	Schleicher & Schüll

#### 3.1.6.2. Antikörper

##### a) Primärantikörper

Bezeichnung	Ref./Quelle	Antigen	Epitop	Typ	Herkunft	Konzentration	
						IF	WB
M4	(Halbrugge <i>et al.</i> , 1990)	VASP	-----	polyklonal	Kaninchen	1:750	1:1500
M5, AS 83-1	(Reinhard <i>et al.</i> , 1995b)	Zyxin	-----	polyklonal	Kaninchen	1:750	
Anti-RhoA sc418	Santa Cruz Biotechnology	humanes RhoA	AS 120-150	monoklonal affinitäts-gereinigt	Maus	1:100	1:500
Anti-MLC (A20) sc-9449	Santa Cruz Biotechnology	humane MLC	-----	polyklonal affinitäts-gereinigt	Ziege		1:400
Anti-P-MLC sc-12896	Santa Cruz Biotechnology	humane MLC	P-S18, P-T19	polyklonal Affinitäts-gereinigt	Ziege		1:400
Anti-Aktin	Sigma	Aktin	-----	polyklonal	Kaninchen		1:1000
Anti-Ovalbumin	Sigma	Ovalbumin	-----	polyklonal	Kaninchen		1:1000

Anti- $\beta$ -Tubulin	Sigma	$\beta$ -Tubulin	-----	monoklonal	Maus	1:200	
------------------------	-------	------------------	-------	------------	------	-------	--

### b) Sekundärantikörper

#### Sekundärantikörper für Western Blot

Antikörper	Markierung	Quelle	Verdünnung
Maus-anti-Ziege IgG	Meerrettich-Peroxidase	Dianova	1:5000
Esel-anti-Maus	Meerrettich-Peroxidase	Dianova	1:5000
Esel-Anti-Kaninchen	Meerrettich-Peroxidase	Dianova	1:5000

#### Sekundärantikörper und fluoreszenzmarkierte Phalloidine für die Immunfluoreszenz

Die verschiedenen fluoreszenzmarkierten anti-Maus- und anti-Kaninchen-Antikörper wurden von Dianova oder Molecular Probes/MoBiTec bezogen.

Die eingesetzten Verdünnungen richteten sich nach der Art des Fluoreszenzfarbstoffs und wurden für die Verwendung mit den einzelnen Primärantikörpern individuell angepasst (Cy3: 1:200-1:400; Cy2: 1:150-1:300). Die Antikörper-Stammlösungen hatten eine Konzentration von 1,2-1,5 mg/ml.

*Oregon-Green*- und Rhodamin-markiertes Phalloidin wurden von Molecular Probes/MoBiTec bezogen, in einer Verdünnung von 200 U/ml (6,6  $\mu$ M) in Methanol bei -20 °C aufbewahrt und für die Immunfluoreszenz nochmals 1:30-1:50 in PBS verdünnt.

#### 3.1.6.3. Geräte

<i>Blot</i> -Kammer	Fast Blot B33 (Biometra)
Bakterien-Brutschränke	Heraeus
Zellkultur-Brutschränke	Labotect
CCD Video Kamera Modul	XC-ST70
Elektrophoresekammern für Polyacrylamid-Minigele	Spezialanfertigung der Fa. Noras, Würzburg
Feinwaagen	Analytic LC 4800 P und Analytic AC 120 S (Sartorius)
FPLC-Anlage	Controller LCC-500 Plus, Kolbenpumpen P-500, Motor-Ventil MV-7, Mischer (5 MPa), Variable Wavelength Monitor Modell 2141 (alle Geräte: Amersham Pharmacia Biotech)
Gelfiltrationssäulen	HiLoad 16/60 Superdex 75 <i>prep grade</i>

---

## Material und Methoden

---

	HiLoad 16/60 Superdex 200 <i>prep grade</i> (Amersham Pharmacia Biotech)
Geltrockner	Drygel Sr. Modell SE 1160 (Hoefer Scientific Instruments)
Mikromanipulator	Leitz
Mikroskope: Zellkultur	Axiovert 25, Zeiss
Fluoreszenz	Axiovert 200, Zeiss
Optische Pinzette	Axiovert 135, Zeiss
pH-Meter	PHM 92 LAB pH Meter (Radiometer)
Rasterkraftmikroskop	Bioscope/Nanoscope III (Digital Instruments)
Röntgenfilm-Entwickler	X-OMAT M35 (Kodak)
Schüttler	Biometra
Spannungsgeräte	Gene Power Supply GPS 200/400 (Amersham Pharmacia Biotech)
Speed Vac	Speed Vac® Plus SC 110A (Savant)
Spektrophotometer	Ultrospec 2000 (Amersham Pharmacia Biotech)
Thermomixer	Eppendorf 5436
Ultraschallgerät	Branson Sonifier 250
Vortex	Vortex Genie 2 (Scientific Industries)
Zellzähler	Casy® Cell counter (Schäfer System)
Zentrifugen/Rotoren	Eppendorf Tischzentrifuge 5415C Eppendorf 5804 R Sorvall RC5B und Sorvall RC5B Plus mit den Rotoren GSA und SS-34 Beckmann L-80 Ultrazentrifuge mit den Rotoren SW 55Ti und 50.2 Ti

### 3.1.6.5. Software

#### **Bildbearbeitung:**

MetaMorph Version 4.6

#### **Zellzähler:**

Casy® 1 and Casy® Stat Version 2.1; Schärfe System GmbH

### 3.2. Methoden

#### 3.2.1. Proteinbiochemie

##### 3.2.1.1. Gelelektrophorese von Proteinen

Für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurden 9 x 15 cm Minigele einer Dicke von 1 mm verwendet.

##### a) Denaturierende Gel-Elektrophorese nach (Laemmli, 1970)

###### I. Präparation der Minigele

Für die Analyse von Proteinen wurden 8-15% vertikale SDS-Polyacrylamidgele verwendet, die aus einem entsprechenden Trenngel und einem konstant 4 % Sammelgel bestanden:

4 x Trenngelpuffer	5 ml	4 x Sammelgelpuffer	2.5 ml
Acrylamidlösung (30/0,8)	6,7 ml	Acrylamidlösung (30/0,8)	1,3 ml
dH <sub>2</sub> O	8,2 ml	dH <sub>2</sub> O	6,2 ml
TEMED	20 µl	TEMED	20 µl
APS (10 %)	100 µl	APS (10 %)	30 µl

Nach Zugabe von TEMED und APS wurde die Trenngel-Lösung kurz gemischt und zwischen zwei senkrecht stehenden Glasplatten gegossen, die von *spacern* auseinander gehalten wurden. Die Trenngel-Lösung wurde zur Glättung vorsichtig mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet, das nach der Polymerisation wieder entfernt wurde. Die Sammelgel-Lösung wurde auf das polymerisierte Trenngel gegossen und der Kamm für die Ausformung der Taschen eingesetzt.

###### Lösungen:

###### 4 x Trenngelpuffer

1,5 M Tris (pH 8,8)

0,4 % SDS

###### 4 x Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris (pH 6.8)

0,4 % SDS

###### Acrylamidlösung (30/0,8)

30 % (w/v) Acrylamid

0,8 % (w/v) Bisacrylamid

###### APS (10 %)

10 % APS (w/v) in dH<sub>2</sub>O

###### II. Elektrophorese

Nach der Polymerisation des Sammelgels wurden der Kamm und der untere *spacer* entfernt, die Gele in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und die Pufferkammern mit 1 x Glycinpuffer befüllt. Die zu analysierenden Proteinproben wurden mit ½ Volumen 3 x

Probenpuffer versetzt und vor dem Laden 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100-150 V und wurde beendet, wenn das Bromphenolblau des Probenpuffers das Gel-Ende erreicht hatte.

### Lösungen:

#### 1 x Glycinpuffer:

25 mM Tris (pH 8,9)

192 mM Glycin

0,1 % SDS

#### 3 x Probenpuffer (reduzierend):

200 mM Tris/Cl (pH 6,7)

6 % (w/v) SDS

15 % (w/v) Glycerin

10 % 2-Mercaptoethanol

0,2 % Bromphenolblau (Na-Salz)

### b) Zweidimensionale Gelelektrophorese

Für die zweidimensionale Gelelektrophorese wurden adhärenente Zellen wie angegeben behandelt und anschließend mit reduzierendem 3 x Probenpuffer mit Hilfe eines Zellschabers geerntet. Parallel wurde eine Schale zur Proteinbestimmung verwendet (Abschnitt 3.2.1.11.). Anschließend wurden die Proteine mit Methanol-Chloroform nach der Methode von Wessel und Flügge (Wessel and Flugge, 1984) gefällt (Abschnitt 3.2.1.2.)

#### I. Erste Dimension: Auftrennung von Proteinen anhand ihres isoelektrischen Punktes

Die isoelektrische Fokussierung der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurde mit der Protean® IEF cell von Biorad nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. 100 µg gefälltes Zellextrakt wurden in 350 µl Lysepuffer gelöst und auf 17 cm immobilisierte IPG Streifen (Biorad), pH 3-10 (linear) durch aktive Rehydrierung für 12 – 24 h bei 50 V und 20 °C aufgetragen. Die Fokussierung wurde wie folgt durchgeführt:

30 min	250 V
30 min	500 V
5 h	500 – 4000 V (linear)
16 h	4000 V

#### II. Zweite Dimension: Auftrennung der Proteine anhand ihres Molekulargewichts

Anschließend wurden die Streifen jeweils 15 min nacheinander in Waschpuffer 1 und 2 inkubiert und sofort auf vertikale 15 %ige SDS-Gele aufgelegt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf Nitrocellulose transferriert (*Semi-dry Western Blot*) und mit einem anti-MLC Antikörper immunodetektiert.

**Lysepuffer:**

7 M	Harnstoff
2 M	Thioharnstoff
4 %	(w/v) CHAPS
15 mM	DTT
0,5%	Trägerampholyte, pH 3-10
10 nM	Okadasäure

**Waschpuffer 1:**

50 mM	Tris/Cl, pH 8,9
6 M	Harnstoff
30 %	Glycerin
2 %	SDS
100 µg/ml	DTT

**Waschpuffer 2:**

50 mM	Tris/Cl, pH 8,9
6 M	Harnstoff
30 %	Glycerin
2 %	SDS
200 µg/ml	Jodessigsäure

**3.2.1.2. Methanol-Chloroform Proteinfällung**

150 µl SDS-Zellysate wurden mit 600 µl Methanol, 150 µl Chloroform und 450 µl H<sub>2</sub>O versetzt, kräftig gemischt und 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen, verworfen und zu der organischen Phase wurden 450 µl Methanol gegeben. Der Ansatz wurde erneut gemischt und 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Proteinsediment einige Minuten an der Luft getrocknet. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C (Wessel and Flugge, 1984).

**3.2.1.3. Coomassie Blau-Färbung von Proteingelen**

Proteingele wurden zur Färbung mit Coomassie® Brilliant Blau mindestens 1 h in Färbelösung inkubiert. Ungebundener Farbstoff wurde mit Entfärbelösung ausgewaschen.

**Färbelösung:**

10 %	Isopropanol
10 %	Essigsäure
0,04 %	Coomassie® Brilliant Blau R 250

**Entfärbelösung:**

10 %	Isopropanol
10 %	Essigsäure

**3.2.1.5. Trocknung von Gelen**

Um ein angefärbtes Polyacrylamidgel aufzubewahren, wurde es beidseitig mit feuchter Zellophanfolie bedeckt und auf einem Geltdrockner zwischen je zwei Lagen *Whatman*papier

getrocknet. Je nach Größe und Dicke des Gels beträgt die Trockenzeit 1,5 - 3 h bei 60 -80 °C.

### **3.2.1.6. Immunomarkierung spezifischer Proteine (*Western Blot*)**

#### **a) Transfer**

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurde das Gel zwischen zwei in Transferpuffer vorgequollene *Blotting*-Papiere luftblasenfrei auf eine gleichgroße Nitrocellulosemembran gelegt. Dieser Stapel wurde so auf den *Semi-dry-Blotter* gelegt, dass die Nitrocellulose zur Anode zeigte.

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf die Nitrocellulosemembran erfolgte für 30-45 min mit einer Stromstärke von 2 mA/cm<sup>2</sup> und einer Spannung ≤ 25 V. Bei einem Anstieg der Spannung > 25 V wurde die Stromstärke reduziert und die Transferdauer entsprechend verlängert (Towbin *et al.*, 1979).

#### **Transferpuffer:**

25 mM	Tris, pH 8,3
150 mM	Glycin
10 %	Methanol

#### **b) Anfärbung von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen**

Nach dem Transfer wurden die Membranen zur Überprüfung der Transfereffizienz und zur Markierung des Molekulargewichts-Standards mit 0,1 % (w/v) Ponceau S in 5 % (v/v) Essigsäure kurz angefärbt und der Hintergrund mit deionisiertem Wasser entfärbt. Zur Dokumentation wurde die gefärbte *Blot*-Membran fotokopiert.

#### **c) Entwicklung des Blots mit Antikörpern**

Nach der Dokumentation wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation in Blockmedium für 1 h bei RT abgesättigt. Die geblockte Membran wurde mit in *Blot*-Medium verdünnten Antiseren oder Antikörpern mindestens 45 min bei RT inkubiert. Ungebundener Primärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen (je 5 -10 min) mit PBS-TT entfernt. Der Nachweis des gebundenen Antikörpers erfolgte durch einen mit Meerrettich-Peroxidasegekoppelten Zweitantikörper und eine Chemilumineszenz-Reaktion. Bei diesem Verfahren wird die Lumineszenz, die bei der Peroxidase-katalysierten Oxidation eines zyklischen Diazylhydrazids (Luminol) durch Wasserstoffperoxid entsteht, zum Nachweis des an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpers genutzt. Nach 1 h Inkubation bei RT mit dem in *Blot*-Medium verdünnten (1:5000) Sekundärantikörper und dreimaligen Waschen in PBS-TT für je 5-10 min wurde die Nitrocellulose für 1 min mit Detektionsmix

inkubiert, nach Abtropfen der Lösung zwischen zwei Folien gelegt, glattgestrichen und sofort für einige Sekunden bis zu wenigen Minuten auf einem Autoradiographie-Film exponiert.

**Lösungen:**

**PBS-TT:**

0,025 % (v/v) Tween-20  
0,15 % (v/v) Triton X-100  
in PBS

**Blockmedium:**

4 % (w/v) fettfreie Trockenmilch  
in PBS-TT

**Blot-Medium:**

4 % (w/v) fettfreie Trockenmilch  
in PBS

**Detektionsmix:**

25 % (v/v) ECL (*enhanced chemoluminescence*)-Reagenz 1 (Luminol)  
25 % (v/v) ECL-Reagenz 2 (*enhancer*)  
50 % (v/v) dH<sub>2</sub>O

**3.2.1.7. Überexpression und Affinitätsreinigung von rekombinanten „His-tag“-VASP mit dem „QIAexpress-System“ (Qiagen)**

Das „QIAexpress“-System ermöglicht eine effiziente Überexpression von rekombinanten Proteinen („His-tag“-Fusionsproteine) in *E. coli*, die sich anschließend durch Affinitätschromatographie mit Nickel-NTA-(*nitrilotriacetic acid*)-Agarose reinigen lassen. Die sechs Histidinreste des Fusionsproteins binden mit hoher Affinität an die zwei freien der insgesamt sechs Chelatbindungsstellen der Ni<sup>2+</sup>-Ionen, unspezifisch bindende Proteine werden durch stringente Waschbedingungen von der Säule entfernt. Die Elution des an der Säule bindenden Fusionsproteins erfolgt durch eine kompetitive Verdrängung durch Imidazol, das dem Histidin strukturell sehr ähnlich ist. Somit können „His-tag“-Fusionsproteine in einer sehr reinen Form isoliert werden.

Der hier verwendete Expressionsvektor pQE-30 trägt neben dem T5-Promoter und einer synthetischen Ribosomenbindungsstelle (RBSII) noch zwei *lac*-Operatorsequenzen, die eine optimierte und regulierbare Promoter/Operator-Region darstellen. Die Expression der vom rekombinanten Vektor pQE-30 kodierten Fusionsproteine erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3), welcher mit dem Repressorplasmid pREP4 transformiert worden war. Dieses Plasmid exprimiert konstitutiv das *lacI*-Gen, welches für den *lac*-Repressor kodiert. Dieser stark exprimierte *lac*-Repressor lagert sich an die Promoter/Operator-Region im Plasmid pQE-30 an.



Wird die Synthese des Fusionsproteins durch die Zugabe von IPTG induziert, so dissoziiert der *lac*-Repressor vom Promotorbereich des rekombinanten Fusionsgens im pQE-30 und es kann die verstärkte Expression des rekombinanten „His-tag“-Fusionsproteins beginnen.

Weitere Details zu diesem System sowie zur Expression und Reinigung finden sich im Handbuch „*The QIAexpressionist*™“ (QIAGEN).

#### **a) Überprüfung der Expression im kleinen Maßstab**

Je 20 ml LB- oder 2x YT-Medium (mit Ampicillin oder Kanamycin supplementiert) wurden mit 1 ml Übernachtskultur angeimpft, bei 37 °C inkubiert und bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1,0 mit jeweils 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Als Negativkontrolle diente ein nicht induzierter Ansatz. Nach t= 1, 3, 5 h und einer Übernachtsexpression wurden von jeder Kultur 1 ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, abzentrifugiert und das Zellsediment in 100 µl 1 x Probenpuffer resuspendiert. Je nach Zelldichte der geernteten Proben wurden 3-12 µl der Probe mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie Blau-Färbung und/oder *Western Blot* analysiert. Für eine optimale Aufreinigung der „His-tag“-Fusionsproteine wurden rekombinante Klone verwendet, bei denen eine gute Überexpression beobachtet wurde.

#### **b) Überexpression der Fusionsproteine im großen Maßstab**

Eine Übernachtskultur wurde 1:30 -1:100 in frischem 2xYT-Medium (Amp, Kana) verdünnt und bei einer OD<sup>600</sup> von 0,6-1,2 mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Die Kulturen wurden nach Übernachtsexpression geerntet und entweder sofort weiter verarbeitet oder als Sedimente bei -20 °C (kurzzeitig) oder -80°C (langfristig) gelagert.

Die Expression erfolgte in 5 l-Kolben, die je mit 2,5 l Medium befüllt waren.

#### **3.2.1.8. Reinigung von rekombinantem VASP und seinen Phosphomutanten (His-VASP, His-VASP S157A, His-VASP S239A, His-VASP T278A, His-VASP AAA)**

Aufgrund der niedrigen Expression der VASP-Mutanten wurden diese Proteine mit Hilfe der FPLC gereinigt. Hierbei war es von Bedeutung, große Mengen an Ausgangsmaterial (entsprechend ca. 17,5 l exprimierten *E.coli*-Kulturen; OD<sup>600</sup> = 1,5) zu verwenden, woraus ca. 1 mg Protein gereinigt werden konnten. Eine Reinigung im kleineren Maßstab war nicht möglich, sondern führte zum Totalverlust des rekombinanten Proteins.

Die Zellsedimente wurden in 20 ml Lysepuffer pro OD und Liter resuspendiert, nach Inkubation (30 min auf Eis) mit Lysozym (1 mg/ml Endkonzentration), DNase (10 µg/ml Endkonzentration) und RNase (5 µg/ml Endkonzentration) (Zugabe erfolgte vor Ultraschallaufschluss) und nach Ultraschallaufschluss mit Imidazol *ad* 1 mM, und *ad* 0,5 % Triton X-100 und 350 mM NaCl (Stammlösung 5 M) versetzt und zur Extraktion ca. 20 min

auf Eis gerührt. Nach Zentrifugation (13 000 rpm im GSA-Rotor, 1 h, 4 °C) wurde der Überstand durch Verbandmull filtriert und auf eine nach Herstellerangaben mit NiSO<sub>4</sub> äquilibrierte 1 ml Hi-Trap<sup>TM</sup> Chelatsäule (s. u.) geladen (Flussrate: 0,5-0,75 ml), mit 20 ml Waschpuffer gewaschen und mit 30 ml Elutionspuffer eluiert (Flussrate 0,5 ml/min). Nach Analyse der Fraktionen (1 ml) durch SDS-PAGE wurden die VASP-enhaltenden Fraktionen vereinigt und über Nacht gegen 5 l PED-Puffer dialysiert. Die durch Abbauprodukte und Bakterienproteine verunreinigten Proben wurden über eine Anionenaustauscher-Säule (Mono-S<sup>TM</sup>, Amersham Pharmacia Biotech) gereinigt, die zuvor mit 15 ml 1 M NaCl in PED-Puffer gewaschen und anschließend mit 20 ml PED-Puffer äquilibriert wurde. Nach dem Beladen der Säule mit der Probe wurde mit 10 ml PED-Puffer gewaschen (Flussrate jeweils 0,5 ml/min) und mit einem Gradienten von 0,1-0,7 M NaCl in PED-Puffer eluiert (40 ml Elutionsvolumen, Flussrate 0,75 ml/min). Nach erneuter Analyse der Fraktionen (1 ml) durch SDS-PAGE wurden die VASP-enhaltenden Fraktionen vereinigt, über Nacht gegen 1 l VASP-Puffer dialysiert und bei – 80 °C gelagert.

#### a) Äquilibrieren der HiTrap<sup>TM</sup> Chelat-Säule mit NiSO<sub>4</sub>

Entsprechend der Herstellerangaben wurde die Säule nach Waschen mit dH<sub>2</sub>O (20 ml) mit 0,5 ml 100 mM NiSO<sub>4</sub> in dH<sub>2</sub>O beladen, erneut mit dH<sub>2</sub>O gewaschen (5 ml) und anschließend mit Waschpuffer äquilibriert. Die Flussrate betrug für alle Schritte 1 ml/min.

#### Lösungen:

##### Lyse-Puffer:

50 mM	Na-Phosphat (pH 8,0)
0,5 mM	Na-EDTA
5 % (v/v)	Glycerin
50 mM	NaCl
2 µg/ml	Leupeptin
5 mM	Benzamidin-HCl
20 U/ml	Trasylol

##### Waschpuffer:

50 mM	Na-Phosphat (pH 8,0)
350 mM	NaCl
0,5 % (v/v)	TritonX-100
2 µg/ml	Leupeptin
5 mM	Benzamidin-HCl
1 mM	Imidazol (pH 8,0)
20 U/ml	Trasylol

##### Elutionspuffer:

50 mM	Na-Phosphat (pH 7,0)
300 mM	NaCl
100 mM	EDTA

##### PED-Puffer:

20 mM	Na-Phosphat (pH 6,3)
2 mM	EDTA
1 mM	DTE

(vor Zugabe von DTE Puffer entgasen)

**VASP-Puffer:**

20 mM Na-HEPES (pH 7,8)

30 mM NaCl

5 % (v/v) Glycerin

1 mM DTT

(vor Zugabe von DTT Puffer entgasen)

**3.2.1.9. Aktin-Reinigung aus Schweine-Skelettmuskel**

**a) Herstellung von Aceton-Pulver**

Ca. 600 g Muskelfleisch vom frisch geschlachteten Schwein wurde von Fett und Bindegewebe gereinigt, ohne Puffer im *Waring Blendor* homogenisiert, mit 3 Teilen (v/w) Straubs-Lösung versetzt und 20 min bei 4 °C gerührt. Nach Zentrifugation (GSA-Rotor, 15 min, 13 000 rpm, 4 °C) wurde das Sediment nacheinander mit jeweils 3 Teilen (v/w) der nachfolgenden eiskalten Lösungen gewaschen und dabei gut resuspendiert:

1 x mit 0,6 M KCl

3 x mit 0,1 M KCl

2 x mit dH<sub>2</sub>O

1 x mit 10 mM NaHCO<sub>3</sub>

1 x mit dH<sub>2</sub>O

Nach den ersten beiden Waschschritten (0,6 M KCl und das erste Mal 0,1 M KCl) wurde bei 13 000 rpm und danach bei 5 000 rpm zentrifugiert (jeweils 10 min, 4 °C, GSA-Rotor). Anschließend wurde das Sediment viermal mit jeweils drei Volumen 4 °C kaltem Aceton für je 10 min extrahiert, nach jeder Extraktion wurde durch 6-8 Lagen Verbandmull filtriert und gut ausgedrückt. Das Acetonpulver wurde über Nacht im Exsikkator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und in 2,5 g Aliquots bei – 80 °C gelagert.

**Straubs-Lösung:**

150 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6,5)

300 mM KCl

### **b) Reinigung von Aktin aus Acetonpulver**

Die Aktin-Reinigung aus Acetonpulver wurde im Wesentlichen durchgeführt wie beschrieben (Spudich and Watt, 1971) und um einen Gelfiltrationsschritt ergänzt:

2,5 g Acetonpulver wurden zweimal jeweils mit 50 ml eiskaltem (0 °C !) G-Aktin-Puffer versetzt und je 30 min auf Eis unter gelegentlichem Umrühren extrahiert. Die Überstände der Extraktion (17 600 g, 30 min, 4 °C) wurden vereinigt und zur Einleitung der Aktinpolymerisation unter Rühren mit KCl *ad* 50 mM (2 M Stammlösung) und MgCl<sub>2</sub> *ad* 2 mM (1 M Stammlösung) versetzt. Nach 30 min Stehen bei RT wurde der Ansatz 30 min auf Eis langsam gerührt. Nach erneuter KCl Zugabe *ad* 800 mM (4 M Stammlösung) wurde nochmals 30 min auf Eis inkubiert und danach das polymerisierte Aktin durch Zentrifugation (10<sup>5</sup> g) für 90 min bei 4 °C sedimentiert. Die Oberfläche der Sedimente wurde mit 1-2 ml G-Aktin-Puffer kurz gespült, bevor die Sedimente zum Quellen (über Nacht bei 4 °C) mit insgesamt 3 ml G-Aktin-Puffer je Gramm Acetonpulver überschichtet wurden. Das mit einer Pasteurpipette resuspendierte Sediment wurde zur Depolymerisation des F-Aktins für mindestens zwei Tage gegen mehrfach erneuerten G-Aktin-Puffer dialysiert. Nach Abtrennung von Aggregaten und nicht depolymerisiertem Aktin durch Zentrifugation mit 10<sup>5</sup> g für 2 h bei 4°C wurde die Probe über eine in G-Aktin-Puffer äquilibrierte Sephacryl S-200 HR-Säule (1,6 x 100 cm) fraktioniert (0,2 ml/min). Aliquots der Fraktionen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und anhand der Coomassie Blau-gefärbten Gele beurteilt. Ausschließlich Aktin enthaltende Fraktionen wurden vereinigt, steril filtriert (Millex-GV®) und bei 4°C aufbewahrt.

Die Konzentration wurde bei 290 nm photometrisch (Gordon *et al.*, 1976) gegen Elutionspuffer bestimmt ( $A_{290}$  [1mg/ml]= 0,62).

#### **G-Aktin-Puffer:**

2 mM	Tris/Cl (pH 8,0)
0,2 mM	CaCl <sub>2</sub>
0,2 mM	ATP
0,5 mM	DTE

### **3.2.1.10. Umpuffern von gereinigten Proteinen**

#### **a) Dialyse**

Zum Umpuffern größerer Volumina (2-15 ml) gereinigter Proteine wurden selbst präparierte Dialyseschläuche (s. u.) verwendet, mittlere Volumina (0,3- 2 ml) wurden in Slide-A-Lyzer™ Dialyse-Kassetten und kleinere Volumina (20-300 µl) in Slide-A-Lyzer™ Mini Dialysis Units (beides Pierce) dialysiert.

#### **b) Präparation von Dialyseschläuchen:**

Fabrikneue Dialyseschläuche wurden kurz in 20 % NaHCO<sub>3</sub>, danach in verdünnter Na-EDTA-Lösung ( ~1 Spatelspitze auf ~2 l dH<sub>2</sub>O) aufgekocht, einmal mit heißem und zweimal mit kaltem destilliertem Wasser gewaschen und im Kühlschrank in 50 % Isopropanol/1 % Glycerin aufbewahrt.

Vor der Verwendung werden die Schläuche gründlich mit destilliertem Wasser gespült.

### **3.2.1.11. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung von Gesamtprotein-Konzentrationen von Zelllysaten erfolgte mit dem BCA-Assay (Pierce). Gereinigte rekombinante Proteine wurden mittels SDS-PAGE/Coomassie Blau-Färbung und einem Vergleich mit einem BSA-Standard (0,5-10 µg/Minigelspur) oder durch Absorbionsmessung im UV-Bereich bestimmt. Die Aktin-Konzentration wurde aus Absorption bei 290 nm errechnet (Gordon *et al.*, 1976), da die Extinktionsmessung bei Absorption bei 280 nm durch das im Puffer enthaltene ATP zu ungenau wäre.

Als Standard diente gegebenenfalls eine BSA-Stammlösung mit einer Konzentration von 0,4 mg/ml (Sigma).

#### **a) Proteinbestimmung mit dem BCA-Assay (Pierce)**

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Zell-Lysaten erfolgte mit dem BCA-Assay von Pierce gemäß den Angaben des Herstellers:

Für die Proteinbestimmung wurden Zellen in einem Niedrigsalz-Puffer mit Hilfe eines Zellschabers geerntet und zur vollständigen Lyse fünfmal mit einem Dounce-Homogenisator homogenisiert. Die Proben wurden jeweils 1:2, 1:5, 1:10 und 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt. Zur Erstellung einer Standardkurve wurden Proteinkonzentration von 50-400 µg/ml aus einer BSA-Stammlösung hergestellt. Jeweils 50 µl der Standards und verdünnten Proben wurden mit 1 ml BCA-Reagenz (1:50 verdünnt) versetzt, gemischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte die Messung der OD bei 562 nm. Aus den Standardwerten wurde eine Regressionsgerade erstellt und hieraus die Proteinkonzentration berechnet.

**Niedrigsalz-Puffer:**

10 mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1 mM	EDTA

**b) Proteinbestimmung durch Absorption im UV-Bereich**

Hintergrund:

Proteine absorbieren UV-Licht mit Maxima um 200 nm (Absorption durch Peptidbindungen und bei 280 nm (Absorption durch Aromaten).

**c) Messung bei 280 nm:**

Diese Methode erfordert eine etwas höhere Proteinkonzentration, wird aber durch Chemikaliengzusätze weniger beeinflusst als die Messung bei 205 oder 210 nm. Die jeweiligen molaren Extinktionskoeffizienten wurden aus der Aminosäure-Zusammensetzung berechnet.

**3.2.1.13. Phosphorylierung von His-VASP**

Gereinigtes His-VASP (ca. 25 µg) wurde in HEPES-Puffer mit 20 µM ATP (Endkonzentration) und 1 µg der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A (freundlicherweise überlassen von Dr. Elke Butt aus unserer Arbeitsgruppe) 30 min bei 30 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde der Ansatz mit 20 µM PKI (spezifischer Inhibitor der Proteinkinase A) versetzt (Gesamtansatz 200 µl).

Zur Kontrolle wurde der gleiche Ansatz mit 20 µM PKI statt der Kinase inkubiert und anschließend mit der Kinase versetzt, um gleiche Versuchsbedingungen zu erhalten.

**HEPES-Puffer:**

10 mM	HEPES (pH 7,4)
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 mM	DTE
0,2 mM	EGTA

**3.2.1.14. Kosedimentation von VASP-Mutanten bzw. Block B Peptiden mit F-Aktin**

G-Aktin (0,8 mg/ml in G-Puffer) wurde zur Polymerisation mit 2 mM MgCl<sub>2</sub> und 20 mM KCl (Endkonzentrationen) versetzt und für 30 min bei RT inkubiert. 1 Volumen der F-Aktin-Lösung wurde dann mit 1 Volumen der jeweiligen phosphorylierten oder nicht-phosphorylierten VASP-Mutante gemischt bzw. mit einem ca. 10fach molaren Überschuss der an Ovalbumin gekoppelten Block B Peptide (Abschnitt 3.2.1.15.). Der KCl-Gehalt wurde bei Verwendung der VASP-Mutanten auf 120 mM, bei Verwendung der gekoppelten Block B

Peptide auf 20 mM angeglichen. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurden die Proben zur Analyse einer eventuellen Bindung an F-Aktin für eine (VASP-Mutanten) bzw. 2 h (Peptide) bei 100 000 g und 4 °C zentrifugiert. Um eine Kreuzvernetzung von Aktinfilamenten durch VASP-Mutanten in Abhängigkeit der Phosphorylierung zu untersuchen, wurden die Proben bei 12 000 g eine Stunde bei 4 °C zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurden die Überstände vorsichtig abgenommen und äquivalente Aliquots der Überstände und Sedimente mit SDS-PAGE und Coomassie Blau-Färbung analysiert.

#### **3.2.1.15. Kreuzvernetzung von Proteinen mit Sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat)**

2 mg Texas-Red Ovalbumin wurden in 200 µl PBS resuspendiert und zu 2 mg Sulfo-SMCC in 200 µl PBS gegeben und lichtgeschützt 60 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das gekoppelte Protein über eine mit 10 ml PBS äquilibrierte Sephadex G25-Säule (2,5 ml Säulenvolumen) entsalzt (250 µl/Fraktion). Die Ovalbumin enthaltenden Fraktionen (erkennbar an der Färbung durch Texas-Red) wurden eingengt (Microcon 30) und jeweils 1/3 Volumen zu 100 µl PBS oder Block B Peptid in PBS (15 mg/ml) gegeben und zunächst 30 min bei 4°C und anschließend weitere 90 min bei RT lichtgeschützt inkubiert. Danach wurden die Proben über Nacht mit 50 µM β-Mercaptoethanol gequenchet, erneut über eine Sephadex G25-Säule (Säulenvolumen 2,5 ml, 250 µl/Fraktion) entsalzt und eingengt (Microcon 30). Die Konzentration wurde mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese und Coomassie-Blau-Färbung abgeschätzt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### **3.2.2. Mikroskopie**

#### **3.2.2.1. Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie**

Auf Deckgläschen gewachsene Zellen wurden mit 3,7 % (w/v) Formaldehyd (Abschnitt 3.2.2.2) in PBS 20 min auf Eis fixiert, 5 min mit 0,5 % (v/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert und dann 30 min bis 1 h bei 37 °C mit den jeweiligen Primär- und Sekundärantikörpern oder Fluoreszenz-markiertem Phalloidin in einer feuchten Kammer inkubiert. Zwischen den Inkubationsschritten und nach der Inkubation mit den Sekundärantikörpern wurden die Zellen jeweils dreimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden nach dem letzten Waschschrift kurz mit deionisiertem Wasser gespült, um ein Auskristallisieren von Salz beim Trocknen zu verhindern, mit Papier abgetupft und in einen auf einem Objektträger befindlichen Tropfen Mowiol-Lösung eingebettet. Zum

Aushärten der Mowiol-Lösung wurde das Präparat lichtgeschützt über Nacht bei RT aufbewahrt, die weitere Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Die Verdünnungen der eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper sind in Abschnitt 3.1.6.2. angegeben. Üblicherweise wurden die jeweiligen Seren und Antikörper in PBS verdünnt. Die entsprechende Menge Fluoreszenz-markiertes Phalloidin wurde zuerst durch Verdunsten im Vakuum von Methanol befreit und dann in PBS gelöst.

#### **3.2.2.2. Formaldehyd-Lösung:**

Paraformaldehyd wurde in 60 °C warmem Wasser gelöst, das mit wenig NaOH versetzt worden war. Nach Zugabe von 1 Volumen doppelt konzentriertem PBS und Abkühlen auf RT wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt und die Lösung bei – 20°C in Aliquots gelagert.

#### **3.2.2.3. Mowiol-Lösung:**

15 g Mowiol 4-88<sup>®</sup> wurden unter Rühren (24 h) in 60 ml PBS (pH 8,0) gelöst. Die Lösung wurde mit 30 ml wasserfreiem Glycerin und *ad* 2,5 % (w/v) n-Propylgallat (Bleichschutz) versetzt. Nach Abtrennung unlöslicher Bestandteile durch 15 min Zentrifugation mit 17 300 g wurde der Überstand in Aliquots bei – 20 °C gelagert.

#### **3.2.2.4. Rasterelektronenmikroskopie**

Die Rasterelektronenmikroskopie wurde in der Zentralen Abteilung für Elektronenmikroskopie bei Prof. Dr. Krohne durchgeführt.

Auf Deckgläschen gewachsene Zellen wurden mit 6,25 % (v/v) Glutaraldehyd für 30 min bei RT und anschließend über Nacht bei 4 °C fixiert, dreimal für 5 min mit Dulbeccos-PBS gewaschen, über Nacht bei 4 °C gelagert und danach wie folgt auf Eis entwässert:

30 % (v/v) Aceton	15 min
50 % (v/v) Aceton	20 min
75 % (v/v) Aceton	30 min
90 % (v/v) Aceton	45 min
100 % (v/v) Aceton	30 min
100 % (v/v) Aceton	30 min
100 % (v/v) Aceton	30 min
100 % (v/v) Aceton	30 min
100 % (v/v) Aceton	Aufbewahrung

Bei allen Schritten wurde darauf geachtet, dass die Zellen nicht austrocknen.



Anschließend wurde die Kritische-Punkt-Trocknung im CPD 030 (engl.: *Critical Point Dryer*) der Firma BAL-TEC durchgeführt. Hierzu wurden die Deckgläser in frischem Aceton in Körbchen eingebracht und in das mit Aceton gefüllte Gerät überführt. Die Kammer wurde auf 4 °C abgekühlt und unter Rühren mit CO<sub>2</sub> geflutet. Nach dem Ablassen des Aceton/CO<sub>2</sub>-Gemisches bis zu den Körbchen wurde der Vorgang des Flutens und Ablassens insgesamt acht mal wiederholt, um einen vollständigen Austausch von Aceton zu CO<sub>2</sub> zu gewährleisten. Die Kammer wurde anschließend zur Hälfte mit CO<sub>2</sub> geflutet (die Körbchen waren dabei bedeckt), auf 40 °C erwärmt, wobei der Druck auf ca. 90 bar stieg und nach Abkühlen wurde das CO<sub>2</sub> langsam abgelassen (ca. 90 min). Die Deckgläser wurden auf Mikroskopiertische aufgeklebt, 5 min mit dem Spotter Coater SCD 005 (BAL-TEC) in Argon-Atmosphäre mit Gold/Palladium bedampft und unter Luftabschluss bei RT aufbewahrt.

Für die Behandlung der Zellen mit Fibronektin-beschichteten *beads* wurden die Zellen mit den angegebenen Substanzen behandelt, die *beads* wurden auf die Zellen gegeben und nach dem Absinken mit einem Magneten am Kulturschalenrand orientiert. Daraufhin wurde das Medium vorsichtig gegen Glutaraldehyd ausgetauscht. Die weitere Behandlung erfolgte wie oben beschrieben.

Die Betrachtung der Zellen erfolgte mit dem Rasterelektronenmikroskop der Firma Zeiss DSM 962 (engl.: *Digital Scanning Microscope*).

### **3.2.2.5. Messungen mit der Laser-Pinzette (*laser-tweezer*)**

Die Messungen mit der Laser-Pinzette wurden im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg bei Herrn Prof. Drenckhahn unter Anleitung von PD Dr. Werner Baumgartner durchgeführt.

#### **a) Prinzip der Laser-Pinzette**

Eine optische oder Laser-Pinzette ermöglicht es, Objekte von wenigen Mikrometern im Durchmesser berührungslos und zerstörungsfrei einzufangen und zu bewegen. Durch den Einsatz von Lasern im Infrarotbereich können auch Objekte auf Zellen oder sogar einzelne Zellorganelle, Erythrozyten oder Bakterien ohne Beeinträchtigung untersucht werden.

Eine Laser-Pinzette besteht aus einem Infrarotlaser ( $\lambda = 1064 \text{ nm}$ ), dessen Strahl mit einem Fernrohr aufgeweitet und mit Hilfe von Umlenkungsspiegeln in einen freien Mikroskopeingang eingeleitet wird. Die nötige starke Fokussierung des Lichtstrahls wird durch hochauflösende Objektive hoher numerischer Apertur erreicht. Durch Fokussierung des Laserstrahls in der Objektebene des Mikroskops kann die Fallenwirkung gleichzeitig mittels einer Videokamera beobachtet werden.

### b) Messungen mit der Laser-Pinzette

Kardiale Fibroblasten wurden auf sterilen Deckgläsern (22 mm Durchmesser) bis zur Konfluenz kultiviert und je nach Versuchsbedingungen nicht behandelt oder mit 10 µM Cytochalasin D (Fluka) in DMSO, 10 µM Colchicin A in Ethanol, 100 µM 8-pCPT-cGMP oder 30 µM 8CPT-2Me-cAMP in Wasser 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> präinkubiert. Die Deckgläser wurden aus den Kulturschalen entnommen und auf einen Metallobjektträger mit entsprechend großer Fräsung aufgelegt und mit serumfreien Medium beschichtet. Anschließend wurden 3 µl der *bead*-Suspension zugegeben und die Perlen nach dem Absinken mit der Laserpinzette bewegt. Die Messungen wurden für maximal 30 min durchgeführt.

#### 3.2.2.6. Beschichtung von Polystyrol-*beads*

Es wurden 2,8 µm große, superparamagnetische, tosylaktivierte Polystyrolkugeln der Firma Dynal (Norwegen) verwendet. Die Beschichtung erfolgte über kovalente Bindung von Aminogruppen an die Tosylgruppe durch Substitution und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die *Dynabeads* ( $2 \times 10^8$  *beads*/ml) wurden durch Antippen in Suspension gebracht, 50 µl (entspricht ca.  $10^8$  *beads*) wurden in ein 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und dieses für 1-4 min in einen Magneten (Dynal MPC) gestellt. Nach dem Absetzen der Perlen wurden diese zweimal gewaschen, indem der Überstand vorsichtig entfernt wurde, die Perlen aus dem Magneten genommen und in 100 µl Puffer A resuspendiert wurden. Anschließend wurden die Perlen erneut in den Magneten gestellt, der Überstand entfernt und die *beads* in je 30 µg Fibronectin oder BSA (beides Sigma) in 100 µl Puffer A resuspendiert und 20-24 h bei RT und leichter Rotation inkubiert ( $3 \mu\text{g Protein}/10^7$  *beads* und  $10^8$  *beads* /ml Endkonzentrationen). Danach wurden die *beads* nacheinander in jeweils 100 µl der folgenden Lösungen gewaschen: zweimal in Puffer D für 5 min bei 4°C, einmal mit Puffer E für 24 h bei RT zur Absättigung restlicher Tosylgruppen und erneut einmal mit Puffer D für 5 min bei 4 °C. Die Lagerung erfolgte unter langsamer Rotation bei 4 °C in 100 µl Puffer D für bis zu drei Wochen.

#### Lösungen:

##### Puffer A:

0,1 M Na-phosphat (pH 7,4)

##### Puffer D:

0,1 % (w/v) BSA  
in PBS

##### Puffer E:

0,2 M Tris/Cl (pH 8,5)

0,1 % (w/v) BSA

### **3.2.2.7. Rasterkraftmikroskopie (engl: atomic force microscopy, AFM)**

Die Rasterkraftmikroskopie ist eine Untersuchungsmethode, die es ermöglicht, Oberflächenstrukturen nahezu beliebiger Materialien darzustellen. Sie wurde von Gerd Binnig (Binnig *et al.*, 1986) aus der Rastertunnelmikroskopie entwickelt, die sich im Gegensatz zur Rasterkraftmikroskopie nicht zur Untersuchung biologischer Proben eignet. Das Auflösungsvermögen des Rasterkraftmikroskopes liegt für biologische Objekte mit einem Wert von 10-100 nm im gleichen Bereich wie die Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie. Allerdings müssen die Proben für die Rasterkraftmikroskopie nicht vorbehandelt werden, das heißt es können lebendige Zellen in physiologischen Pufferlösungen untersucht und beobachtet werden

#### **a) Prinzip der Rasterkraftmikroskopie**

Bei der Rasterkraftmikroskopie wird die Oberfläche einer Probe (z.B. lebende Zellen in Medium) mit einer am Ende einer weichen Blattfeder (engl.: *cantilever*) befestigten feinen Spitze mechanisch abgetastet, wobei eine topographische Karte der Probenoberfläche erstellt wird. Die Spitze wird mit Hilfe eines Piezokristalls vorsichtig der Probe genähert. Die zwischen der Spitze und der Probe sich entwickelnden anziehenden und abstossenden molekularen und atomaren Kräften (z. B. elektrostatische Kräfte und/oder Van-der-Waals-Kräfte) führen zu einer geringen Verbiegung der Blattfeder, was mit Hilfe eines Laserstrahls registriert und von einer Photodiode detektiert wird. Die Sondenspitze wird nun mittels piezoelektrischer Scanner in x- und y-Richtung bewegt. Im sogenannten Kontakt-Modus wird die Auslenkung der Feder und folglich die Kraft zwischen Sondenspitze und Probe über einen Rückkopplungsmechanismus konstant gehalten. Das Auslenkungssignal und die z-Position des Piezokristalls, an dem die Blattfeder befestigt ist, werden als Funktion der x- und y-Position auf der Probe als Bild dargestellt. Aus der z-Position ergibt sich die topographische Karte des untersuchten Probenbereichs. Aufgrund der Trägheit des Regelkreises kommt es bei Höhenänderungen zu einem Regelfehler. Das Auslenkungssignal (Fehlersignal) ist proportional zur Ableitung der Topographie in Richtung der Rasterbewegung. Daher sind insbesondere feine Details der Probe hier deutlicher zu erkennen als in den Topographiebildern

#### **b) Die Kraftspektroskopie**

Bei der Kraftspektroskopie wird die Blattfeder als mechanischer Sensor benutzt, mit dem Indentationen in das Probenmaterial durchgeführt werden. Dabei werden die Kräfte gemessen, die bei der Indentation und beim Auseinanderziehen von Spitze und Probe auftreten. So können Materialeigenschaften der Probe wie Elastizität, Härte und Adhäsion bestimmt werden.

Bei der Messung von Elastizität eine Probe (hier lebende Zellen in Medium) wird die Basis der Blattfeder mit Hilfe des Piezokristalls an die Probe herangenhört und wieder zurückgezogen. Simultan wird die Verbiegung der Blattfeder aufgezeichnet. Kurz vor Erreichen der Probe biegt sich die Blattfeder aufgrund anziehender Kräfte zur Probe, bei weiterem Absinken der Blattfeder lenkt diese in Abhängigkeit der Elastizität der Probe in die andere Richtung aus: je weicher bzw. elastischer die Probe, um so geringer ist die Auslenkung, da die Spitze der Blattfeder in die Probe eindringen kann. Beim Zurückziehen der Spitze übersteigt die Federkraft die Adhäsionskraft und die Spitze springt von der Probe weg (Dettmann, 1999).

### **3.2.3. Zellkultur**

#### **3.2.3.1. Kulturbedingungen**

##### **PtK<sub>2</sub>-Zellen (*Potorous tridactylis kidney epithelial cells*):**

Die PtK<sub>2</sub>-Linie ist eine epitheliale Zell-Linie aus der Niere der Beutelratte. Die Kultivierung erfolgte in DMEM mit 10 % FCS.

##### **MCFB (*mouse cardiac fibroblasts*):**

Die Fibroblasten-Zell-Linie aus dem Myocard von VASP (+/+) und VASP (-/-) Mäusen wurden von Maísa García Arguinzonis etabliert (Garcia Arguinzonis *et al.*, 2002). Die Kultivierung erfolgte in DMEM mit 10 % FCS.

##### **Maus-Mesangial-Zellen:**

Diese Primärzellen wurden aus der Niere von VASP (+/+) und VASP (-/-) Mäusen gewonnen (s. u.) und in RPMI 1640 mit stabilem Glutamat, ITS und 10 % FCS kultiviert.

##### **Humane Fibroblasten:**

Die Kultivierung erfolgte in DMEM mit 10 % FCS.

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### **3.2.3.2. Anzucht von Mesangiumzellen**

Nieren von erwachsenen Mäusen wurden *post mortem* isoliert, mit einem Skalpell grob zerkleinert, mit Hilfe eines sterilen Erlenmeyerkolbens durch ein Sieb gestrichen (Maschengröße 125 µm) und auf einem zweiten Sieb (Maschengröße 50 µm) aufgefangen. Nach Waschen mit Dulbeccos-PBS wurde das kleine Sieb umgedreht, die Glomeruli auf eine

sterile Petrischale ab gespült und anschließend bei RT für 10 min bei 200 g zentrifugiert. Danach wurden die Glomeruli für 10 min bei 37 °C mit 20 U/ml Collagenase IV (*Clostridium*; Sigma) in Dulbeccos-PBS inkubiert, zweimal mit Dulbeccos-PBS gewaschen und anschließend in Collagen I-beschichtete 6-well-Platten ausgesät (Becton Dickinson) (Gambaryan *et al.*, 2001).

### **3.2.3.3. Immunfärbung zur Charakterisierung von Mesangiumzellen**

Zur Charakterisierung der Mesangiumzellen (Gambaryan *et al.*, 2001) wurden Zellen der Passage 5 verwendet. Diese wurden auf einer 24-well-Platte ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden einmal mit 1 % BSA in Dulbeccos-PBS gewaschen, nacheinander für jeweils 5 min mit 80 % Aceton in Ethanol, 80 % Aceton und 50 % Aceton bei – 20 °C fixiert und anschließend dreimal mit 1 % BSA in Dulbeccos-PBS gewaschen. Nach Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen für 30 min bei RT mit 10 % BSA in Dulbeccos-PBS wurden die Zellen zunächst eine Stunde mit dem Primärantikörper und nach dreimaligem Waschen mit 1 % BSA in Dulbeccos-PBS eine weitere Stunde mit dem mit Meerrettich-Peroxidase konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert. Beide Antikörper wurden in 1 % BSA in Dulbeccos-PBS verdünnt.

Anschließend erfolgte die Detektion mit dem ABC-Kit von Vectastain nach den Angaben des Herstellers. Hierzu wurde Diaminobenzidin zu der Antikörperlösung gegeben und das Präparat unter dem Mikroskop beobachtet, bis eine Braunfärbung entstand. Nach zweimaligem Spülen mit dH<sub>2</sub>O wurden die Zellen in 37 °C warme Kaisers-Glyceringelatine (Merck) eingebettet.

Primärantikörper:                   α-Vimentin (DAKO, Klon V9)  
  α -von Willebrand Faktor (DAKO, Klone F8/86)  
  α -Cytokeratin (Immunotech 18)  
  α -Desmin (DAKO, Kon DE-R-11)  
  α -Thy 1.1 (Chemicon)  
  α -glatte Muskelzellen Aktin (Progen, ASM-1)

Die Färbung auf Thy 1.1 und glatte Muskelzellen Aktin war positiv, wohingegen die anderen Färbungen negativ blieben.

### **3.2.3.4. Passagieren adhärenter Zellen:**

Zum Passagieren wurden die adhärenter Zellen mit Dulbeccos-PBS gespült und mit einem geringen Volumen Trypsin (MCFB) bzw. Trypsin/EDTA (PtK<sub>2</sub>- und Mesangial-Zellen) bis zum Abrunden der Zellen bei 37 °C inkubiert. PtK<sub>2</sub>- und Mesangial-Zellen wurden zuvor 5 min bei

37 °C mit 10 mM EDTA in PBS inkubiert. Die mit Medium abgelösten Zellen wurden gezählt und in mit Medium befüllte Flaschen oder Schalen gegeben und im Brutschrank inkubiert. Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf sterilen Deckgläschen ausgesät.

### **3.2.3.5. Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen:**

Zur Lagerung adhärenter Kulturzellen wurden diese trypsinisiert, gezählt, abzentrifugiert (200 g, 5 min, RT) und mit  $10^6$  Zellen/ml in 0°C kaltem Einfriermedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in Kryoröhrchen überführt und diese für 1 h bei – 20 °C, über Nacht bei – 80 °C und danach in flüssigem Stickstoff bis zu Wiederverwendung aufbewahrt.

Zum Auftauen der Zellen wurde die auf 0 °C erwärmte Zellsuspension zu 10 ml Medium gegeben, die Zellen wurden abzentrifugiert (200 g, 5 min, RT) und zweimal mit 10 ml Medium gewaschen, um das zelltoxische DMSO vollständig zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert, in eine Kulturflasche gegeben und im Brutschrank inkubiert. Tote Zellen wurden am nächsten Tag durch einen Mediumwechsel entfernt.

**Einfriermedium:**    92 % FCS  
                              8 % DMSO

### **3.2.3.6. Mikroinjektion**

Die Mikroinjektion erfolgte mit Hilfe eines aus einem Mikroinjektor 5242 (Eppendorf), einem Mikromanipulator M (Leitz) und einem Inversmikroskop (Labovert FS, Leitz) bestehenden System. Für die Injektionen wurden sterile Femtotips (Eppendorf) verwendet. Die Zellen wurden auf sterilen Deckgläsern ausgesät. Sofern die Zellen in ausschließlich CO<sub>2</sub>-gepufferten Medium kultiviert wurden, wurde 3 h vor der Mikroinjektion das Kulturmedium gegen das entsprechende HEPES-gepufferte Medium ausgetauscht, um starke pH-Veränderungen während der Injektionsdauer zu vermeiden.

Die für die Mikroinjektion verwendeten Block-B Peptide hatten eine Konzentration von 10 mg/ml. Um größere Partikel und Aggregate abzutrennen, wurden die Lösungen vor Gebrauch bei 4 °C für 30 min mit 16 000 g zentrifugiert. Mit Hilfe von Microloader-Spitzen (Eppendorf) wurde die Lösung so in der Femtotips pipettiert, dass sich die Femtospitze durch Kapillarwirkung füllte. Nach Einspannen in den Halter wurde der Haltedruck so reguliert, dass der ständige Lösungsausstrom relativ gering gehalten, ein Einstrom von Medium jedoch verhindert wurde. Ebenso wurde auch der Injektionsdruck an die jeweils zu injizierende Zellart angepasst. Die Injektion erfolgte im Phasenkontrast unter Beobachtung

mit einem EF L32/0,4-Objektiv (Leitz). Nach einer anschließenden 1-4 stündigen Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Für die Identifizierung von injizierten Zellen wurden unspezifische Kaninchen- $\gamma$ -Globuline (freundlicherweise überlassen von Dr. M. Reinhard, gleiche Arbeitsgruppe) in einer Konzentration von 3 mg/ml zugefügt.

### 3.2.3.7. Transiente Transfektion von Zellen

Die Zellen wurden bei einer Dichte von etwa 50-80% mit dem FuGene 6-Reagenz nach den Angaben des Herstellers transient transfiziert. Hierfür wurde serumfreies Medium mit FuGene 6-Reagenz versetzt (dreifaches Volumen der DNA-Menge) und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf die benötigte Menge DNA gegeben, vermischt, erneut 15-30 min bei RT stengelassen und anschließend auf die Zellen gegeben. Ein Mediumwechsel nach Transfektion wurde nicht benötigt. Es wurde jeweils ein Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l pro Transfektion gewählt.

Beispielansatz:	Medium	93 $\mu$ l
	Fugene 6-Reagenz	6 $\mu$ l
	Plasmid-DNA (2 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l (2 $\mu$ g)
	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>100 <math>\mu</math>l</b>

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Die Phosphorylierung von VASP reduziert die F-Aktin Bindung und Bündelung *in vitro*

Die EVH2-Domäne von VASP (AS 225-380) ist für die Bindung an und Bündelung von F-Aktin essentiell. Die VASP-Aminosäuren 259-380 sind für die Bindung und Bündelung von Aktinfilamenten ausreichend. Deletion des konservierten Block B (AS 259-276) reduziert die Bindung an F-Aktin dramatisch (Bachmann *et al.*, 1999).

Die Phosphorylierungsstelle Threonin 278 liegt am Rande dieses Bereichs. Da die F-Aktin-Bindung von VASP zudem zumindest teilweise auf elektrostatische Interaktionen beruht (VASP ist basisch und Aktin sauer), lag die Vermutung nahe, dass die Phosphorylierung von VASP, insbesondere an dieser Stelle, einen Einfluss auf die Bindung und/oder Bündelung von Aktinfilamenten haben könnte.

Um dies genauer zu untersuchen, wurden His-getaggte VASP-Phosphorylierungsmutanten (Tab. 1) einem F-Aktin-Bindungs-Assay (Zentrifugation bei 100 000 g) und –Bündelungs-Assay (Zentrifugation bei 12 000 g) unterzogen.

**Tab. 1: Verwendete VASP-Mutanten und deren Benennung im Text.**

Dargestellt sind die verwendeten VASP-Phosphorylierungsmutanten und deren Bezeichnung im Text. Die Proteine wurden über einen N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag aus *E. coli* aufgereinigt (Abschnitt 3.2.1.8.).

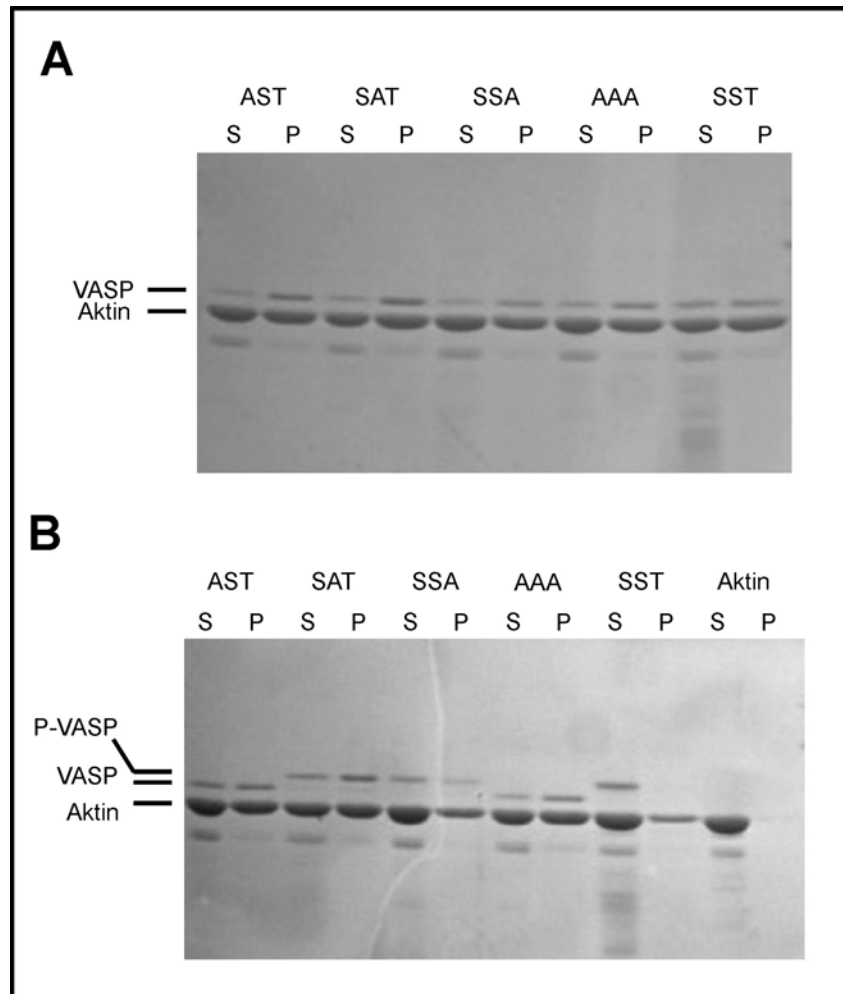
Mutation	Bezeichnung
keine	SST-VASP/wt-VASP
S157 → A	AST-VASP
S239 → A	SAT-VASP
T239 → A	SSA-VASP
S157 → A, S239 → A, T239 → A	AAA-VASP

Da die Bindung von VASP an F-Aktin salzabhängig ist (Bachmann *et al.*, 1999) und um unspezifische Bindungen bei niedriger Salzkonzentration zu verhindern, wurden alle Versuche bei einer KCl-Konzentration von 120 mM durchgeführt.

In Abb. 4 ist ein typisches Ergebnis eines Bündelungs-Assays dargestellt. Als Kontrolle dienten die nicht-phosphorylierten VASP-Mutanten (Abb. 4A). Unter den gegebenen Bedingungen findet sich bei allen VASP-Mutanten mehr als die Hälfte des jeweils eingesetzten Proteins zusammen mit einem Teil des Aktins im Sediment (engl.: *pellet*; P). Alle VASP-Mutanten bündelten damit Aktinfilamente, weil F-Aktin alleine unter diesen Bedingungen nicht sedimentiert (Abb. 4B). Nach Phosphorylierung (Abb. 4B) durch die



katalytische Untereinheit der PKA kommt es in der SDS-PAGE zu einem *shift* im scheinbaren Molekulargewicht. Dieser *shift* wird durch die Phosphorylierung von Serin 157 verursacht (Butt *et al.*, 1994) und trat daher nur bei den Mutanten auf, in denen S157 nicht mutiert war (SAT-, SSA- und SST-VASP). Nach Phosphorylierung der VASP-Mutanten ist eine deutliche Reduktion der VASP-Menge im Sediment insbesondere für SST- und SSA-VASP festzustellen. Der Unterschied für AST- und SAT-VASP ist weniger stark ausgeprägt; kein Effekt konnte erwartungsgemäß bei der unphosphorylierbaren AAA-Mutante beobachtet werden.



**Abb. 4: Phosphorylierung von VASP inhibiert die Bündelung von VASP an F-Aktin**

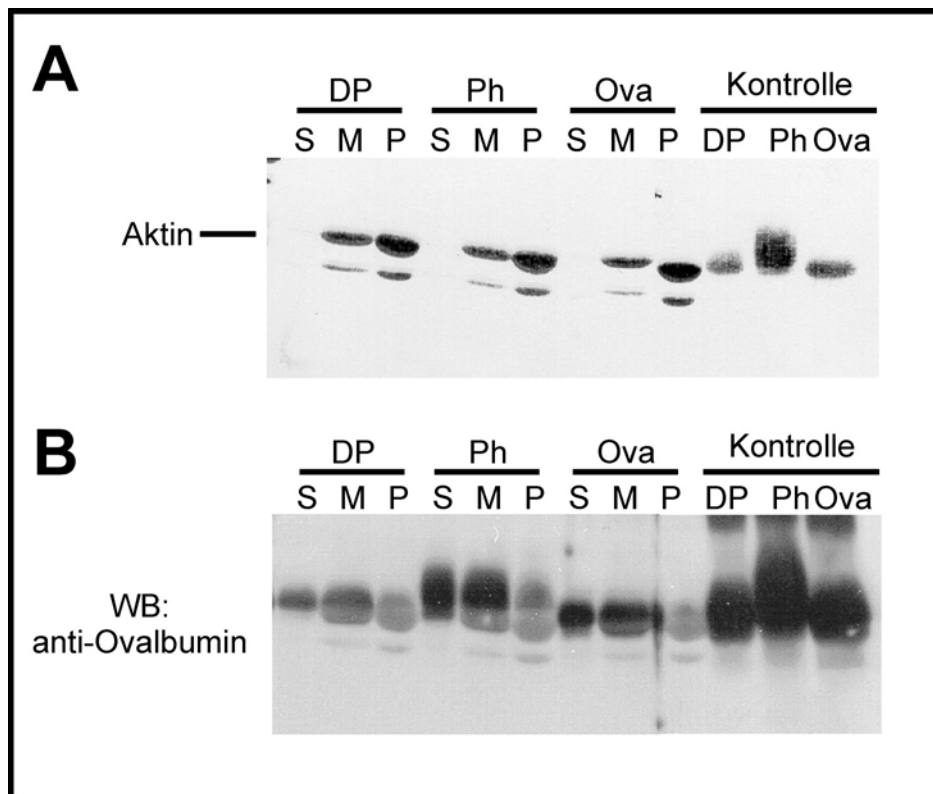
**A:** Unphosphoryliertes VASP und VASP-Mutanten wurden zu präpolymerisiertem Aktin gegeben, 30 min bei RT inkubiert und anschließend 1 h bei 12 000g zentrifugiert, um eine Kreuzvernetzung der Aktin-Filamente zu untersuchen. Die Auftrennung entsprechender Mengen des Überstandes (S) und des Sediments (P) erfolgte über SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Blue Färbung. Als Kontrolle diente F-Aktin ohne Zusatz von VASP (**B**). **A:** VASP und die VASP-Mutanten befinden sich zusammen mit Aktin überwiegend im Sediment und bündeln somit Aktinfilamente, wohingegen F-Aktin alleine im Überstand verbleibt (**B**). **B:** Gleicher Ansatz wie in A, wobei VASP und die VASP-Mutanten vor der Zugabe von F-Aktin durch die PKA phosphoryliert wurden. Die Phosphorylierung von VASP führt zur Reduktion insbesondere von wt- und SSA-VASP im Sediment, wohingegen AAA-VASP weiterhin überwiegend im Sediment verbleibt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

Diese Ergebnisse widersprechen den Erwartungen, dass die Kreuzvernetzung der Aktinfilamente von VASP durch Phosphorylierung des Thr278 reduziert wird. Vielmehr zeigen die Daten, dass die Phosphorylierung an den beiden Serinen, Ser157 und Ser239, nicht jedoch die Phosphorylierung nur einer der beiden Serinresten, die Interaktion von VASP mit F-Aktin deutlich hemmen. Parallel angesetzte Bindungs-Assays ergaben vergleichbare, allerdings weniger eindeutige Ergebnisse (nicht gezeigt). Die Ursache hierfür liegt vermutlich in der schwer zu erreichenden vollständigen Phosphorylierung des VASP-Tetramers (überprüft durch den vollständigen *shift*). Die Phosphorylierung reduziert die Bindung von VASP an die Mikrofilamente, jedoch vermittelt bereits eine unphosphorylierte Untereinheit des Tetramers die Bindung an F-Aktin, wohingegen für die Kreuzvernetzung mindestens zwei unphosphorylierte Untereinheiten desselben Tetramers vorhanden sein müssen. Daher erweist sich der Bündelungs-Assay als sensitiver gegenüber dem Bindungs-Assay.

Ähnliche Ergebnisse wurden unabhängig auch von Harbeck *et al.* erreicht (Harbeck *et al.*, 2000). Sie zeigten, dass die Phosphorylierung von Wildtyp-VASP die Bindung an F-Aktin reduziert, jedoch ohne eine eindeutige Bedeutung der beiden Serine herauszustellen (Abschnitt 5.1.).

Bachmann *et al.*. (Bachmann *et al.*, 1999) zeigten, dass nach Deletion des konservierten Blocks B (AS 259-276) der EVH2-Domäne die Bindung an F-Aktin Bindung deutlich reduziert wird. Um zu testen, ob der Block B direkt an F-Aktin bindet und ob diese Bindung durch Phosphorylierung des benachbarten Thr278 beeinflusst wird, wurden sowohl unphosphorylierte als auch phosphorylierte Block B Peptide (AS 259-283) mit Hilfe der Hochgeschwindigkeitszentrifugation auf ihre F-Aktin Bindung untersucht. Hierfür wurden die Peptide zunächst an Texas-Red Ovalbumin über Sulfo-SMCC gekoppelt (Abschnitt 3.2.1.15.). Die Peptide und ungekoppeltes Ovalbumin als Kontrolle wurden im ca. zehnfachen Überschuss zu präpolymerisiertem Aktin gegeben und 30 min bei RT und einer Konzentration von 20 mM KCl inkubiert. Nach zweistündiger Zentrifugation (100 000 g, RT) wurden der Überstand (engl.: *supernatant*, S), eine mittlere Fraktion (M) und das Sediment (P) in Laemmli-Puffer aufgenommen und entsprechende Mengen über SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis von Aktin erfolgte durch Ponceau S Färbung der auf Nitrocellulose transferierten Proteine (Abb. 5A). Wie erwartet, findet sich F-Aktin in der mittleren Fraktion und im Sediment, jedoch nicht im Überstand (Abb. 5A). Die an Ovalbumin gekoppelten Peptide wurden mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen Ovalbumin nachgewiesen. Hierbei ergab sich, dass die gekoppelten Peptide im gleichen Maße im Sediment zu finden waren wie Ovalbumin alleine (Abb. 5B). Somit erfolgt keine direkte Interaktion des Blocks B mit F-Aktin unter den getesteten Bedingungen (Abb. 5).

Um eine direkte Bindung an F-Aktin unter physiologischen Bedingungen zu testen, wurden die Peptide zusammen mit  $\gamma$ -Globulinen aus Kaninchen als Injektionsmarker in humane Fibroblasten mikroinjiziert. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen fixiert und mit einem Cy3-markierten Kaninchen-Antikörper und *Oregon Green*-Phalloidin gefärbt. Dabei ergab sich eine diffuse cytoplasmatische Lokalisation beider Peptide ohne Kolo-kalisation an F-Aktin-Strukturen (nicht gezeigt).



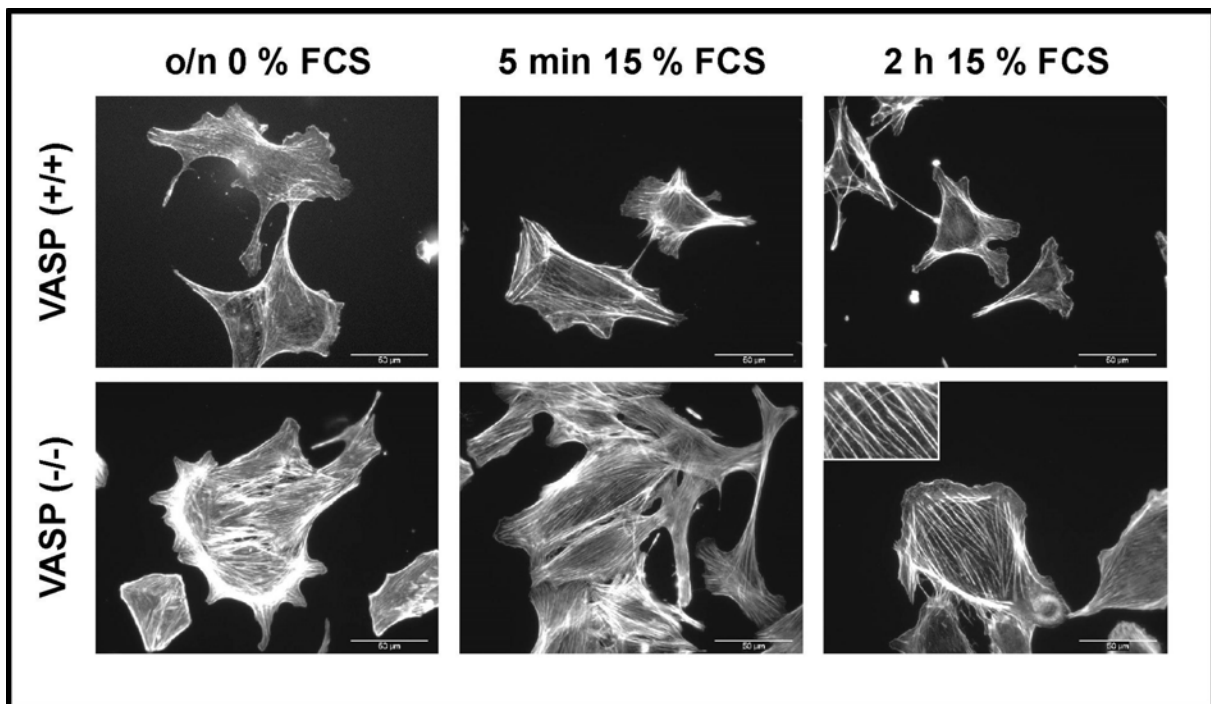
**Abb. 5: Bindungs-Assay von Block B Peptiden mit F-Aktin**

An Ovalbumin gekoppelte Peptide des Blocks B (DP: Dephosphopeptid, Ph: Phosphopeptid) und ungekoppeltes Ovalbumin (Ova) wurden zu F-Aktin gegeben, 30 min bei RT inkubiert und 2 h bei RT und 100 000 g zentrifugiert, um eine direkte Bindung des Blocks B an F-Aktin zu untersuchen. Neben dem Überstand (S) und dem Sediment (P) wurde eine mittlere Fraktion (M) über SDS-PAGE aufgetrennt. Als Kontrolle dienten die gekoppelten Peptide und ungekoppeltes Ovalbumin ohne Inkubation mit F-Aktin. Der Western-Blot wurde zum Nachweis von Aktin mit Ponceau S gefärbt (A) und anschließend zum Nachweis der Peptide mit einem Antikörper gegen Ovalbumin geblottet (B). Sowohl das unphosphorylierte als auch das phosphorylierte Peptid blieben im Überstand, wohingegen sich die Aktinfilamente im Sediment befanden. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen.

**4.2. VASP-Überexpression erzeugt verstärkte und stabilere Stressfasern**

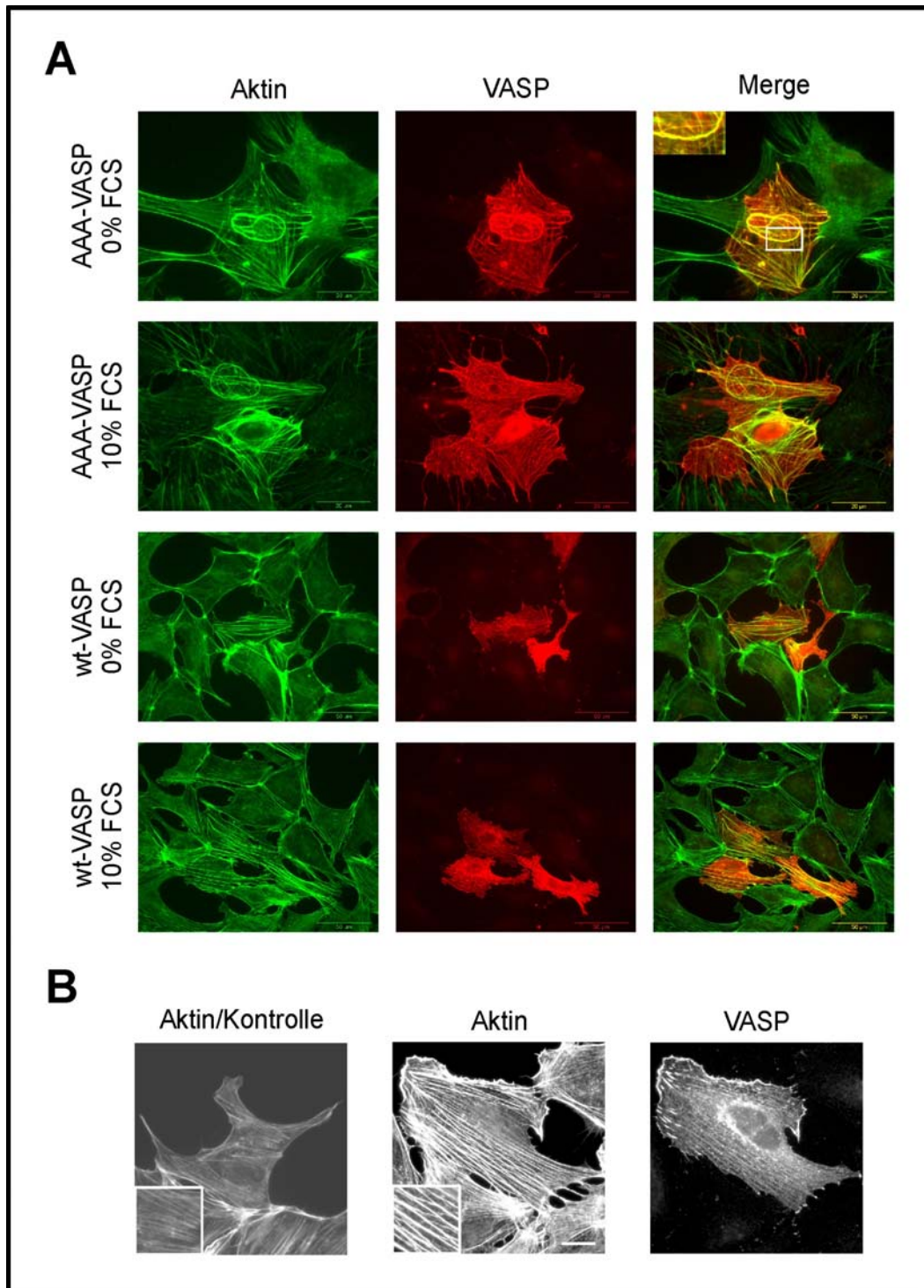
Überexpression von rekombinanten humanem VASP in transient transfizierten eukaryotischen Zellen erzeugte verstärkte Stressfasern, wie in der Phalloidin-Färbung sichtbar gemacht werden kann (Abb. 6A und B PtK<sub>2</sub>-Zellen). Für die transiente Transfektion

wurden wt-VASP und eine VASP-Mutante verwendet, in der alle drei Phosphorylierungsstellen für die Protein Kinasen A und G (Serin 157, Serin 239 und Threonin 278) zu Alanin mutiert wurden (AAA-VASP). Die Ausbildung verstärkter Stressfasern war unabhängig vom Zelltyp, denn ähnliche Resultate wurden an PtK<sub>2</sub>-, NIH 3T3- und Mesangial-Zellen erzielt (nicht gezeigt). Bei weiterer Vergrößerung ist ersichtlich, dass sich benachbarte Stressfasern kreuzen (Abb. 7B Inset), ein Phänotyp wie er erstaunlicherweise auch in VASP-defizienten Fibroblasten (Galler *et al.*, 2003; Garcia Arguinzonis, 2003) und Mesangiumzellen nachgewiesen wurden (Abb. 6; Galler *et al.*, 2003). Zudem bildeten sich die Stressfasern überraschenderweise auch in Abwesenheit von Serum (Abb. 7). Serumentzug führt in der Regel zum Auflösen von Stressfasern, die sich erst nach Stimulation mit Serum durch die Aktivierung des Rho-Signalweges neu bilden (Nakano *et al.*, 1999) (Abschnitt 4.3.). In den mit VASP transfizierten Zellen ist die Bildung von Stressfasern jedoch unabhängig vom stimulierenden Einfluss von Serum.



**Abb. 6: VASP-defiziente Zellen zeigen verstärkte und stabilere Stressfasern**

Mesangiumzellen aus VASP (+/+) (obere Zeile) und VASP (-/-) (untere Zeile) Mäusen wurden wie angezeigt über Nacht (o/n) serumfrei inkubiert und anschließend 5 min bzw. 2 h mit 15% FCS stimuliert. Nach Fixierung mit Formaldehyd wurde F-Aktin mit *Oregon Green*-Phalloidin gefärbt. Die Stressfasern in VASP (+/+) Zellen lösen sich während des Serumentzugs auf, wohingegen sie bei VASP-defizienten Zellen erhalten bleiben. Nach fünfminütiger Inkubation mit FCS bilden sich die Stressfasern in VASP (+/+) wieder. Deutlich zu erkennen ist auch, dass die Stressfasern in Abwesenheit von VASP verstärkt sind und sich kreuzen (Inset, doppelte Vergrößerung). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.



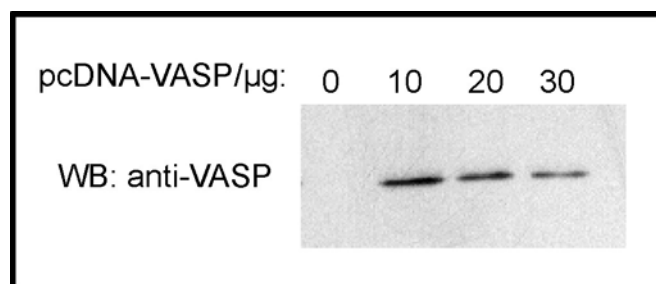
**Abb. 7: Die Überexpression von VASP erzeugt verstärkte Stressfasern.**

**A:** PtK<sub>2</sub>-Zellen wurden transient mit humanem wt-VASP und AAA-VASP transfiziert, 48 h ohne FCS oder mit 10% FCS wie angegeben inkubiert. VASP wurde mit einem polyklonalen Antikörper gefolgt von einem Cy3-markierten Sekundärantikörper (mittlere Spalte) und F-Aktin durch *Oregon Green*-markiertes Phalloidin (linke Spalte) dargestellt. Die Überlagerung der beiden Färbungen ist in der rechten Spalte gezeigt. In dem Inset ist die Knäuel-Bildung von Aktinfilamenten nach Transfektion mit AAA-VASP in doppelter Vergrößerung dargestellt.

**B:** Wie Abbildungsteil A, dargestellt sind mit wt-VASP transient transfizierte oder nicht transfizierte PtK<sub>2</sub>-Zellen. Die Insets in A und B zeigen die Stressfasern in doppelter Vergrößerung, wobei das Kreuzen der Filamente nach Überexpression von VASP deutlich zu erkennen ist. Balken in B: 15 µm. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis von fünf voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

In etwa 10-20% der mit AAA-VASP transfizierten Zellen bildeten sich, unabhängig von Serum, F-Aktin-„Knäuel“, die scheinbar aus Stressfasern entstanden sind und um den Zellkern zusammenfielen (Abb. 7). Dieser Phänotyp konnte bei Transfektion mit wt-VASP nicht oder nur extrem selten beobachtet werden.

Bei Untersuchung der Transfektionseffizienz durch *Western-Blot* Analysen ergab sich, dass die Expression von VASP mit steigender DNA-Menge unerwarteterweise abnahm (Abb. 8). Dies lässt vermuten, dass VASP in unphysiologisch hohen Mengen toxisch für die Zellen ist. Diese Vermutung wird durch Daten von M. García Arguinzonis (unsere Arbeitsgruppe) unterstützt, die eine Zelllinie aus VASP-defizienten Mäusen durch Transfektion mit rekombinanten humanem VASP rekonstituierte. Beim Klonieren der erhaltenen stabil transfizierten Zellen und anschließender Expressionsanalyse ergab sich, dass alle gewonnenen Klone etwa gleich viel oder weniger VASP exprimierten als die entsprechende Zelllinie aus VASP (+/+) Mäusen. Eine bei diesem Verfahren mit anderen Proteinen gewöhnlich übliche, über dem physiologischen Wert liegende Expression, konnte nicht beobachtet werden (Garcia Arguinzonis *et al.*, 2002).



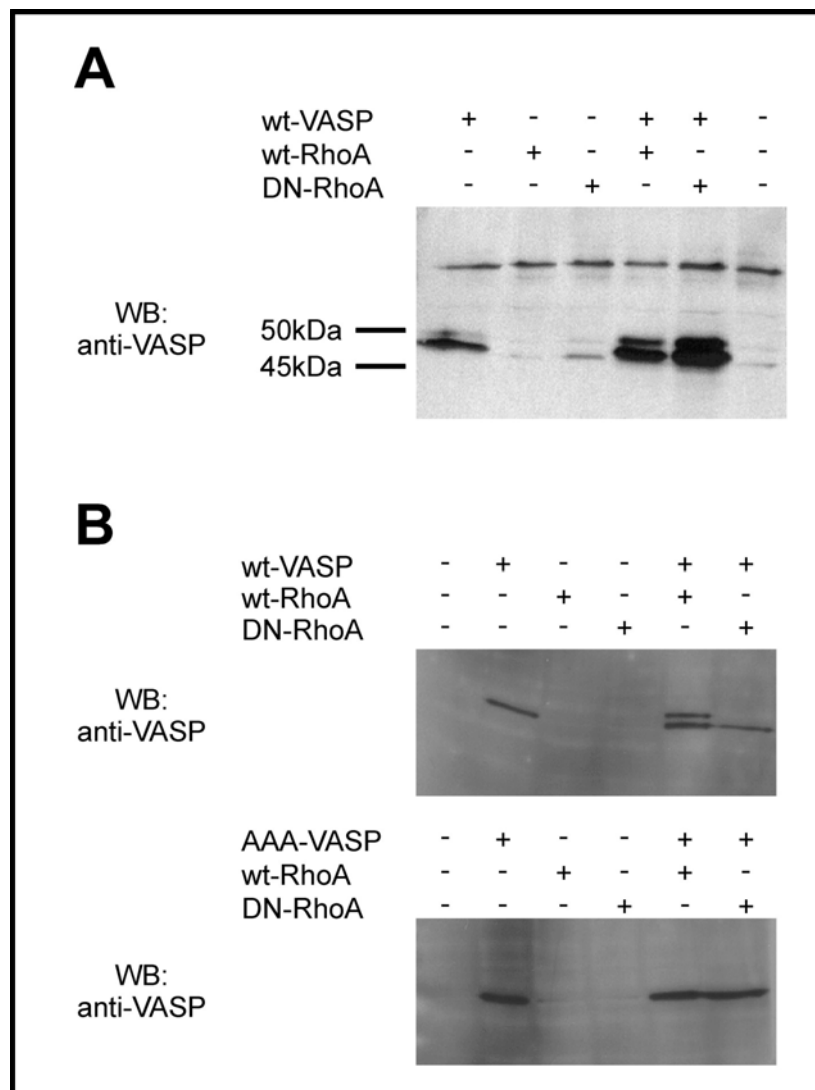
**Abb. 8: Die Expression von VASP nach transientscher Transfektion in PtK<sub>2</sub>-Zellen**

Es wurden jeweils wie angegeben 0, 10, 20 und 30 µg pcD-VASP Vektor mit Fugene transient in PtK<sub>2</sub>-Zellen transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Jeweils 5 µg der Zelllysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion von VASP erfolgte mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers und eines mit Meerrettich Peroxidase gekoppelten Zweitantikörpers und Chemilumineszenz-Reaktion. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

**4.3. VASP und Rho Überexpression erhöht den Expressionslevel von VASP**

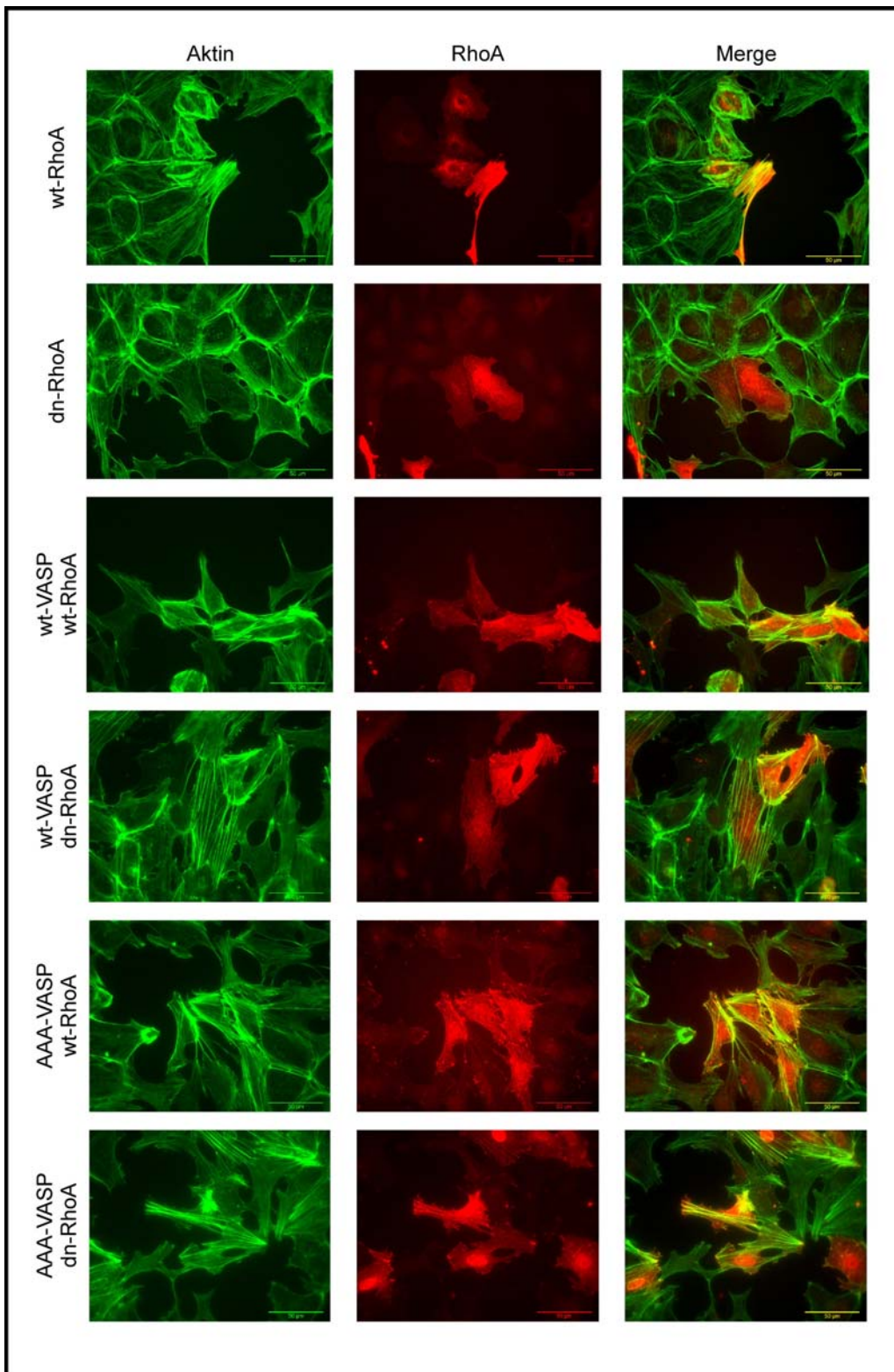
Die kleinen GTPasen der Rho-Familie regulieren den Auf- und Umbau des Aktin-Zytoskeletts. RhoA ist über seine Effektoren Rho-Kinase und mDia (mammalian Diaphanous) für die Bildung von Stressfasern verantwortlich (Nakano *et al.*, 1999). Mikroinjektion von RhoA in gehungerte Fibroblasten führt zur Stressfaser-Bildung, während Inhibition von RhoA mit dem C3 Toxin aus *Clostridium botulinum* die Bildung von Stressfasern hemmt (Burrige and Chrzanowska-Wodnicka, 1996). Da die Überexpression von VASP die Bildung von Stressfasern erhöht, ist es möglich, dass VASP in den Rho-Signaltransduktionsweg involviert ist. Um dies zu untersuchen, wurden PtK<sub>2</sub>-, NIH 3T3- und

Mesangial-Zellen sowohl mit humanem RhoA (im pRK5-myc Vektor, freundlicherweise überlassen von Dr. Alan Hall, London) als auch VASP transient kotransfiziert. Hierbei wurde sowohl wt- als auch dominant negatives RhoA (T19N) verwendet. Als Kontrolle dienten die Einzeltransfektionen. Unerwarteterweise erhöhte sowohl die Kotransfektion von wt- als auch dominant negativem RhoA die Expression von VASP sowohl in NIH3T3- (Abb. 9A) und Mesangial-Zellen (nicht gezeigt) um ein Vielfaches, während die Expression von RhoA unverändert bleibt (nicht gezeigt). RhoA scheint also die toxische Wirkung von überexprimiertem VASP zu reduzieren.



**Abb. 9: Kotransfektion von VASP und RhoA erhöht die Expression von VASP**

NIH3T3- (**A**) bzw. PtK<sub>2</sub>-Zellen (**B**) wurden transient mit wt- und AAA-VASP sowie wt- und dominant negativem (DN) RhoA sowohl einzeln als auch in Kombination transfiziert (jeweils 1 µg Plasmid). 24 h (**A**) bzw 48 h (**B**) nach der Transfektion wurden die Zellen in Laemmli-puffer aufgenommen, gleiche Mengen Zellysat wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression von VASP wurde durch Immunoblotting mit dem polyklonalen Antiserum M4 bestimmt. Deutlich ist in **A** die erhöhte VASP Expression bei Kotransfektion sowohl mit wt- als auch dominant negativem RhoA zu sehen. In **B** erscheint VASP als Doppelbande ausschließlich bei Kotransfektion von wt-VASP und wt-RhoA. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.



**Abb. 10: Immunfluoreszenzen von transient transfizierten PtK<sub>2</sub>-Zellen**

PtK<sub>2</sub>-Zellen wurden mit wt- oder dominant negativem RhoA, wt- oder AAA-VASP einzeln oder in Kombination wie angegeben transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und mit einem monoklonalen Maus Antikörper für RhoA (mittlere Spalte) und Oregon Green-Phalloidin für F-Aktin (linke Spalte) gefärbt. Eine Überlagerung der beiden Fluoreszenzbilder ist in der rechten Spalte gezeigt. Färbungen mit VASP und RhoA Antikörper ergaben, dass in mehr als 95 % der kotransfizierten Zellen beide Proteine exprimiert werden (nicht gezeigt). Weiter Erläuterungen siehe Text. Dargestellt sind repräsentative Zellen von drei voneinander unabhängigen durchgeführten Experimenten.



In PtK<sub>2</sub>-Zellen konnte keine Erhöhung der VASP-Expression bei Ko-Transfektion mit RhoA beobachtet werden, jedoch erscheint VASP im Immunoblot als Doppelbande nach Transfektion von wt-VASP und wt-RhoA. Diese ist durch eine Phosphorylierung von VASP an Ser157 zu erklären (Butt *et al.*, 1994) (Abb. 9B). Da weder dominant negatives RhoA die Phosphorylierung von wt-VASP zu Folge hatte, noch die Doppelbande bei Kotransfektion von AAA-VASP mit wt-RhoA auftrat, ist es wahrscheinlich, dass VASP in dem Signaltransduktionsweg von RhoA involviert ist und durch Aktivierung von RhoA phosphoryliert wird. Womöglich tritt dieser Effekt auch in NIH 3T3 und Mesangial-Zellen auf, wird jedoch bei der Verwendung des M4-Antiserums nicht erkannt.

Neben den *Western-Blot* Analysen wurden auch Immunofluoreszenzen von transfizierten PtK<sub>2</sub>-Zellen durchgeführt (Abb. 10A). Die Expression von wt-RhoA führt in diesen Zellen zu einer erhöhten Anzahl von Stressfasern, die jedoch nicht wesentlich verstärkt sind, so wie sie durch Überexpression von VASP entstehen. Nach Transfektion von dominant negativem RhoA lösen sich die Stressfasern in ca. 70-80% der Zellen vollständig auf (Abb. 10B). Diese Resultate sprechen dafür, dass die verwendeten humanen RhoA Konstrukte auch in den Zellen der Beutelratte ihre Funktion ausüben und mit den endogenen Komponenten des Signalweges interagieren können. Die Kotransfektion von VASP und RhoA führt in allen Fällen (wt- und AAA-VASP; wt- und dominant negatives RhoA) zur Ausbildung verstärkter Stressfasern, wie sie auch bei alleiniger Transfektion von VASP entstehen (Abschnitt 4.2., Abb. 7). In der Immunfluoreszenz wurden bei Kotransfektion von VASP und RhoA deutlich mehr transfizierte Zellen identifiziert als bei der Transfektion von VASP alleine. Auf die Bildung der F-Aktin Knäuel (Abschnitt 4.2.) hat die Koexpression sowohl von wt- als auch dominant negativem RhoA keinen Einfluss. Die Knäuel finden sich auch nach Koexpression sowohl von wt- als auch dominant negativem RhoA in etwa 10-20% der mit AAA-, jedoch nicht mit wt-VASP transfizierten Zellen. Diese Daten deuten an, dass VASP *downstream* von RhoA in dessen Signaltransduktionsweg liegt.

#### **4.4. Verstärkte Stressfasern und erhöhte Myosin-Leichte-Ketten-Phosphorylierung in VASP (-/-) gegenüber VASP (+/+) Fibroblasten**

Kardiale Fibroblasten aus VASP (-/-) Mäusen besitzen deutlich verstärkte und stabilere Stressfasern als diejenigen aus VASP (+/+) Tieren (Galler *et al.*, 2003; Garcia Arguinzonis, 2003). Diese Fasern sind deutlich dicker als die aus VASP (+/+) Fibroblasten und bleiben auch nach längeren Hungern der Zellen (Medium ohne Zusatz von FCS) bestehen, wohingegen sich die Stressfasern aus wt-Zellen auflösen und erst nach erneuter Stimulierung mit FCS neu bilden. Derselbe Unterschied konnte auch in primären Mesangialzellen aus VASP (+/+) und VASP (-/-) Mäusen festgestellt werden (Abb. 6), Abschnitt 4.2.) und ist somit weder zelltypspezifisch noch ein Zelllinien-Artefakt.

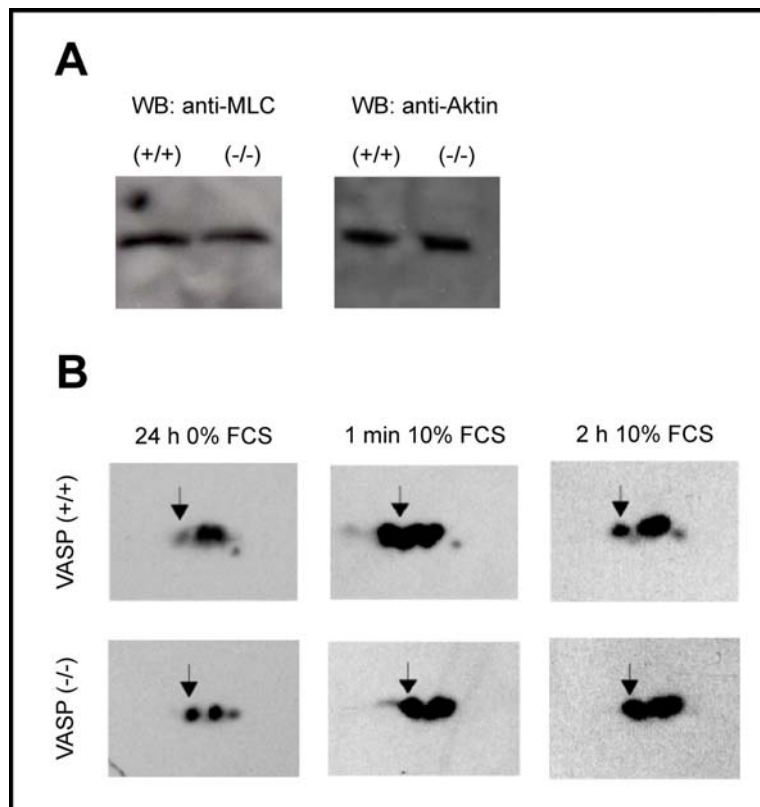
Die Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins (MLC für *myosin light chain*) an Serin 19 und Threonin 18 ist sowohl für die Bildung als auch den Erhalt von Stressfasern essentiell. Zudem ist sie ein Maß für die Kontraktion der Fasern: je stärker die MLC phosphoryliert ist, um so stärker kontrahieren die Fasern (Fukata *et al.*, 1999). Die für die Regulation verantwortlichen Enzyme, die MLC Phosphatase und die MLC Kinase, werden über verschiedene Signaltransduktionswege reguliert, die für den Aufbau und Umbau des Aktin-Zytoskeletts verantwortlich sind. So aktiviert die kleine GTPase Rho die Rho-Kinase, die sowohl die MLC direkt als auch die MLC-Phosphatase phosphoryliert, wodurch letztere inhibiert wird. Dadurch erhöht sich bei Aktivierung von Rho und Rho-Kinase der Gehalt an phosphorylierter MLC (Fukata *et al.*, 1999).

Um einen biochemischen Nachweis für die erhöhte Stabilität der Stressfasern in VASP (-/-) kardialen Fibroblasten (Abschnitt 4.2.; Garcia Arguinzonis, 2003) zu erbringen, wurde mittels 2D-Gelelektrophorese der Gehalt an phosphorylierter MLC ermittelt. Die 2D-Gelelektrophorese kann zur Auftrennung phosphorylierter und nicht-phosphorylierter Proteine genutzt werden, da phosphorylierte Proteine in der Regel einen stärker sauren isoelektrischen Punkt (PI) besitzen als die entsprechenden unphosphorylierten Polypeptide. Die 2D-Gelelektrophorese erfolgt in zwei Schritten: Im ersten Teil, der isoelektrischen Fokussierung, werden die Proteine nach ihrer Ladung und im zweiten Teil, einer herkömmlichen SDS-Gelelektrophorese, nach ihre Größe getrennt.

Die MLC wird in VASP (+/+) und VASP (-/-) Fibroblasten gleich stark exprimiert. Dies zeigt eine *Western-Blot*-Analyse von Zelllysaten der beiden Zelltypen, die mit einem MLC-Antikörper und als Ladungskontrolle mit einem Antikörper gegen Aktin inkubiert wurden (Abb. 11A).

Für die Untersuchung des Gehalts an phosphorylierter MLC wurden adhärente Fibroblasten kultiviert, wie beschrieben behandelt, mit PBS gewaschen und in Laemmli-Puffer geerntet. Die Proteine wurden anschließend mit der Methanol-Chloroform-Fällung nach Wessel und Flügge präzipitiert (Wessel and Flugge, 1984). Parallel dazu wurde je eine Schale zur Proteinbestimmung mit dem BCA-Assay aufgearbeitet. Je 100 µg Proteine wurden in Lysepuffer aufgenommen, auf IPG-Streifen aufgetragen und zunächst der isoelektrischen Fokussierung unterzogen. Anschließend erfolgte die Auftrennung über SDS-PAGE und der Nachweis der MLC über *Immunoblotting* mit einem MLC-spezifischen Antikörper. Es ergab sich ein mehrteiliges Muster, bei dem drei größere *Spots* in einer Reihe lagen. Je nach Proteingehalt waren zwei weitere *Spots* erkennbar. Der sauerste *Spot* (links) wurde mit einem spezifischen Antikörper als doppelt-phosphorylierte MLC identifiziert (nicht gezeigt, in Abb. 11B mit einem Pfeil markiert). Wie erwartet zeigte sich, dass die MLC an Serin 19 und Threonin 18 nach Serumentzug für 24 h in VASP (-/-) Fibroblasten deutlich stärker phosphoryliert war als in VASP (+/+) Zellen (Abb. 11B). Dies entspricht den noch

vorhandenen und scheinbar unveränderten Stressfasern nach Hungern in VASP (-/-) Zellen, wohingegen in wt-Zellen unter denselben Bedingungen keine bzw. kaum noch Fasern nachweisbar waren (Galler *et al.*, 2003; Garcia Arguinzonis, 2003). Im Gegensatz dazu konnte nach einer Minute Stimulation mit FCS kein Unterschied zwischen VASP (-/-) und VASP (+/+) Fibroblasten festgestellt werden. In der Immunfluoreszenz konnten nach fünfminütiger Stimulation wieder Stressfasern in VASP (+/+) Zellen nachgewiesen werden (Galler *et al.*, 2003; Garcia Arguinzonis, 2003). Nach zweistündiger Stimulation mit FCS war der Gehalt an phosphorylierter MLC in VASP (-/-) gegenüber VASP (+/+) Fibroblasten erneut erhöht. Auch in der Immunfluoreszenz konnte nach dieser Inkubationszeit kein Unterschied im Aktin-Zytoskelett gegenüber unbehandelten, permanent in 10 % FCS kultivierten Zellen beobachtet werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass der Wiederaufbau des Zytoskeletts in wt-Fibroblasten nach dieser Zeit abgeschlossen ist und der Gehalt an phosphorylierter MLC wieder abnimmt.



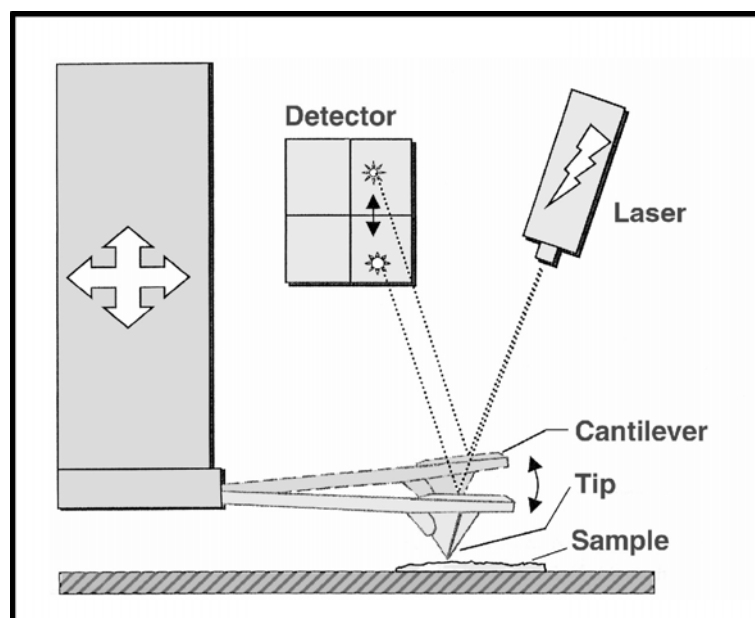
**Abb. 11: MLC-Phosphorylierung in VASP (+/+) und VASP (-/-) Fibroblasten**

**A:** Western-Blots von Zelllysaten von VASP (+/+) und (-/-) Fibroblasten. Es wurden jeweils 20 µg Protein pro Spur aufgetragen, geblottet und MLC (links) wurde mit einem monoklonalen Antikörper nachgewiesen. Die Detektion von Aktin (rechts) dient als Ladungskontrolle. **B:** VASP (+/+) und (-/-) Zellen wurden 24 h serumfrei inkubiert und anschließend für die angegebenen Zeiten mit 10 % FCS stimuliert. Die Phosphorylierung der MLC wurde über 2D-Gelelektrophorese und Immunoblotting untersucht. Die doppelt-phosphorylierte Form ist mit einem Pfeil markiert und wurde durch einen spezifischen Antikörper identifiziert (nicht gezeigt). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

## 4.5. Der Einfluss von VASP auf die Membranrigidität

### 4.5.1. Die Rasterkraftmikroskopie

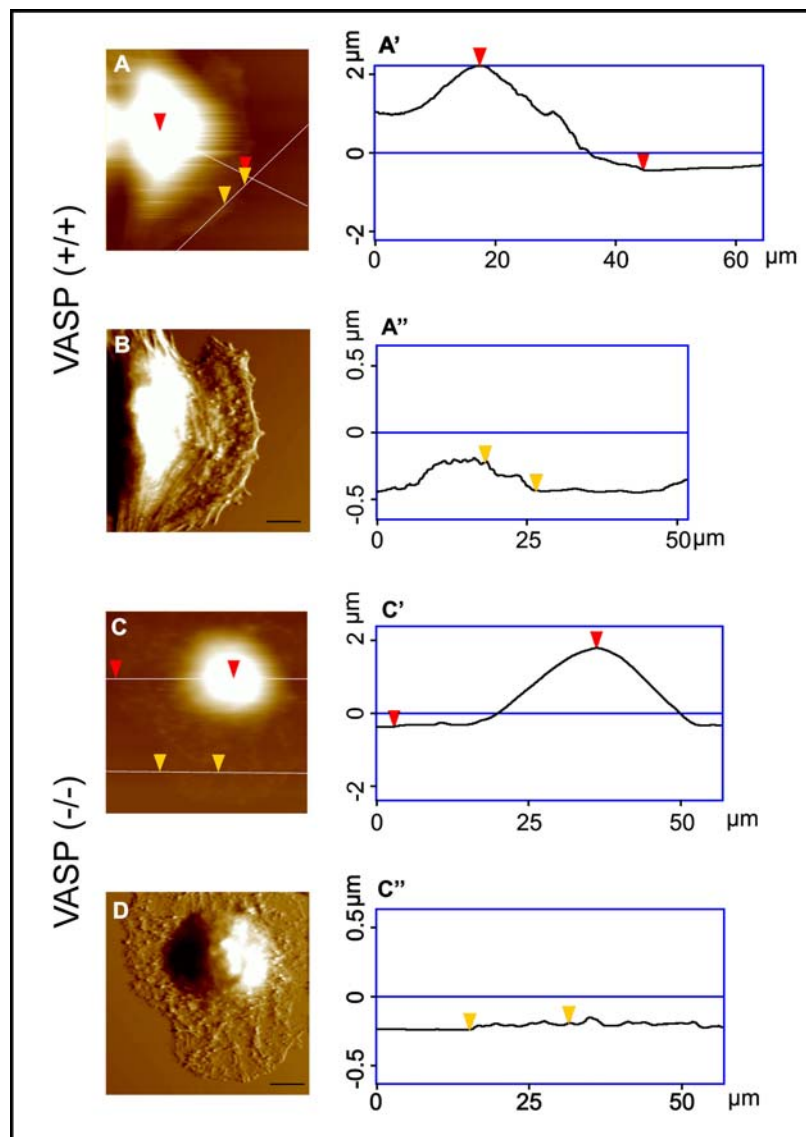
Zur Untersuchung der Morphologie von kardialen Fibroblasten wurden diese der Rasterkraftmikroskopie (engl.: *atomic force microscopy*, AFM) unterzogen. Diese Versuche wurden am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg unter der Anleitung von PD Dr. Werner Baumgartner durchgeführt. Im Kraftmikroskop wird eine Probe mit einer sehr feinen Spitze abgetastet, die über einen flexiblen Federbalken (engl.: *cantilever*) mit einem piezokeramischen Kristall verbunden ist. Beim Abtasten einer Oberfläche wird bei Unebenheiten über einen Rückkopplungsmechanismus die Auslenkung des Federbalkens mit Hilfe des Piezokristalls konstant gehalten. Aus dieser Information wird eine Topographie der Oberflächen erstellt. Durch die Trägheit des Regelkreislaufs kommt es jedoch auch zu kleinen Auslenkungen des Federbalkens, die über einen Laserstrahl und einer Photodiode detektiert und in einem Fehlerbild dargestellt werden (Abb. 12). Ein wesentlicher Vorteil der Rasterkraftmikroskopie gegenüber der konventionellen Lichtmikroskopie besteht in der sehr hohen Auflösung von bis zu 30 pm. Des Weiteren können biologische Proben, wie Zellen, ohne Fixierung in ihrer normalen Umgebung untersucht werden, wodurch Fehler und Artefakte durch die für die Rasterelektronenmikroskopie benötigte Behandlung ausgeschlossen werden.



**Abb. 12: Funktionsweise des Rasterkraftmikroskops**

Die Oberfläche der Probe wird mit einer feinen Spitze an einer mikromechanischen Blattfeder abgetastet. Die Blattfeder ist an einer Piezo-Rastereinheit befestigt, mit der die Probe zeilenweise abgerastert wird, während die Verbiegung der Feder durch einen Regelkreis konstant gehalten wird. Die Höhe der Basis und die Verbiegung der Blattfeder werden als Bildinformation abgespeichert. Die Abbildung wurde mir freundlicherweise von PD Dr. Werner Baumgartner überlassen.

In Abb. 13 sind beispielhaft rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von VASP (+/+) (A und B) und VASP (-/-) Fibroblasten (C und D) dargestellt. In diesen Bildern zeigt sich, dass VASP (-/-) Zellen stärker ausgebreitet sind als VASP (+/+) Zellen. Dies beruht auf einer erhöhten Aktivierung der kleinen GTPase Rac und deren Signaltransduktionsweg (Garcia Arguinzonis *et al.*, 2002). Durch die größere Ausbreitung bei gleichem Zellvolumen (Garcia Arguinzonis *et al.*, 2002) sind VASP-defiziente Zellen auch deutlich flacher im Bereich der Lamellipodien, was in der Darstellung des Zellquerschnitts zu erkennen ist (Abb. A', C',). Im Gegensatz dazu ist die Zellhöhe im Bereich des Zellkerns für beide Zelltypen in etwa gleich (Abb. A'', C'').

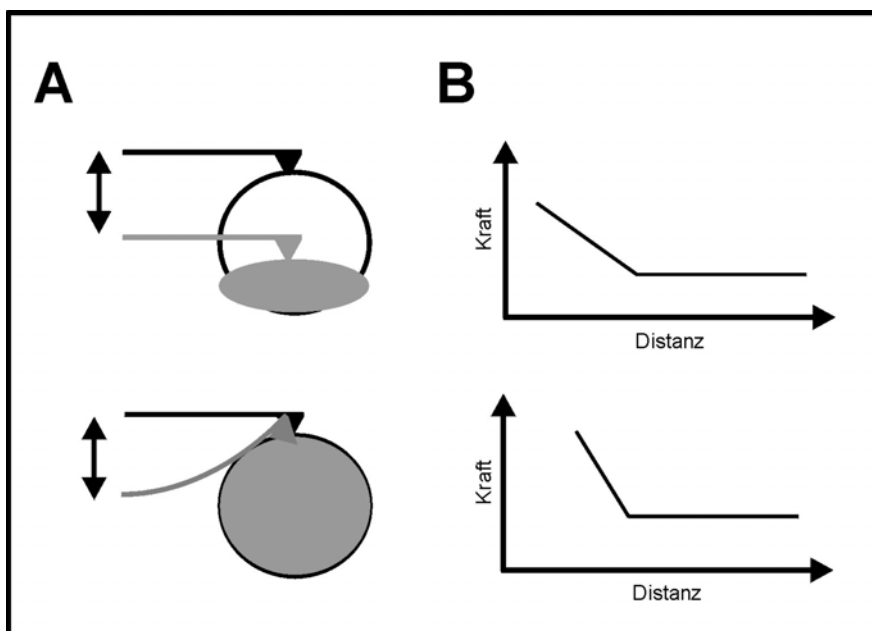


**Abb. 13: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen und Querschnittdarstellungen von VASP (+/+) und (-/-) Fibroblasten**

Dargestellt sind rasterkraftmikroskopische Bilder von VASP (+/+) (A und B) und VASP (-/-) (C und D) Zellen sowie aus den Höhenangaben berechnete Querschnitte (VASP (+/+) A' und A'', VASP (-/-) C' und C''). Die Lage der Querschnitte ist in den Abbildungen A und C durch weiße Linien wiedergegeben. Zur besseren Orientierung sind die roten und gelben Pfeilspitzen eingetragen. Balken: 15 µm.

#### 4.5.1.1. Kraft-Distanz-Kurven

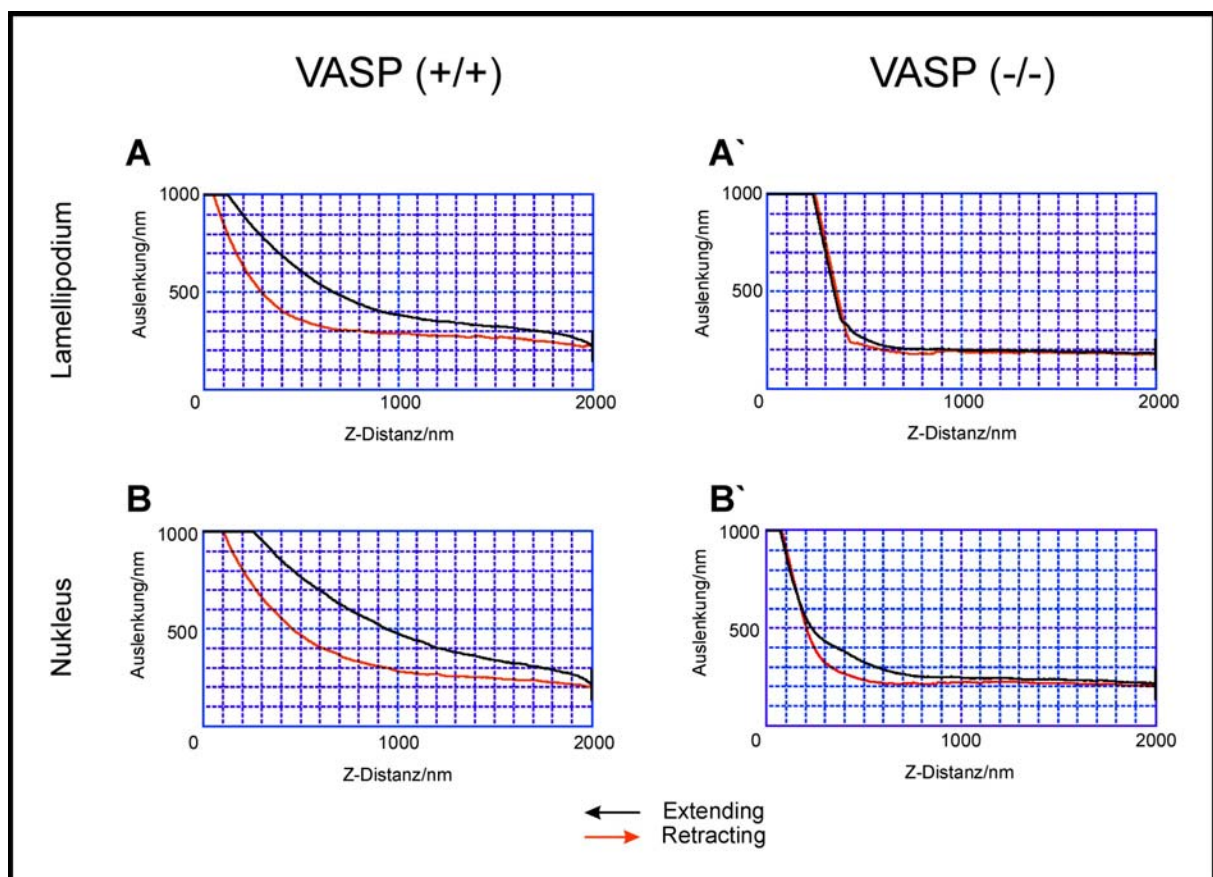
Das Rasterkraftmikroskop kann auch zu Messungen von sogenannten Kraft-Distanz-Kurven (engl.: *Force-distance-cycle*) genutzt werden. Hierbei wird die auf eine Oberfläche wirkende Kraft untersucht, indem man mit der Spitze des Mikroskops an einer Stelle der Probe mehrfach die Oberfläche eindrückt und dabei die Auslenkung des Federbalkens misst (Abb. 14). Nach Erreichen der Oberfläche wird die Spitze weiter heruntergefahren und dringt in die Probe ein. Die Eindringtiefe in die Probe hängt von deren Elastizität ab: je steifer die Oberfläche der Probe, um so weniger dringt die Spitze ein und um so größer ist dementsprechend die Auslenkung des Federbalkens; bei einer weichen Probe dringt die Spitze tiefer in die Probe ein und die Auslenkung ist geringer (Abb. 14). Man erhält Distanz-Kraft-Kurven, indem der Abstand der Spitze von der Probe auf der Abzisse und die gemessene Auslenkung des Federbalkens auf der Ordinate aufgetragen werden (Abb. 14). Dabei ergibt sich die Elastizität der Oberfläche aus der Steigung der Kurven: je steifer die Oberfläche, um so größer ist die Steigung. Da die Steigung beim Erreichen der unter der Probe liegenden Oberfläche immer 1 ist, kann bei der Auswertung der Kurven ausschließlich der Beginn der Steigung herangezogen werden (Simon *et al.*, 2003). Die Auslenkungen des Federbalkens werden sowohl beim Herunterfahren als auch beim Hochfahren der Spitze gemessen. Hierbei kommt es durch Wechselwirkungen der Spitze mit dem Medium, insbesondere durch Reibungskräfte, zu einer sogenannten Hysterese.



**Abb. 14: Schematische Darstellung von Kraft-Distanz Kurven**

**A:** schematische Darstellung der Messung von Kraft-Distanz Kurven: Das Rasterkraftmikroskop kann die Elastizität von Proben messen, indem die Spitze in die Probe gefahren wird, während die Auslenkung des Federbalkens gemessen wird. **B:** In den entsprechenden Kraft-Distanz Kurven kann die Festigkeit der Probe anhand der Steigung festgestellt werden.

Anhand der Kraft-Distanz-Kurven von VASP (+/+) und VASP (-/-) kardialen Fibroblasten ist zu erkennen, dass die Kurven von VASP-defizienten Zellen deutlich steiler sind und die Oberfläche damit steifer als die von wt-Zellen (Abb. 15). VASP-defizienten Zellen sind ausgebreiteter und im Bereich der Lamellipodien auch flacher als VASP (+/+) Zellen (Abb. 13, Abschnitt 4.5.1.). Es ist daher nicht auszuschließen, dass die scheinbar größere Oberflächensteifheit in VASP (-/-) Fibroblasten durch die unter den Zellen liegende Zellkulturschale verursacht wird. Daher wurden die Messungen sowohl am Lamellipodium (Abb. A, A'), wo die VASP (-/-) Zellen flacher sind als die VASP (+/+) Zellen, als auch im Bereich des Zellkerns durchgeführt (Abb. 15B, B'), an dem beide Zelltypen in etwa die gleiche Höhe besitzen (Abb. 13, Abschnitt 4.5.1.). In beiden Fällen waren VASP-defiziente Fibroblasten steifer als wt-Zellen, wodurch ein Einfluss der Zelldicke auf die Messergebnisse in diesen Versuchen ausgeschlossen werden konnte. Zudem zeigen diese Versuche, dass die Membranrigidität unabhängig vom Ort der Messung ist. Die gleichen Versuche wurden auch mit Primärzellen mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt (nicht gezeigt). Somit können auch Zelllinien-Artefakte ausgeschlossen werden.



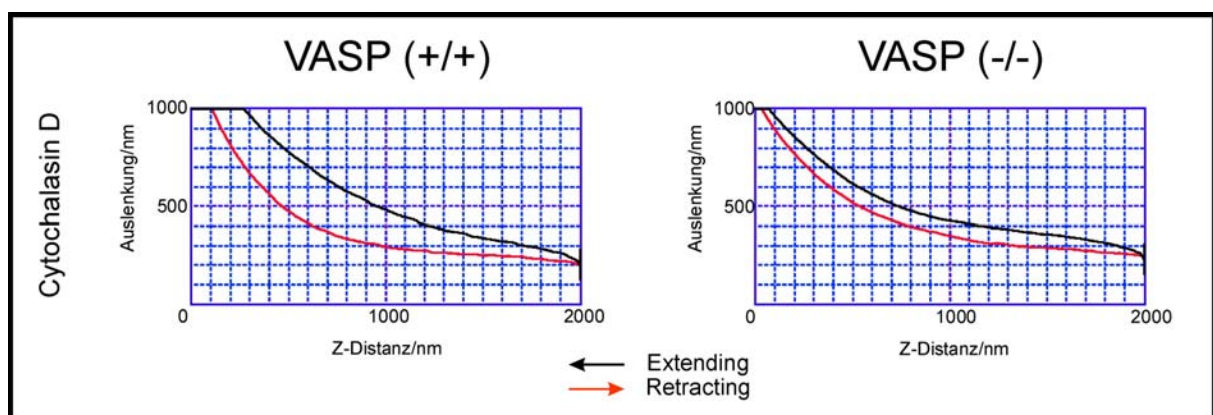
**Abb. 15: Kraft-Distanz Kurven von VASP (+/+) und (-/-) Fibroblasten**

Repräsentative Kraft-Distanz Kurven von VASP (+/+) (links) und (-/-) (rechts) Zellen. Die Messungen an unbehandelten Zellen wurden sowohl im Bereiche des Lamellipodiums (A und A') als auch im Bereich des Zellkerns (B und B') durchgeführt. In beiden Fällen ist die Oberfläche der VASP-defizienten Zellen wesentlich steifer.

Die Hysterese der Kraft-Distanz-Kurven beim Annähern („Extending“) und Zurückfahren („Retracting“) von der Probe ist in VASP (+/+) Fibroblasten deutlich stärker ausgeprägt als in VASP-defizienten Zellen. Dies zeigt wiederum, dass die elastischen Kräfte in VASP (+/+) Zellen vergleichbar mit viskosen Kräften sind, wohingegen in VASP (-/-) Zellen die elastischen Kräfte dominieren (Kurven sind fast kongruent).

#### 4.5.1.2. Bedeutung des Aktin-Zytoskeletts für die Membranrigidität

Die Membranelastizität wird zum überwiegenden Teil durch das Aktin-Zytoskelett bestimmt (Sheetz, 2001). Da VASP-defiziente Fibroblasten ein stärkeres Zytoskelett besitzen als VASP (+/+) Zellen (Galler *et al.*, 2003; Garcia Arguinzonis, 2003), ist es wahrscheinlich, dass die geringere Membranelastizität in VASP (-/-) Zellen gegenüber VASP (+/+)-Zellen durch das verstärkte Zytoskelett bedingt ist. Um dies genauer zu untersuchen, wurden Kraft-Distanz-Kurven nach Inkubation mit Cytochalasin D aufgenommen. Cytochalasin D ist ein Toxin, das an die „stumpfen“, schnell wachsenden Enden von Aktin-Filamenten bindet und deren weitere Polymerisation verhindert. Wegen der fortwährenden Depolymerisation an den „spitzen“ Enden, wirkt Cytochalasin D auf das Aktin-Zytoskelett depolymerisierend (Wakatsuki *et al.*, 2001). Immunofluoreszenz-Untersuchungen von VASP (+/+) und VASP (-/-) Fibroblasten, die für jeweils 30 min mit unterschiedlichen Cytochalasin D Konzentrationen inkubiert worden waren, zeigen, wie Cytochalasin D konzentrationsabhängig das Aktin-Zytoskelett auflöst (Abb. 17). Für die Messungen der Membranrigidität mit Kraft-Distanz-Kurven wurde eine Cytochalasin D Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  gewählt, die das Aktin-Zytoskelett nahezu vollständig auflöst (Abb. 17). Diese Konzentration führt jedoch nicht zu irreversiblen Schäden der Zellen, da sich die Zellen innerhalb von vier Stunden nach Zugabe von serumhaltigem Medium wieder vollständig erholen (Abb. 17).

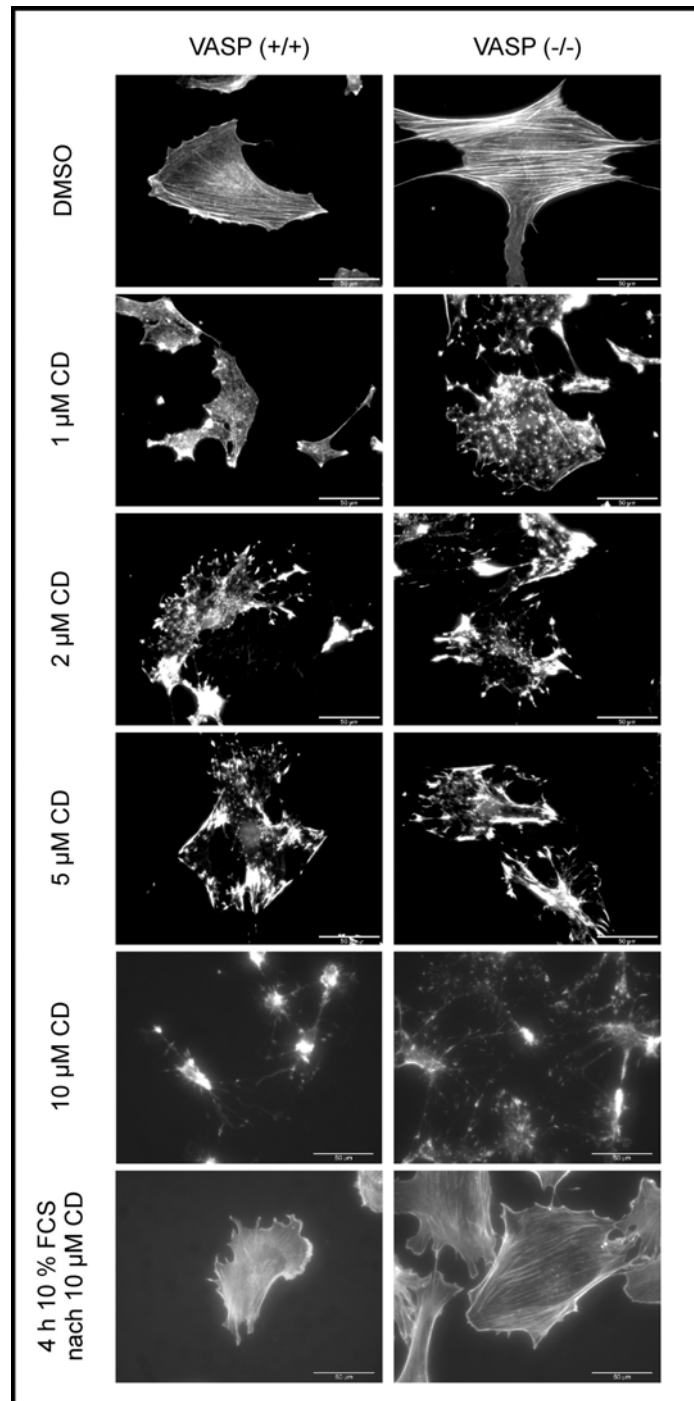


**Abb. 16: Kraft-Distanz-Kurven nach Behandlung mit Cytochalasin D**

Kraft-Distanz-Kurven von VASP (+/+) Zellen verändern sich nach Inkubation mit Cytochalasin D (30 min 10  $\mu\text{M}$ ) kaum, während die Membranplastizität in in VASP-defizienten Zellen deutlich verstärkt wird.



Die Membranfestigkeiten sowohl von VASP (+/+) als auch VASP (-/-) Fibroblasten nach Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Cytochalasin D waren sehr gering. Die Membranplastizität von VASP-defizienten Zellen erhöhte sich etwa 3-4-fach, die von VASP (+/+) Zellen blieb etwa unverändert (Abb. 16).

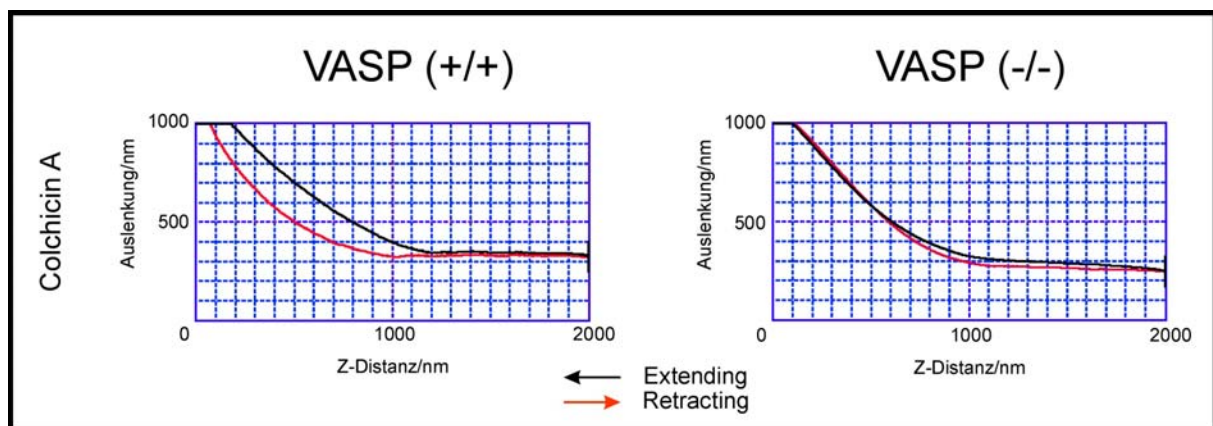


**Abb. 17: Immunfluoreszenzen von VASP (+/+) und (-/-) Fibroblasten nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentration von Cytochalasin D.**

VASP (+/+) (links) und (-/-) Zellen (rechts) wurden für 30 min mit den angegebenen Konzentrationen von Cytochalasin D behandelt, fixiert oder nach der Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Cytochalasin D gewaschen und für 4 h mit Medium + 10 %FCS inkubiert (letzte Zeile). F-Aktin wurde mit Oregon Green-Phalloidin gefärbt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

#### 4.5.1.3. Die Bedeutung der Mikrotubuli für die Membranrigidität

Im Gegensatz zum Aktin-Zytoskelett beeinflusst das Mikrotubuli-Zytoskelett die Membranfestigkeit kaum (Rotsch and Radmacher, 2000). Um dies in unserem System zu überprüfen, wurden VASP (+/+) und VASP (-/-) Fibroblasten vor den Messungen für 30 min mit 10  $\mu$ M Colchicin A inkubiert. Colchicin A ist ein Toxin, das Mikrotubuli auflöst, indem es einzelne Tubulin Moleküle bindet (Salmon *et al.*, 1984). Hierbei zeigte sich kein Effekt von Colchicin A auf die Membranfestigkeit in beiden Zelltypen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 18, Abschnitt 4.5.1.1.).



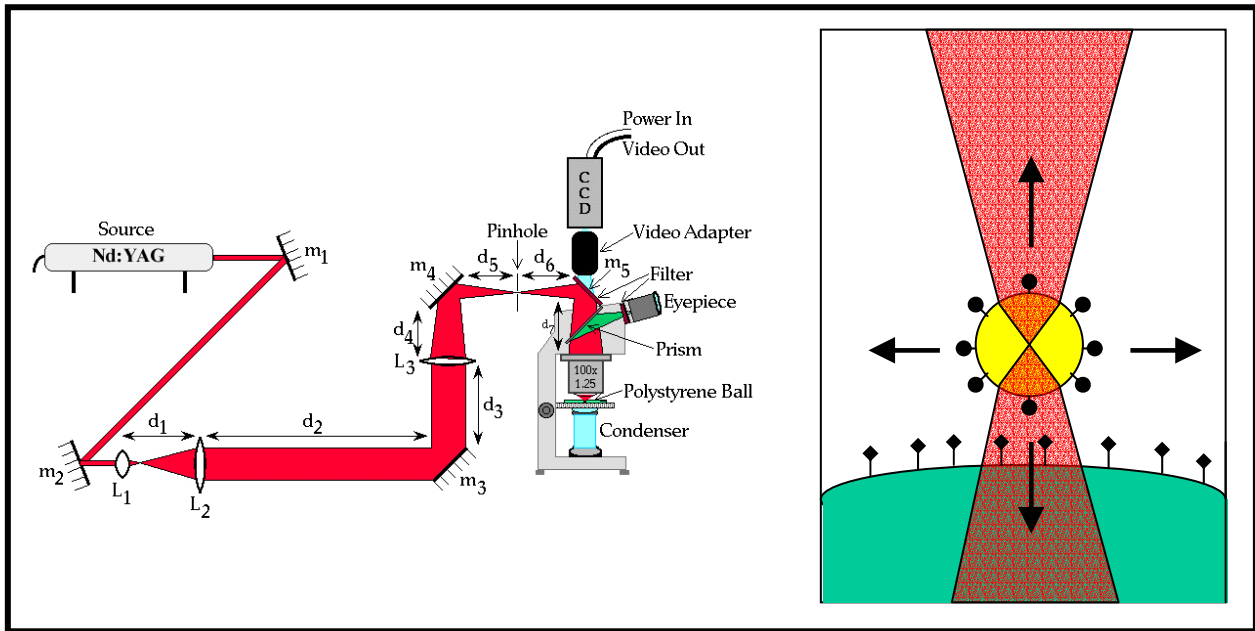
**Abb. 18: Kraft-Distanz-Kurven nach Behandlung mit Colchicin A**

Kraft-Distanz-Kurven von sowohl von VASP (+/+) (links) als auch VASP-defizienten Zellen (rechts) verändern sich nach Inkubation mit Colchicin A (30 min 10  $\mu$ M) kaum.

#### 4.6. Bindung von Fibronectin-beschichteten Perlen an VASP (+/+) und VASP (-/-) Fibroblasten

Da das Aktin-Zytoskelett und die Membranelastizität Einfluss auf die Adhäsion ausüben, wurden Experimente mit der sogenannten Optischen Pinzette (engl.: *Laser-Tweezer*) mit Fibronectin-beschichteten, paramagnetischen Polystyrol-Kügelchen durchgeführt (Durchmesser 2,8  $\mu$ m). Hierbei wirkt ein Laserstrahl (im Infrarotbereich, um die Zellen nicht zu schädigen) wie eine Pinzette auf die kleinen Perlen, den *beads*. Das Prinzip der Pinzette beruht auf Lichtbrechung und dem Impulserhaltungssatz: Der stark fokussierte Laserstrahl wird an den Kügelchen auf Grund des höheren Brechungsindex der Kugel im Verhältnis der sie umgebenden Flüssigkeit (hier: Medium) gebrochen. Dadurch wirkt ein Impuls auf das Licht und nach dem Impulserhaltungssatz wirkt die entgegengesetzte Kraft auf die Perle, so dass diese in den Fokus des Lasers gezogen wird (Felgner, 1998) (Abb. 19).

Für dieses Experiment wurden die Zellen bis zur Konfluenz auf Deckgläsern kultiviert und nach Präinkubation mit den unten erwähnten Substanzen in serumfreiem Medium mit der Laser-Pinzette untersucht (Abschnitt 3.2.2.5.).



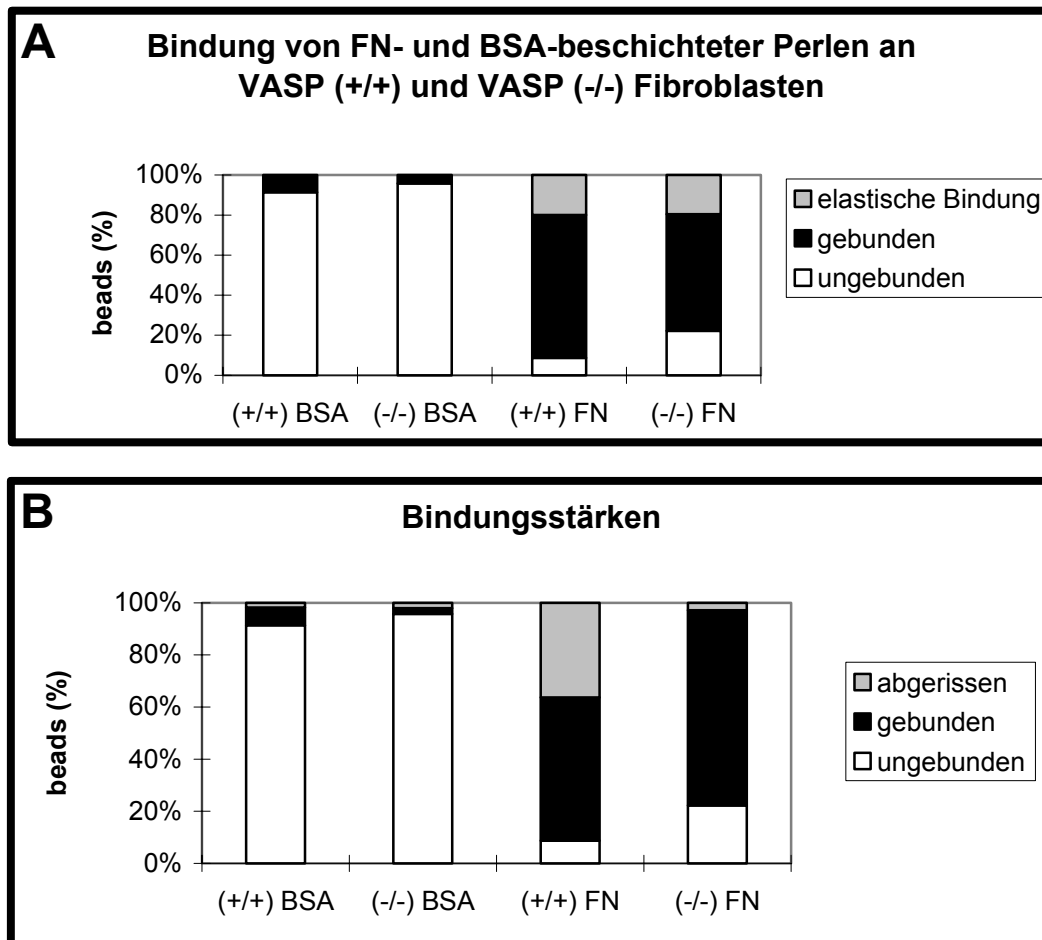
**Abb. 19: Schematische Darstellung des Aufbaus und Prinzips der Laser Pinzette**  
(freundlicherweise überlassen von PD Dr. Werner Baumgartner).

Fibronectin-beschichtete Perlen banden spezifisch an die Oberfläche von VASP (+/+) und VASP (-/-) Fibroblasten, wohingegen BSA-beschichtete Perlen nicht gebunden wurden (Abb. 20). Die Bindung Fibronectin-beschichteter Perlen konnte zudem durch Zugabe von Serum inhibiert werden (nicht gezeigt). Dieser Effekt beruht vermutlich auf der Kompetition des im Serum enthaltenen Fibronectins mit dem an den Perlen gebundenen Fibronectin.

Es wurden drei verschiedene Gruppen gefunden: a) ungebundene *beads*, b) *beads*, die banden, und c) *beads*, die banden und bei Bewegung des Laserfokus' mitgezogen werden konnten, aber bei einer bestimmten Entfernung aus dem Laserfokus sprangen und an ihren Ursprungsort zurückkehrten (Laserleistung jeweils 40 mW) (Abb. 20A). Die Gruppe c) wurde als elastische Membranfortsätze (engl.: *membrane tethers*) bezeichnet. Abb. 20A zeigt die Verteilung dieser drei Gruppen sowohl für Fibronectin- als auch BSA-beschichtete Perlen und VASP (+/+) bzw. VASP (-/-) Fibroblasten. Bei den BSA-beschichteten Perlen konnte kein VASP-abhängiger Unterschied festgestellt werden. Im Gegensatz dazu banden Fibronectin-beschichteten Perlen an VASP (-/-) Fibroblasten etwas weniger häufig als an VASP (+/+) Zellen (Abb. 20A).

Die Gruppen b) und c) (gebundene Perlen und solche, die elastische Membranfortsätze ausbildeten) konnten des weiteren in zwei Untergruppen unterteilt werden: es gab Perlen, die (elastisch) banden, aber abgerissen werden konnten, und Perlen, die banden und nicht abgelöst werden konnten (Abb. 20B). Hierbei zeigten Fibronectin-beschichtete Perlen eine signifikant stärkere Bindung an VASP (-/-) als an VASP (+/+) Zellen (Abb. 20B) ( $p < 0,01$ , binomial Test). Nur 2,8 % der an VASP (-/-) Fibroblasten gebundenen

Perlen konnten mit Laserleistungen von 160 mW abgerissen werden, wohingegen es 36 % der an wt-Fibroblasten gebundenen Perlen waren.



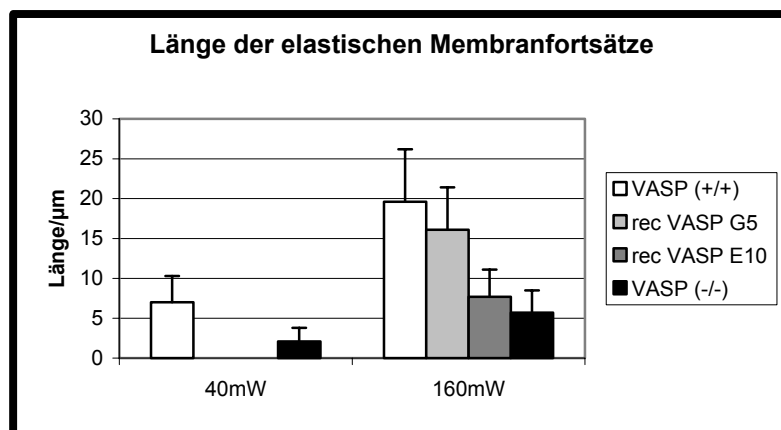
**Abb. 20: Bindung von Fibronectin- und BSA-beschichteten Perlen an VASP (+/+) und (-/-) Fibroblasten.**

**A:** Sowohl VASP (+/+) als auch VASP (-/-) Fibroblasten binden spezifisch Fibronectin-beschichtete Perlen. Die beads wurden als gebundene (schwarz) bezeichnet, wenn sie bei einer Laserleistung von 40 mW nicht verschoben werden konnten. Ein Teil der Perlen zeigte eine elastische Bindung (grau). Der Anteil ungebundener Perlen ist in weiß dargestellt. **B:** Fibronectin-beschichtete Perlen binden stärker an VASP-defiziente Zellen. Perlen, die gebunden hatten oder elastische Membranfortsätze ausbildeten, konnten zum Teil abgerissen werden (grau). Dieser Anteil ist in VASP (+/+) Fibroblasten signifikant höher als in VASP-defizienten Zellen. Der Anteil Perlen die mit dieser Leistung nicht abgerissen werden konnten ist in schwarz, der Anteil ungebundener Perlen in weiß dargestellt. Dargestellt sind die Ergebnisse dreier voneinander unabhängiger Experimente. Pro Beschichtung und Zelltyp wurden jeweils mindestens 100 Perlen ausgezählt.

Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtung von Maísa García Arguinzonis aus unserer Arbeitsgruppe, dass VASP-defiziente Fibroblasten in einem Zell-Adhäsions-Assay langsamer an Fibronectin adhären als die VASP (+/+) Zellen, jedoch nach Adhäsion wesentlich schlechter ablösbar sind, als VASP enthaltende Zellen (Galler *et al.*, 2003; Garcia Arguinzonis, 2003). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass VASP bei der Regulation der Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine eine Rolle spielt.

#### 4.6.1. Die Ausbildung von elastischen Membranfortsätzen

Da der Unterschied zwischen VASP (+/+) und VASP (-/-) Zellen in der Kraft der Adhäsion Fibronektin-beschichteter Kügelchen lag, wurden die elastischen Membranfortsätze (engl.: *membrane tethers*) genauer untersucht. Membranfortsätze konnten in 19,9 % der VASP (+/+) und 19,5 % der VASP (-/-) Zellen beobachtet werden. Um die Elastizität zu messen, wurden die Längen bei Laserleistungen von 40 und 160 mW gemessen. Dabei waren die Längen der elastischen Bindungen in VASP-defizienten Fibroblasten bei beiden gemessenen Laserleistungen (40 mW und 160 mW) drei- bis viermal kürzer als in VASP enthaltenen Zellen (Abb. 21). Hierbei handelte es sich nicht um einen Zelllinien-Artefakt, da primäre kardiale Fibroblasten denselben Unterschied aufwiesen (nicht gezeigt). Dieser Unterschied war zudem VASP-abhängig, denn in mit humanen VASP rekonstituierten VASP(-/-) Zellen, die VASP in etwa physiologischer Konzentration exprimieren (Klon G5; Garcia Arguinzonis *et al.*, 2002), entsprach die Länge in etwa der in VASP (+/+) Zellen gemessenen Länge. Im rekonstituierten Klon E10, der sehr geringe Mengen an humanem VASP exprimiert (Garcia Arguinzonis *et al.*, 2002) wurden hingegen Längen gemessen, die in etwa denen von VASP-defizienten Zellen entsprechen (Abb. 21).



**Abb. 21: Die Länge der elastischen Bindungen von Fibronektin-beschichteten Perlen**

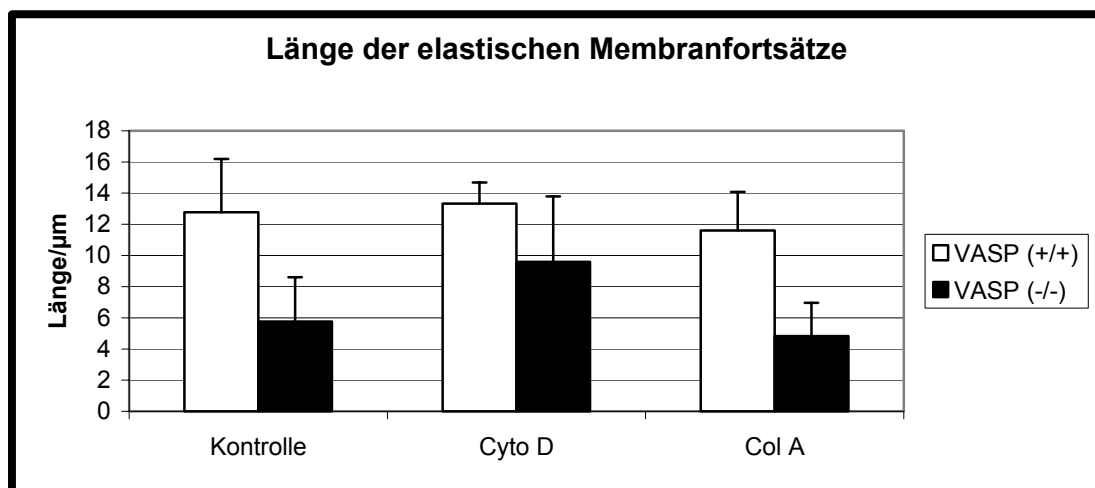
Die Länge der elastischen Bindungen wurde an VASP (+/+) (weiß), VASP (-/-) (schwarz) sowie VASP (-/-) Fibroblasten gemessen, die mit humanem VASP rekonstituiert wurden (Klon G5 (hellgrau): annähernd physiologischer Expressionslevel von VASP; Klon E10 (dunkelgrau): geringer Expressionslevel von VASP). Die experimentellen Bedingungen sind angegeben. 40/160mW: Laserleistung der Laser Pinzette. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 11-20 beads, die jeweils 2-5 mal gemessen wurden.

Diese Ergebnisse entsprachen den Erwartungen, da VASP (-/-) Zellen ein verstärktes und stärker kontrahiertes Aktin-Zytoskelett besitzen (Abschnitt 4.4.) und die Membranfestigkeit stark vom Aktin-Zytoskelett und der Verbindung des Zytoskeletts zur Membran abhängig ist (Sheetz, 2001).

#### 4.6.1.1. Bedeutung des Zytoskeletts für die Länge der elastischen Bindungen in VASP (+/+) und VASP (-/-) Fibroblasten

Um zu überprüfen, ob die unterschiedliche Länge der elastischen Bindungen tatsächlich durch das unterschiedlich starke Aktin-Zytoskelett bedingt ist, wurden die Zellen vor dem Experiment 30 Minuten mit 10  $\mu$ M Cytochalasin D inkubiert (Abb. 22).

Obwohl sich die Morphologie von sowohl VASP (+/+) als auch VASP (-/-) Zellen nach Cytochalasin D Behandlung stark änderte (Abb. 17; Abschnitt 4.5.1.2.), blieben die Längen der Bindungen in wt-Zellen konstant ( $13,3 \pm 1,4 \mu\text{m}$  nach Cytochalasin D-Behandlung im Vergleich zu  $12,8 \pm 3,4 \mu\text{m}$  in unbehandelten Zellen; Abb. 22). Im Gegensatz dazu vergrößerten sich die Längen in VASP-defizienten Zellen signifikant ( $p < 0,01$ ; Baumgartner-Weiß-Schindler-Test; Baumgartner *et al.*, 1998) von  $5,8 \pm 2,8 \mu\text{m}$  in unbehandelten Zellen auf  $9,6 \pm 4,2 \mu\text{m}$  nach Präinkubation mit Cytochalasin D. Dies entspricht etwa 70 % der Länge der Membranfortsätzen in VASP (+/+) Fibroblasten.



**Abb. 22: Die Länge der elastischen Bindungen von Fibronektin-beschichteten Perlen nach Behandlung mit Cytochalasin D oder Colchicin A.**

Die Länge der elastischen Bindungen wurde an VASP (+/+) (weiß) und VASP (-/-) (schwarz) Fibroblasten mit einer Laserstärke von 160 mW gemessen. Die experimentellen Bedingungen sind angegeben: Cyto D: 30 min Präinkubation mit 10  $\mu$ M Cytochalasin D, Col A: 30 min Präinkubation mit 10  $\mu$ M Colchicin A. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 11-20 beads, die jeweils 2-5 mal gemessen wurden.

Um einen Einfluss des Mikrotubuli-Zytoskeletts auf die Länge der elastischen Membranfortsätze auszuschließen (Abschnitt 4.5.1.3.), wurden VASP (+/+) und VASP-defiziente Fibroblasten vor den Messungen 30 min mit 10  $\mu$ M Colchicin A inkubiert. Wie schon bei den Messungen der Membranfestigkeit ergab sich auch hier kein Einfluss der Mikrotubuli auf die Länge der elastischen Fortsätze im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 22).

Diese und die Daten der Kraft-Distanz-Kurven (Abschnitt 4.5.1.2.) weisen darauf hin, dass VASP (+/+) Fibroblasten bereits ein sehr flexibles Aktin-Zytoskelett besitzen, da die

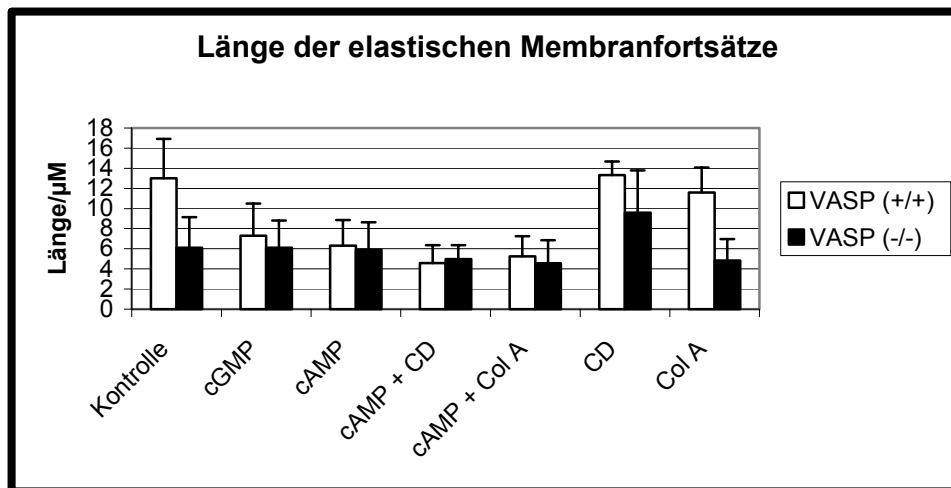
Behandlung mit Cytochalasin D in diesen Zellen weder zu einer erhöhten Membranplastizität (Abschnitt 4.5.1.2.), noch zu einer Verlängerung der elastischen Membranfortsätzen führt. Im Gegensatz dazu zeigen VASP-defiziente Zellen ein deutlich versteiftes Zytoskelett, wie es bereits aus den stabileren Stressfasern (Abschnitt 4.2.), der erhöhten MLC-Phosphorylierung (Abschnitt 4.4.) zu erwarten war.

In Abb. 22 ist zu erkennen, dass die gemessenen Längen der Membranfedern von VASP (+/+) Fibroblasten mit ca.  $13 \pm 3,4 \mu\text{m}$  in diesen Versuchen deutlich kürzer waren als aus den vorherigen Versuchen (Abschnitt 4.6.1.:  $19,6 \pm 6,6 \mu\text{m}$ ), wohingegen sie bei VASP-defizienten Zellen gleich lang waren (ca.  $6 \pm 2,8 \mu\text{m}$ ). Diese Werte unterscheiden sich allerdings weiterhin hoch signifikant ( $p < 0,01$ ; Baumgartner-Weiß-Schindler-Test; Baumgartner *et al.*, 1998). Vermutlich sind die Unterschiede durch eine neu aufgetaute Charge von Zellen und einem leicht veränderten Versuchsaufbau zu erklären.

#### **4.6.1.2. Einfluss von dem cGMP-Analog 8p-CPT-cGMP und dem Epac-Aktivator 8CPT-2Me-cAMP auf die Länge von elastischen Membranfortsätzen**

Da die Stimulation mit dem nicht-hydrolysierbaren cGMP-Analog 8p-CPT-cGMP die Adhäsion an Fibronectin von VASP (+/+), jedoch nicht von VASP (-/-) Fibroblasten erhöht (Garcia Arguinzonis, 2003), wurde der Einfluss diese Substanz auf die Länge der elastischen Bindungen untersucht. Hierzu wurden die Zellen 30 min mit  $100 \mu\text{M}$  8p-CPT-cGMP präinkubiert und anschließend wie oben beschrieben mit der Laser-Pinzette untersucht. Wie erwartet änderten sich die Längen der Membranfedern an VASP-defizienten Zellen nicht ( $6,1 \pm 2,7 \mu\text{m}$  in behandelten gegenüber  $5,7 \pm 2,8 \mu\text{m}$  in unbehandelten Zellen), wohingegen sie sich an VASP (+/+) Fibroblasten dramatisch, von ca.  $13 \mu\text{m}$  auf ca.  $7 \mu\text{m}$ , verkürzten (Abb. 23). Um zu überprüfen, ob dieser Unterschied durch ein deutlich verstärktes Aktin-Zytoskeletts verursacht wurde, wurden die Zellen nach Inkubation mit 8p-CPT-cGMP fixiert und das Aktin-Zytoskelett mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin visualisiert. Hierbei konnte kein Unterschied in der Stärke und Struktur des Zytoskeletts von behandelten zu nicht behandelten VASP (+/+) als auch VASP (-/-) Zellen beobachtet werden (nicht gezeigt).

Während dieser Arbeit wurde bekannt, dass 8p-CPT-cGMP jedoch nicht nur die PKG, sondern auch den Guaninnukleotid-Austausch-Faktor (GEF, engl: *guaninenucleotide exchange factor*) Epac (engl.: *exchange protein directly activated by cAMP*) aktiviert (Dr. Elke Butt, persönliche Mitteilung). Nach neueren Erkenntnissen übt Rap1 positiven Einfluss auf die Zell-Adhäsion aus (Arai *et al.*, 2001; Bertoni *et al.*, 2002; Caron *et al.*, 2000; de Bruyn *et al.*, 2002; Katagiri *et al.*, 2000; Ohba *et al.*, 2001; Sebzda *et al.*, 2002).



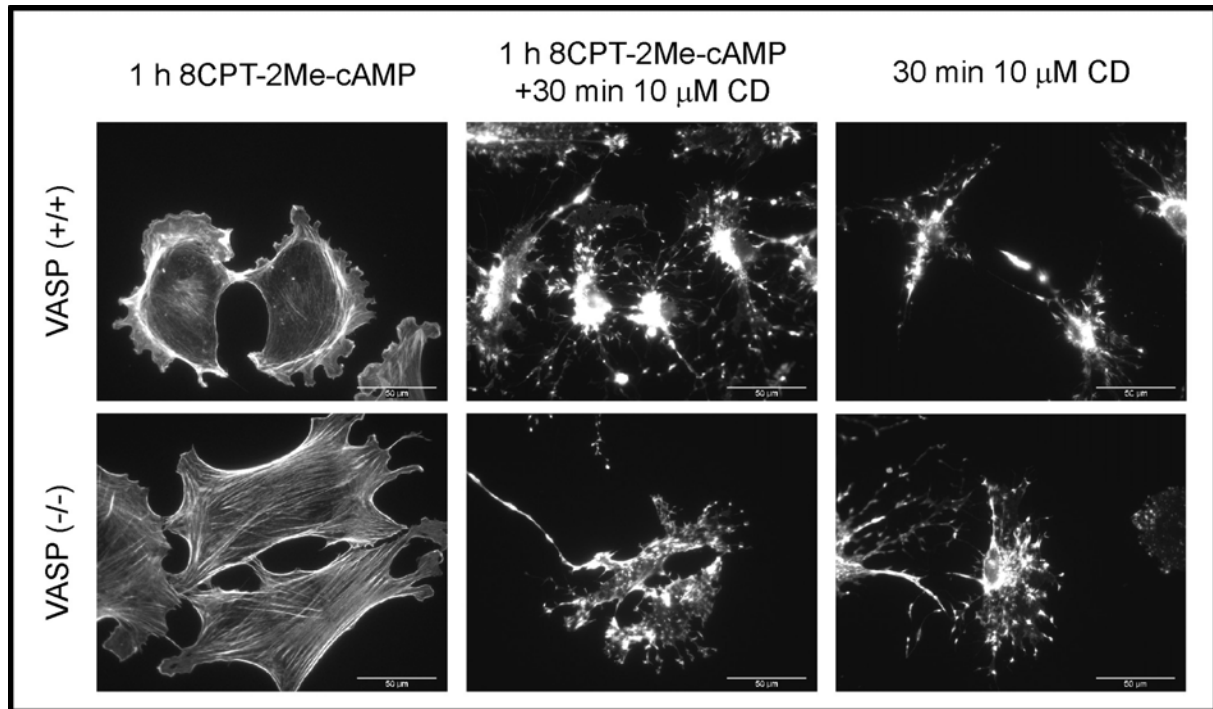
**Abb. 23: Membranfederlängen nach Behandlung mit 8p-CP-cGMP oder dem Epac-Aktivator 8CPT-2Me-cAMP**

Die Längen der Membranfedern wurden mit einer Laserleistung von 160 mW in VASP (+/+) (weiß) und VASP (-/-) (schwarz) Fibroblasten gemessen. Die Behandlung der Zellen ist wie folgt angegeben: cGMP: 30 min Präinkubation mit 100 µM 8p-CPT-cGMP; cAMP: 30 min Präinkubation mit 30 µM 8CPT-2Me-cAMP; cAMP + CD: 30 min Präinkubation mit 30 µM 8CPT-2Me-cAMP und weitere 30 min Präinkubation mit 30 µM 8CPT-2Me-cAMP in Kombination mit 10 µM Cytochalasin D; cAMP + ColA: 30 min Präinkubation mit 30 µM 8CPT-2Me-cAMP und weitere 30 min Präinkubation mit 30 µM 8CPT-2Me-cAMP in Kombination mit 10 µM Colchicin A; CD: 30 min Präinkubation mit 10 µM Cytochalasin D, Col A: 30 min Präinkubation mit 10 µM Colchicin A. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 11-30 *beads*, die jeweils 2-5 mal gemessen wurden.

Daher wurde auch der Einfluss eines spezifischen Epac-Aktivators 8CPT-2Me-cAMP (Enserink *et al.*, 2002) auf die Länge von elastischen Membranfortsätzen untersucht. Hierbei ergab sich, dass sich auch nach 30 bzw. 60 minütiger Inkubation mit 30 µM 8CPT-2Me-cAMP die Länge der elastischen Bindungen in VASP (+/+) Zellen deutlich signifikant verkürzte ( $p < 0,01$ ; Baumgartner-Weiß-Schindler-Test, (Baumgartner *et al.*, 1998)), wohingegen diese in VASP-defizienten Fibroblasten unverändert kurz blieben (nicht signifikant; Baumgartner-Weiß-Schindler-Test, Baumgartner *et al.*, 1998) (Abb. 23). F-Aktin-Färbungen mit fluoreszenz-markiertem Phalloidin zeigten für beide Zelltypen wiederum keine sichtbaren Änderungen des Aktin-Zytoskeletts (Abb. 24).

Wurden die Zellen zunächst für 30 min mit 30 µM 8CPT-2Me-cAMP und anschließend weitere 30 min mit 30 µM 8CPT-2Me-cAMP in Kombination mit 10 µM Cytochalasin D inkubiert, so blieben die elastischen Membranfortsätze im Vergleich zu ausschließlich mit 8CPT-2Me-cAMP behandelten Zellen überraschenderweise unverändert kurz (Abb. 23). Dagegen zeigten die Immunfluoreszenz-Bilder (Abb. 24) keinen Unterschied der ko-inkubierten Fibroblasten im Vergleich zu ausschließlich mit Cytochalasin D behandelten Zellen. Daher ist anzunehmen, dass die Länge der elastischen Bindungen nach Behandlung mit 8CPT-2Me-cAMP primär nicht durch die Stärke des Aktin-Zytoskeletts, sondern durch einen anderen Mechanismus bestimmt wird.



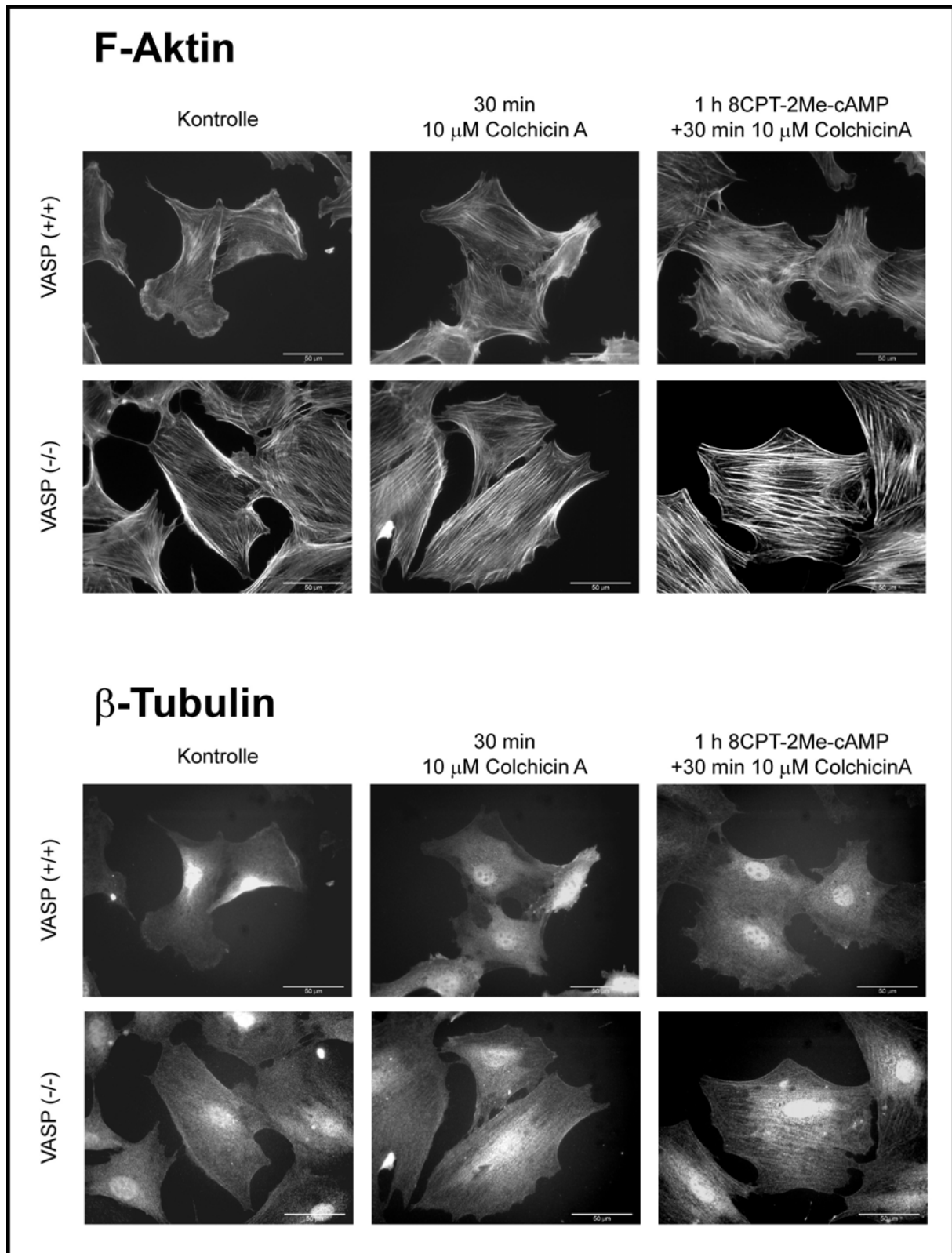


**Abb. 24: Immunfluoreszenzen von VASP (+/+) und (-/-) Fibroblasten nach Behandlung mit dem Epac Aktivator und Cytochalasin D.**

VASP (+/+) (obere Reihe) und (-/-) Zellen (untere Reihe) wurden für 30 min wie angegebenen mit 30  $\mu\text{M}$  8CPT-2Me-cAMP und/oder 10  $\mu\text{M}$  Cytochalasin D inkubiert und fixiert. F-Aktin wurde mit Oregon-Green-Phalloidin gefärbt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

Um einen Einfluss des Mikrotubuli-Zytoskeletts auf die Länge der elastischen Membranfortsätze nach Behandlung mit dem Epac-Aktivator 8CPT-2Me-cAMP auszuschließen, wurde die Länge der elastischen Bindung auch nach Ko-Inkubation von 8CPT-2Me-cAMP mit Colchicin A gemessen. Hierbei wurden, wie erwartet, die gleichen Ergebnisse erzielt wie nach Behandlung mit 8CPT-2Me-cAMP alleine (Abb. 23).

Eine Färbung des Mikrotubuli-Zytoskelett mit einem  $\beta$ -Tubulin spezifischen Antikörper bleibt erstaunlicherweise diffus (Abb. 25), obwohl Genexpression-Analysen eine starke Expression von  $\beta$ -Tubulin in beiden Zelllinien voraussagen (Garcia Arguinzonis, 2003) und der Antikörper in anderen murinen Zellen getestet wurde (PD Dr. Werner Baumgartner, persönliche Mitteilung). In den Immunfluoreszenzen von Colchicin A bzw. 8CPT-2Me-cAMP und Colchicin A behandelten VASP (+/+) und VASP (-/-) Zellen scheint das Aktin-Cytoskelett sowohl nach Colchicin A als auch bei der Ko-Inkubation mit 8CPT-2Me-cAMP in beiden Zelltypen leicht verstärkt zu sein (Abb. 25). Eine Verstärkung des Aktin-Zytoskeletts wird beim Auflösen der Mikrotubuli beobachtet (Liu *et al.*, 1998), somit kann in diesem Fall von einer wirksamen Konzentration ausgegangen werden.

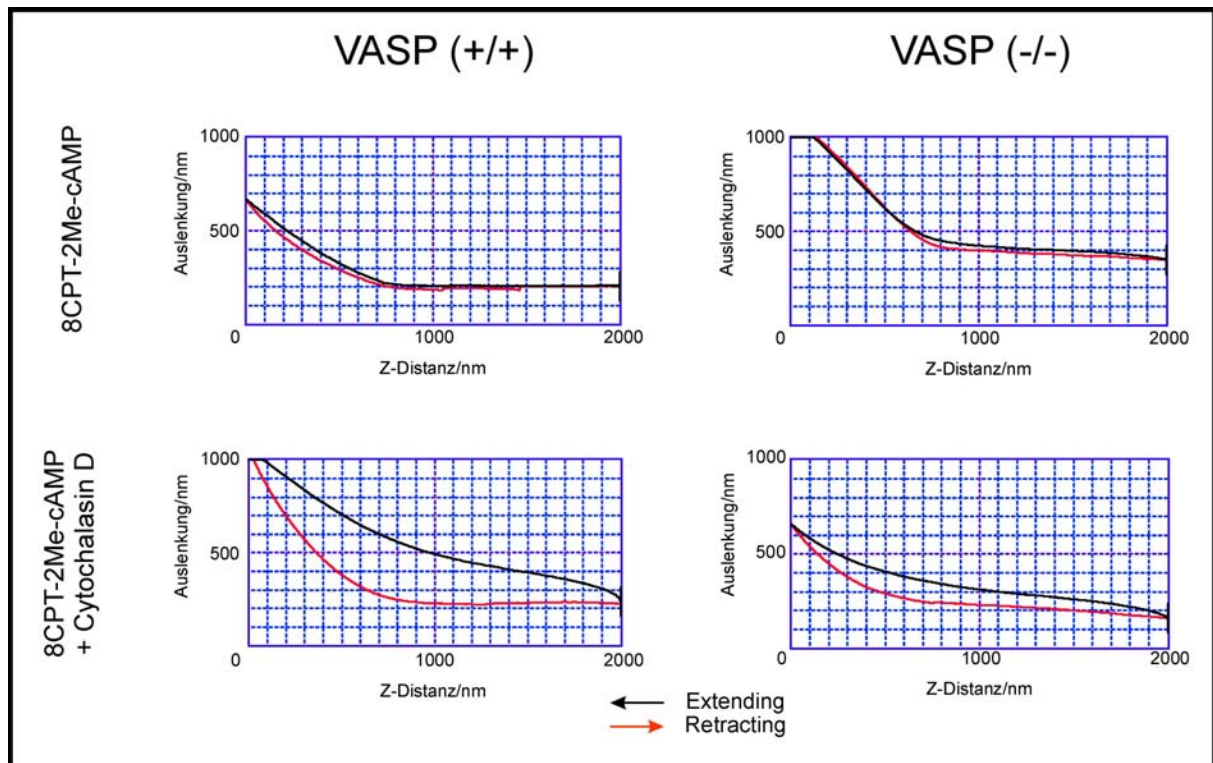


**Abb. 25: Immunfluoreszenzen nach von VASP (+/+) und (-/-) Fibroblasten nach Behandlung mit dem Epac Aktivator und Colchicin A.**

VASP (+/+) (obere Reihe) und (-/-) Zellen (untere Reihe) wurden für 30 min wie angegebenen mit 30  $\mu$ M 8CPT-2Me-cAMP und/oder 10  $\mu$ M Colchicin A inkubiert, fixiert F-Aktin wurde mit *Oregon Green*-Phalloidin,  $\beta$ -Tubulin mit einem  $\beta$ -Tubulin-Antikörper, gefolgt von einem Cy3-markiertem Sekundärantikörper, gefärbt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

#### 4.6.2. Einfluss des Epac-Aktivators 8-(4-chloro-phenylthio)-2'-O-methyladenosin-3',5'-cyclisches Monophosphat (8CPT-2Me-cAMP) auf die Membranrigidität

Da die Membranrigidität die Länge von elastischen Membranfortsätzen beeinflusst (Sheetz, 2001), wurden die Membranrigiditäten von VASP (+/+) und VASP (-/-) Fibroblasten nach Inkubation mit dem spezifischen Epac-Aktivator 8CPT-2Me-cAMP (Enserink *et al.*, 2002) alleine und in Kombination mit Cytochalasin D bestimmt.

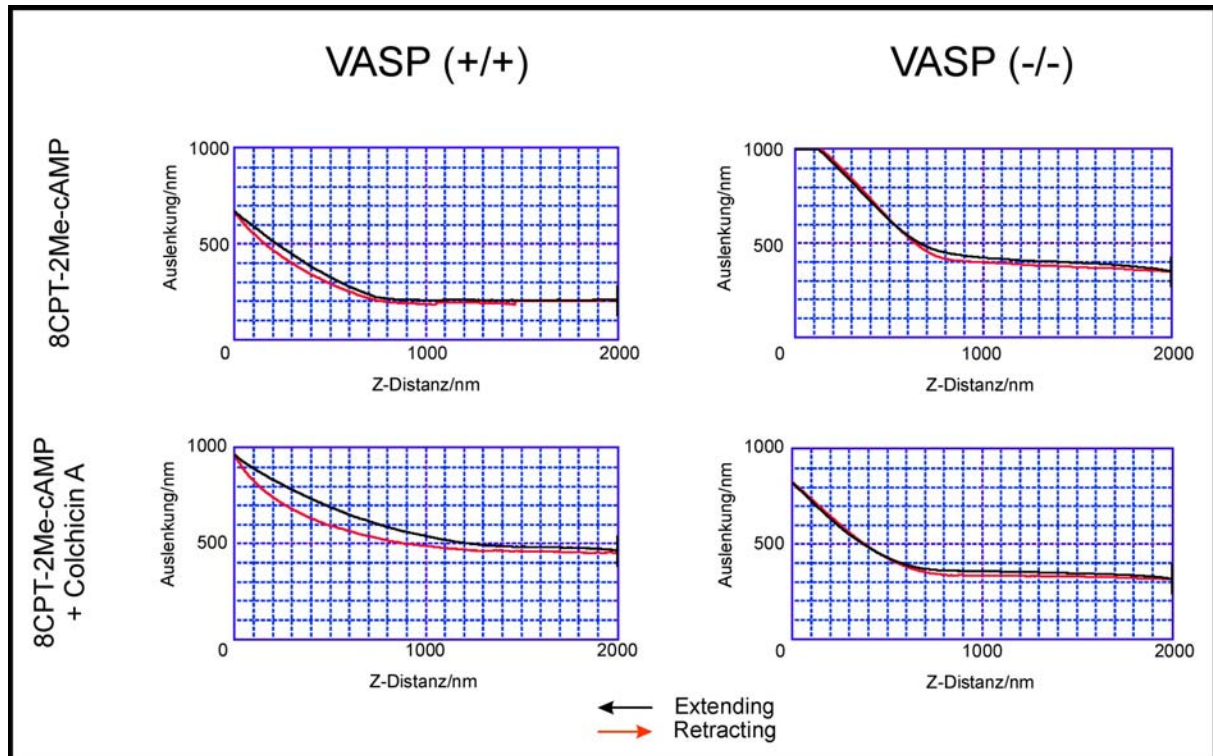


**Abb. 26: Kraft-Distanz-Kurven nach Behandlung mit dem Epac-Aktivator 8CPT-2Me-cAMP und Cytochalasin D**

Behandlung mit 8CPT-2Me-cAMP (1 h, 30  $\mu$ M) (obere Reihe) hat keinen Einfluss auf die Membranelastizität in beiden Zelltypen. Koinkubation mit 8CPT-2Me-cAMP (1 h, 30  $\mu$ M) und Cytochalasin D (30 min 10  $\mu$ M) (untere Reihe) führt bei VASP-defizienten Zellen (rechts) erneut zu einer geringeren Membranrigidität, während die von VASP (+/+) Zellen (links) nahezu unverändert bleibt. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis von drei voneinander unabhängigen durchgeführten Experimenten.

Nach Behandlung von sowohl VASP (+/+) als auch VASP (-/-) Fibroblasten mit 30  $\mu$ M 8CPT-2Me-cAMP konnte kein wesentlicher Unterschied in der Membranplastizität beider Zelltypen im Vergleich zu unbehandelten Zellen festgestellt werden (Abb. 15; Abb. 26). Bei zusätzlicher Inkubation mit 10  $\mu$ M Cytochalasin D (30 min mit 30  $\mu$ M 8CPT-2Me-cAMP, anschließend für weitere 30 min mit 30  $\mu$ M 8CPT-2Me-cAMP und 10  $\mu$ M Cytochalasin D) konnte für beide Zelltypen kein Unterschied im Vergleich zu den ausschließlich mit Cytochalasin D behandelten Zellen beobachtet werden. Immunfluoreszenz-Bilder der entsprechend behandelten Zellen zeigen keinen sichtbaren Einfluss von 8CPT-2Me-cAMP auf die Struktur des Aktin-Zytoskeletts (Abb. 24). Bei Koinkubation von 8CPT-2Me-cAMP

und Cytochalasin D (s. o.) konnte wie bei Messung der Membranrigidität kein Unterschied zu allein mit Cytochalasin D behandelten Zellen festgestellt werden (Abb. 24).



**Abb. 27: Kraft-Distanz-Kurven nach Behandlung mit dem Epac-Aktivator 8CPT-2Me-cAMP und Colchicin A**

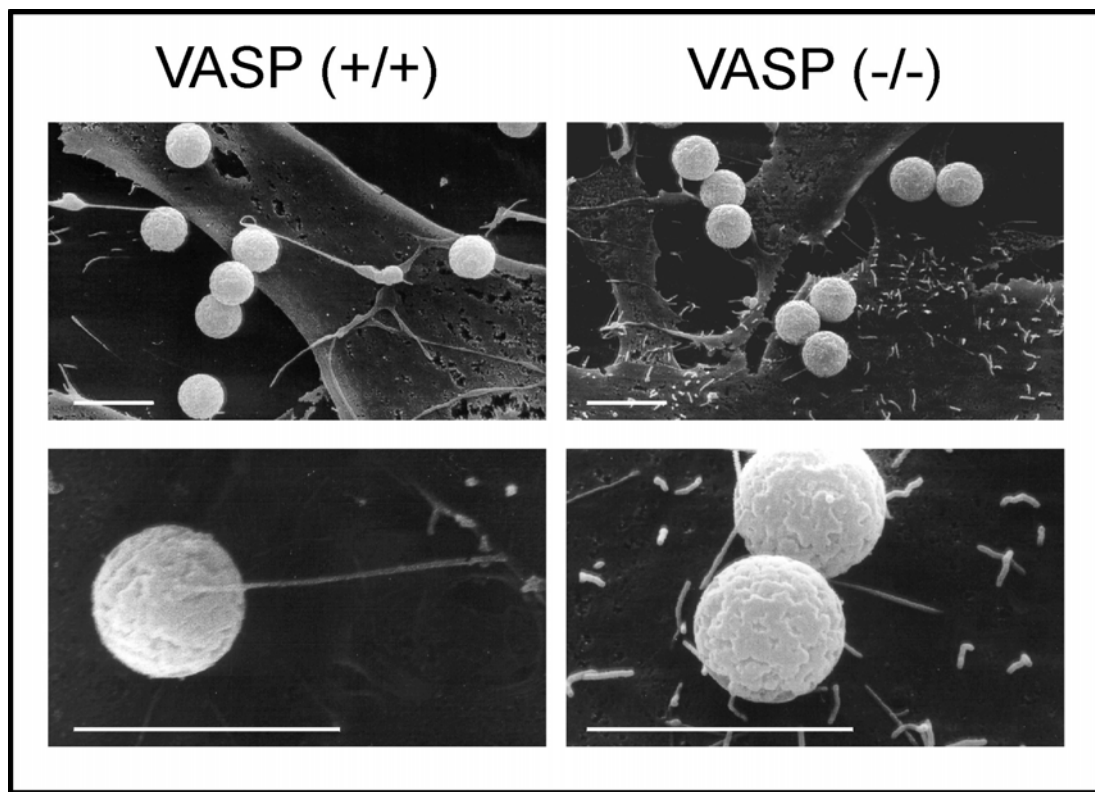
Behandlung mit 8CPT-2Me-cAMP (1 h, 30  $\mu$ M) (obere Reihe) hat keinen Einfluss auf die Membranelastizität in beiden Zelltypen. Koinkubation mit 8CPT-2Me-cAMP (1 h, 30  $\mu$ M) und Colchicin A (30 min 10  $\mu$ M) (untere Reihe) führt bei VASP-defizienten Zellen (rechts) erneut zu einer geringeren Membranrigidität, während die von VASP (+/+) Zellen (links) nahezu unverändert bleibt. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

Um erneut einen Einfluss des Mikrotubuli-Zytoskeletts auszuschließen, wurden die Membranfestigkeiten von VASP-defizienten und wt-Zellen auch nach Ko-Inkubation mit dem Epac-Aktivator 8CPT-2Me-cAMP und Colchicin A gemessen. Auch hierbei hat die Behandlung mit Colchicin A kein Effekt auf die Membranfestigkeit beider Zelltypen.

#### **4.7. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Bindung von Fibronektin-beschichteten Perlen an VASP (+/+) und VASP (-/-) Fibroblasten**

Um mehr über die Bindung Fibronektin-beschichteter Perlen an VASP (+/+) und VASP (-/-) Fibroblasten zu erfahren, wurden rasterelektronenmikroskopische Untersuchung durchgeführt. Hierfür wurden die *beads* auf die Zellen in serumfreiem Medium gegeben. Nach dem Absinken der Perlen wurden diese in einigen Fällen mit Hilfe eines Magneten orientiert und nach weiteren fünf Minuten wurde das Medium vorsichtig gegen 6,25 % ige

Glutaraldehydlösung zur Fixierung der Zellen ausgetauscht. Anschließend wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.2.2.4. beschrieben für die Rasterelektronenmikroskopie vorbereitet.



**Abb. 28: Rasterelektronische Aufnahmen Fibronectin-beschichteter Perlen auf VASP (+/+) und VASP (-/-) Fibroblasten.**

Balken 5  $\mu\text{m}$ .

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass ein Teil der gebundenen *beads* über Filopodien-ähnliche Strukturen mit der Zellmembran verbunden ist (Abb. 28). Diese Verbindung ist im Kontrollansatz an VASP (+/+) Zellen deutlich länger als an VASP-defizienten Fibroblasten (Abb. 28). Diese Beobachtungen entsprechen denen mit der Laserpinzette, was darauf schließen lässt, dass die in 4.6. beobachteten elastischen Membranfortsätze diesen Filopodien-ähnlichen Strukturen entsprechen. Allerdings entspricht die Länge der Filopodien nicht der maximalen Länge, die mit der Laserpinzette bei einer Leistung von 160 mW gemessen wurden. Dies liegt wahrscheinlich an der geringeren Kraftereinwirkung des Magneten gegenüber der Kraftereinwirkung der maximalen Laserleistung. Die mit der Laserpinzette gemessenen Unterschiede in der Länge der Membranfedern sind daher vermutlich durch die unterschiedliche Elastizität der Filopodien-ähnlichen Strukturen bedingt.

## 5. Diskussion

### 5.1. Die VASP-Phosphorylierung hemmt die Bündelung an F-Aktin

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die EVH2-Domäne die Bindung und Bündelung von VASP an F-Aktin vermittelt (Bachmann *et al.*, 1999; Huttelmaier *et al.*, 1999). Die Phosphorylierungsstelle Thr278 liegt in direkter Nachbarschaft zu dem für die F-Aktin Bindung essentiellen Block B (AS 259-276) (Bachmann *et al.*, 1999). Daher wurde der Einfluss der Phosphorylierung von VASP auf die Bindung und Bündelung an Aktin-Filamente untersucht. Hierfür wurden bereits von C. Bachmann prokaryotische Expressionvektoren hergestellt, in denen die VASP-Phosphorylierungsstellen zu Alanin mutiert waren (Bachmann, 1999). Die aufgereinigten Proteine wurden sowohl unphosphoryliert als auch phosphoryliert einem Aktin-Bindungs und -Bündelungs Assay unterzogen (Abschnitt 4.1.). Um unspezifische elektrostatische Interaktionen auszuschließen (Bachmann *et al.*, 1999), wurde eine hohe Salzkonzentration von 120 mM KCl gewählt. Überraschenderweise ergab sich, dass die F-Aktin-Bindung und -Bündelung durch Phosphorylierung der beiden Ser157 und Ser239 am stärksten reduziert wurde. Die Phosphorylierung des Thr278 spielt für diese Funktion von VASP keine nachweisbare Rolle (Abschnitt 4.1.). Möglicherweise ist der mangelnde Einfluss von phosphoryliertem Thr278 auf die Interaktion von VASP mit F-Aktin durch die geringe Phosphorylierung dieser Stelle sowohl durch die PKA als auch durch die PKG bedingt (Butt *et al.*, 1994; Harbeck *et al.*, 2000).

Unabhängig hiervon untersuchten auch Harbeck *et al.* den Einfluss der Phosphorylierung von rekombinanten, murinem VASP auf die F-Aktin-Bindungs- und Aktin-Nukleations-Aktivität. Beide Funktionen von VASP wurden in Abhängigkeit von dem Grad der Phosphorylierung gehemmt (Harbeck *et al.*, 2000). Hierbei scheint die Phosphorylierung der beiden Serine auf die Aktin-Nukleations-Aktivität additiv zu wirken, wohingegen die F-Aktin-Bindung scheinbar stärker durch Phosphorylierung von Ser235 inhibiert wurde. Phosphorylierungs-imitierende Aspartat- und Glutamat-Mutanten konnten nur in Kombination aller drei Phosphorylierungsstellen die Interaktion mit F-Aktin reduzieren. Eine Analyse der Phosphorylierungs-Reihenfolge ergab, dass bei Inkubation mit der PKA zunächst an Ser153, dann an Ser235 und erst nach längeren Inkubationszeiten an Thr274 phosphoryliert wurde (entsprechend Ser157; Ser239 und Thr278 in humanem VASP) (Harbeck *et al.*, 2000). Hierdurch werden die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt, wonach die Phosphorylierung der beiden Serine die Interaktion mit F-Aktin am stärksten hemmt. Es ist daher auch unwahrscheinlich, dass die geringere Phosphorylierungseffizienz der PKA an Thr278 (Butt *et al.*, 1994) eine Bedeutung zukommt, da bei den Versuchen von Harbeck *et al.* die Inhibition

der F-Aktin Bindung bereits nach kurzer Phosphorylierung von VASP erfolgte, nach der noch keine Phosphorylierung von Thr274 nachgewiesen werden konnte (Harbeck *et al.*, 2000).

Um zu überprüfen, ob der konservierte Block B direkt F-Aktin bindet wurden an Thr278 phosphorylierte und unphosphorylierte Block B-Peptide (VASP-AS 259-283) an Ovalbumin gekoppelt und einem F-Aktin-Bindungs Assay unterzogen (Abschnitt 4.1.). Hierbei, und in Mikroinjektionsexperimenten mit humanen Fibroblasten, konnte keine direkte Interaktion dieser Peptide mit Aktin-Filamenten nachgewiesen werden. In den *in vitro* Versuchen wurde eine KCl-Konzentration von 20 mM gewählt, um auszuschließen, dass die Bindung der kleinen Peptide durch eine zu hohe KCl-Konzentration zu stark geschwächt wird. Da jedoch auch in Zellen keine Kolo-kalisation mit F-Aktin gezeigt werden konnte, ist es unwahrscheinlich, dass die lineare Aminosäuresequenz dieser Peptide direkt die Interaktion von VASP mit F-Aktin vermittelt. Vermutlich ist diese Sequenz zu kurz (AS 259-283), um eine nachweisbare Interaktion auszubilden, denn längere Sequenzen sind durchaus in der Lage F-Aktin zu binden. So binden bei 33 mM KCl und 4°C Konstrukte der Aminosäuren 259-380 stark und Konstrukte der Aminosäuren 259-342 in geringerem Maß an F-Aktin (Bachmann *et al.*, 1999). Beide Konstrukt lokalisieren nach transienter Transfektion in eukaryotischen Zellen an Stressfasern, wobei das kürzere Konstrukt hierzu nur in sehr geringem Maße fähig ist (Bachmann *et al.*, 1999). Vermutlich sind die Peptide selber zu kurz, um die für die F-Aktin-Bindung benötigte Tertiärstruktur auszubilden.

Ein weiteres F-Aktin bindendes Protein, das als Substrat der PKA und PKG in humanen Thrombozyten entdeckt wurde, ist LASP (LIM und SH3 Protein) (Butt *et al.*, 2003). Auch für dieses Protein konnte eine Reduktion der F-Aktin-Bindung nach Phosphorylierung nachgewiesen werden (Butt *et al.*, 2003). Zudem konnte im Rahmen dieser Arbeit durch transiente Transfektion in PtK<sub>2</sub>-Zellen verschiedener Phosphorylierungs-Mutanten eine Umverteilung des phosphorylierten Proteins gezeigt werden. So befinden sich wt-LASP und S146A-LASP (die Alanin-Mutante der Phosphorylierungsstelle Serin 146) überwiegend am Rand von Lamellipodien und in fokalen Kontakten. Dagegen ist die Phosphorylierungs-imitierende S146D-Mutante diffus im Cytosol lokalisiert (Butt *et al.*, 2003)

## **5.2. Überexpression von VASP induziert die Bildung von Stressfasern:**

### **Hinweise auf VASP als Scaffold-Protein**

Die Überexpression von VASP in unterschiedliche Zelllinien bewirkt die Bildung von Stressfasern in diesen Zellen (Price and Brindle, 2000 und diese Arbeit) sowie in einigen Fällen die Ausbildung von Membranruffles (Price and Brindle, 2000). Bei stärkerer Vergrößerung ist zudem ersichtlich, dass sich benachbarte Stressfasern in VASP überexprimierenden Zellen kreuzen (Abb. 7). Erstaunlicherweise gleicht dieser Phänotyp den

von VASP-defizienten Zellen (Abb. 6; Bachmann, 1999; Galler *et al.*, 2003; Garcia Arguinzonis, 2003).

Der Einfluss von VASP auf die Bildung von Stressfasern kann einerseits durch den direkten Einfluss von VASP auf die Organisation, Dynamik und Ausbildung von Aktin-Filamenten begründet werden. So besitzt VASP F-Aktin-Bindungs- und Bündelungs-Aktivität (Bachmann *et al.*, 1999; Harbeck *et al.*, 2000) und stabilisiert Aktinfilamente, indem es die auflösende Aktivität von Gelsolin hemmt (Bearer *et al.*, 2000) und mit der Bindung von Capping Protein an die stumpfen, schnell wachsenden Enden von F-Aktin konkurriert (Bear *et al.*, 2002). Auf der anderen Seite ist VASP in Signaltransduktionswege involviert, die das Aktin-Zytoskelett regulieren (Garcia Arguinzonis *et al.*, 2002).

Der direkte Einfluss von VASP auf die Mikrofilamente kann jedoch schwerlich die Gemeinsamkeiten zwischen Deletion und Überexpression von VASP erklären. Ein wichtiger Hinweis auf den möglichen Mechanismus liefern die Beobachtungen, dass derselbe Stressfaser-Phänotyp sowohl in Abwesenheit als auch nach Überexpression von VASP entsteht (Abschnitt 4.2.; Bachmann, 1999; Galler *et al.*, 2003; Garcia Arguinzonis, 2003). Ein ähnlicher Effekt wurde für *Dictyostelium* VASP beobachtet: Sowohl DdVASP-defiziente- als auch überexprimierende Zellen wandern in einem Chemotaxis-Assay aufgrund einer erhöhten Anzahl lateraler Pseudopodien langsamer als die entsprechenden Wildtyp-Zellen (Han *et al.*, 2002). Dieser Effekt, dass Überexpression und Deletion eines Proteins denselben Effekt auslösen, verursachen gewöhnlich sogenannte *Scaffold*-Proteine. Die Interaktion eines *Scaffold*-Proteins mit vielen verschiedenen Signal- und Modulatorproteinen führt zur Bildung eines Multi-Proteinkomplexes.

*Scaffold*-Proteine besitzen wichtige Funktionen: So können sie einen *Cross-Talk* zwischen unterschiedlichen Signalwegen verhindern, die dieselben Komponenten nutzen (Juliano, 2002). Des Weiteren können *Scaffold*-Proteine Signalkomponenten an spezialisierte zelluläre Strukturen lokalisieren oder eine Relokalisation aktiver Moleküle während der Signalübertragung bewirken (Juliano, 2002). Zudem sind *Scaffold*-Proteine in der Lage, ein einziges eingehendes Signal durch Bindung an mehrere Signalmoleküle an verschiedene Signalwege weiterzugeben. Hierbei kann das Signal entweder amplifiziert oder auch inhibiert werden, je nach Verhältnis der aktiven Signalkomponenten zum *Scaffold*-Protein (Burack and Shaw, 2000; Juliano, 2002; Levchenko *et al.*, 2000). Nur ein annähernd stöchiometrisches Verhältnis von *Scaffold*-Proteinen zu ihren Bindungspartnern ermöglicht eine effektive Zusammensetzung von funktionellen Signal-Komplexen (Burack and Shaw, 2000; Juliano, 2002; Levchenko *et al.*, 2000). So können sich bei der Deletion von *Scaffold*-Proteinen keine Multiprotein-Komplexe bilden, wodurch die Signaltransduktion gestört wird. Ebenso führt ein Überschuss eines *Scaffold*-Proteins zu unvollständigen, nicht funktionellen



Komplexen, wodurch wiederum die Übertragungswege nicht kontrolliert ablaufen können (Juliano, 2002; Levchenko *et al.*, 2000).

VASP besitzt neben den erwähnten eine weitere wichtige Eigenschaft eines *Scaffold*-Proteins: es kann gleichzeitig viele unterschiedliche Proteine binden und in räumliche Nähe bringen; dies gilt insbesondere für seine Funktion als Tetramer.

### **5.3. Koexpression von VASP und Rho: Hinweise auf die Interaktion von VASP mit Signaltransduktionswegen der kleinen Rho-GTPasen**

Die Daten dieser Arbeit deuten an, dass VASP für die Übertragungswege der Rho-GTPasen eine Rolle spielt. So erhöht in NIH 3T3- und Mesangial-Zellen die Kotransfektion sowohl von Wildtyp- als auch von dominant negativem RhoA die Expression von VASP, die sonst eher einen toxischen Effekt auf die Zellen ausübt (Abb. 8 und 9, Abschnitte 4.2. und 4.3.). In PtK<sub>2</sub>-Zellen wird VASP nach Transfektion von wt-RhoA und wt-VASP im *Western-Blot* als Doppelbande von ca. 45 und 50 kDa detektiert (Abb. 9, Abschnitt 4.3.). In den Kontrollen (wt- und AAA-VASP-Einzeltransfektionen, Kotransfektion von wt-RhoA mit AAA-VASP und Kotransfektion von dominant negativem Rho mit wt-VASP) kann nur die 45 kDa große Bande nachgewiesen werden (Abb. 9, Abschnitt 4.3.). Dies deutet darauf hin, dass RhoA - zumindest in PtK<sub>2</sub>-Zellen - VASP direkt oder indirekt über seine Effektoren phosphoryliert. Möglicherweise erfolgt auch eine Phosphorylierung in NIH 3T3- und Mesangial-Zellen, die jedoch aufgrund des verwendeten Antikörpers nicht ersichtlich ist. Näheren Aufschluss darüber würden *Western-Blot*-Analysen mit Phospho-VASP spezifischen Antikörpern geben. Interessanterweise konnte die Gruppe von Dr. Günter Daum in Seattle zeigen, dass die Serum-abhängige Phosphorylierung von VASP in glatten Muskelzellen durch Proteinkinase C (PKC) und Rho Kinase Inhibitoren gehemmt werden konnte. Des Weiteren konnten sie *in vitro* eine Phosphorylierung von VASP nach Inkubation mit Rho Kinase und PKC nachweisen (K. Chitaley, persönliche Mitteilung). Möglicherweise wird VASP in Zellen jedoch nicht direkt durch die PKC phosphoryliert. So konnten Hou *et al.* in HEK293 Zellen zeigen, dass Aktivierung der PKC durch Phorbolster die PKC aktiviert (Hou *et al.*, 2003), wodurch dann wiederum VASP phosphoryliert werden kann. Weitere Versuche sind notwendig, um die molekularen Zusammenhänge der VASP-Phosphorylierung in Abhängigkeit der PKC und RhoA und der Rho Kinase zu klären.

Die Phosphorylierung der MLC ist ein Maß für die Kontraktion und Stabilität von Stressfasern (Fukata *et al.*, 2001) und wird durch verschiedene Signalübertragungswege moduliert. Die Phosphorylierung erfolgt über die MLC Kinase an Ser19 und Thr18 (Fukata *et al.*, 1999), über PAK-2 (Rac/Cdc42-Signaltransduktionsweg) (Chew *et al.*, 1998) und Rho Kinase (Rho-Signaltransduktionsweg) an Ser19 (Amano *et al.*, 1996; Fukata *et al.*, 2001). Die Dephosphorylierung wird durch die MLC Phosphatase reguliert, die durch die Rho

Kinase (Rho-Signaltransduktionsweg) inhibiert wird (Fukata *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 1996). Der Gehalt an phosphorylierter MLC ist in Abwesenheit von VASP deutlich erhöht und wird durch Entzug und Zugabe von Serum im Gegensatz zu VASP (+/+) Zellen scheinbar nicht verändert. Dieses Resultat korreliert sehr gut mit der Beobachtung, dass die Stressfasern in VASP (-/-) Fibroblasten (Garcia Arguinzonis, 2003) und Mesangialzellen (Abb. 6) auch bei längerem Hungern durch Serumentzug erhalten bleiben, wohingegen sie sich in VASP (+/+) Zellen auflösen. Da die Phosphorylierung der MLC unter anderem durch den RhoA-Signaltransduktionsweg reguliert wird, ist der Unterschied im Gehalt von Phospho-MLC in VASP (-/-) und (+/+) Fibroblasten ein mögliches Indiz für einen Einfluss von VASP auf den RhoA-Übertragungsweg. RhoA spielt jedoch nicht nur bei der Bildung von Stressfasern und Fokalen Kontakten eine Rolle (Burrige and Chrzanowska-Wodnicka, 1996; Chrzanowska-Wodnicka and Burrige, 1996; Schoenwaelder and Burrige, 1999), sondern auch bei der Adhäsion von Zellen (Ren *et al.*, 1999). So werden die kleinen GTPasen Rac und Cdc42 aktiviert (Clark *et al.*, 1998; Defilippi *et al.*, 1999; Price *et al.*, 1998), wohingegen RhoA zunächst inhibiert, später jedoch aktiviert wird (Ren *et al.*, 1999).

Diese Daten (verstärkte Stressfasern; VASP/Rho Koexpression, MLC-Phosphorylierung) deuten stark darauf hin, dass der Rho-Signaltransduktionsweg in VASP-defizienten Zellen moduliert wird. Die bisherigen Ergebnisse (erhöhte MLC-Phosphorylierung, steiferes Aktin-Zytoskeletts (diese Arbeit), vergrößerte Fokale Kontakte und langsamere Adhäsion von VASP-defizienten Zellen (Garcia Arguinzonis, 2003) deuten darauf hin, dass der Rho-Signalweg in VASP-defizienten Zellen verstärkt ist. Aus der Literatur ergeben sich weitere Hinweise für eine Rolle von Ena/VASP-Proteinen bei Signalwegen der kleinen Rho-GTPasen. So führt die Abwesenheit von VASP zu stärker ausgebreiteten Zellen und einer erhöhten Aktivität von Rac und PAK (Garcia Arguinzonis *et al.*, 2002). Des Weiteren konnte eine Interaktion von Mena mit dem Adaptorprotein IRSp53 nachgewiesen werden, das wiederum an die kleine GTPase Cdc42 bindet. Mena und IRSp53 sind bei der Cdc42-induzierten Ausbildung von Filopodien von Bedeutung und agieren hierbei synergistisch (Krugmann *et al.*, 2001). Erst kürzlich wurde von Grosse *et al.* gezeigt, dass die VASP-induzierten F-Aktin-Akkumulation und Aktivierung des Transkriptionsfaktors SRF (engl.: *Serum Response Factors*) funktionelles RhoA und dessen Effektor mDia benötigt. Zudem konnte hier erstmalig eine direkte Interaktion von VASP mit mDia nachgewiesen werden (Grosse *et al.*, 2003).

Ein interessanter Aspekt der zukünftigen Forschung wird sein, einen direkten Nachweis für die VASP-abhängige Modulation des Rho-Signalweges zu untersuchen. Dies gilt insbesondere für die molekularen Mechanismen von VASP und den anderen Mitgliedern der Ena/VASP-Familie in diesem Zusammenhang. Auch hier ist eine mögliche Wirkungsweise von VASP als *Scaffold*-Protein ein interessanter Aspekt. Auch der umgekehrte Einfluss

von RhoA auf den Expressionslevel von VASP muss in der Ursache und Funktion noch genauer charakterisiert werden. Um eine mögliche VASP-abhängige RhoA-Aktivierung zu untersuchen, wurden bereits erste Versuche unternommen, einen Rho-*pull-down Assay* in VASP (-/-) und VASP (+/+) Zellen zu etablieren. Die hier häufig verwendete Zelllinie MCFB enthält jedoch kein RhoA, sondern RhoC (persönlich Mitteilung von Dr. Albert Smolenski anhand von Genexpressionsanalysen) und kann daher nicht für diese Assays verwendet werden, die für RhoA entwickelt und optimiert wurden. Mesangialzellen enthalten geringe Mengen von RhoA. Da diese Zellen jedoch sehr groß sind (insbesondere VASP-defiziente Zellen), werden für einen Assay sehr große Mengen benötigt. Dies hat bisher einen Vergleich der Rho-Aktivität in VASP (-/-) und (+/+) Zellen verhindert.

#### **5.4. Der Einfluss von VASP auf die Zelladhäsion**

Die Daten der Rasterkraftmikroskopie (Abschnitt 4.5.) und die der Laser-Pinzette (Abschnitt 4.6.) weisen darauf hin, dass VASP-defiziente Zellen ein rigideres Aktin-Zytoskelett besitzen als VASP (+/+) Fibroblasten. Auch die biochemischen Daten der MLC-Phosphorylierung (Abschnitt 4.4.) deuten dies an.

Ein direkter Einfluss von Ena/VASP-Proteinen auf das Aktin-Zytoskelett wurde bereits unserer und anderen Arbeitsgruppen beschrieben. Neben der Aktin-Bindungs und -Bündelungs-Funktion (Bachmann *et al.*, 1999; Harbeck *et al.*, 2000) stabilisiert VASP Aktin-Filamente, indem es die auflösende Aktivität von Gelsolin (Bearer *et al.*, 2000) hemmt und mit der Bindung von Capping Protein an die stumpfen Enden von F-Aktin konkurriert (Bear *et al.*, 2002). Letzteres führt in Abwesenheit von Ena/VASP-Proteinen zu kurzen, stark verzweigten Aktin-Filamenten (Bear *et al.*, 2002), was die Festigkeit des Netzwerks direkt erhöhen kann. Zudem können die stabileren Lamellipodien in Ena/VASP-defizienten Zellen (Bear *et al.*, 2002) durch den vergrößerten Kontakt mit der ECM und verstärkten Integrin-Zytoskelett Interaktion verursacht sein, die zu einer verstärkten Adhäsion führen. Eine Verzweigung von Mikrofilamente findet sich jedoch fast ausschließlich am äußersten Rand des Lamellipodiums, weiter innerhalb der Zelle bilden sich lange und gebündelte Filamente (Pollard and Borisy, 2003). Somit kann die stärkere Verzweigung in Abwesenheit von Ena/VASP-Proteinen (Bear *et al.*, 2002) nicht die erhöhte Festigkeit der VASP (-/-) Fibroblasten auch im Bereich des Zellkerns erklären (Abschnitt 4.5.1.1.).

Die Stabilisierung des Aktin-Zytosketts in VASP (-/-) Fibroblasten beeinflusst die Ligandenbindung und das „Clustering“ von Integrinen: Integrine sind vor der Ligandenbindung nicht mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpft (Choquet *et al.*, 1997; Nishizaka *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 1993) und ein vorübergehendes Lösen der Integrine vom Zytoskelett wird für die Ligandenbindung benötigt (Bennett *et al.*, 1999). Die Bindung an Fibronectin hat häufig eine Verknüpfung des Integrins an das Zytoskelett zur Folge (Choquet

*et al.*, 1997; Felsenfeld *et al.*, 1996; Nishizaka *et al.*, 2000), wodurch die Ligandenbindung und die Integrin-abhängige Adhäsion erhöht wird (Fukata *et al.*, 1999; Nishizaka *et al.*, 2000). VASP-defiziente Zellen adhären zunächst langsamer an Fibronectin, binden letztendlich jedoch wesentlich stärker als die entsprechenden Wildtyp-Zellen (Galler *et al.*, 2003; Garcia Arguinzonis, 2003). Da VASP (-/-) Zellen wesentlich stärker ausgebreitet sind als VASP (+/+) Fibroblasten (Garcia Arguinzonis *et al.*, 2002), besitzen sie eine größere Kontaktfläche mit der ECM, wodurch die verstärkte Adhäsion verursacht sein könnte. Um dies auszuschließen, wurden die Laser-Pinzetten Experimente mit Fibronectin-beschichteten Polystyrol-Perlen ausgeführt, bei denen die Kontaktfläche von Fibronectin mit der Zelloberfläche konstant ist. Auch hier konnte eindeutig größere Bindungsstärke für VASP-defiziente Fibroblasten festgestellt werden. Daher sind Adhäsions-Komplexe unabhängig von ihrer Größe in diesen Zellen verstärkt. Diese Schlussfolgerung wird auch von der Beobachtung unterstützt, dass die Fokalen Kontakte in VASP-defizienten Zellen vergrößert sind (Galler *et al.*, 2003; Garcia Arguinzonis, 2003). Die Größe der Kontakte ist - ab einem bestimmten Schwellenwert - proportional zur lokalen Zugkraft der Stressfasern (Balaban *et al.*, 2001). Dies ist wiederum im Einklang mit der erhöhten MLC-Phosphorylierung in und steiferen Oberfläche von VASP-defizienten Zellen und deutet darauf hin, dass die Kraft, die auf die Zell-Matrix-Adhäsions Komplexe ausgeübt wird, entsprechend größer ist.

Die Ergebnisse, dass die Abwesenheit von VASP das Aktin-Zytoskelett versteift, wird durch eine Beobachtungen unterstützt, wonach sich Neutrophile deutlich versteifen, nachdem sie mit ActA Peptiden beladen wurden, die die Interaktion der EVH1 Domäne von Ena/VASP-Proteinen beeinträchtigen (Anderson *et al.*, 2003).

Da die Bildung von Fokalen Kontakten von der Kontraktilität der Stressfasern abhängig sind (Burridge and Chrzanowska-Wodnicka, 1996; Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996), könnte eine erhöhte Kontraktilität die Ursache für die Ausbildung Fokaler Kontakte und Integrin-Cluster sein und folglich zu Verstärkung der Zell-Adhäsion führen.

#### **5.4.1. Der Einfluss von VASP auf die Zellelastizität und Ausbildung von elastischen Membranfortsätzen**

Bei einem Teil der gebundenen, Fibronectin-beschichteten Perlen konnten elastische Membranfortsätze mit einigen  $\mu\text{m}$  Länge herausgezogen werden (Abschnitt 4.6.). Die Elastizität dieser Bindungen war in VASP-defizienten Zellen wesentlich geringer als in Wildtyp-Zellen. Ebenso war die Membranrigidität von VASP-defizienten Fibroblasten deutlich größer als die von VASP (+/+) Zellen (Abschnitt 4.5.). Dies entspricht der Vermutung, dass die Länge der elastischen Membranfortsätze von der Stärke der Membranrigidität bzw. Membranplastizität beeinflusst wird (Sheetz, 2001). Die Membranrigidität kann sowohl durch direkte Interaktion des Aktin-Zytoskeletts mit der Membran (Dai *et al.*, 1999) als auch indirekt

durch Aktin-Polymerisation (Raucher *et al.*, 2000) moduliert werden. VASP kann durch seinen Einfluss auf die Aktin-Polymerisation (Loisel *et al.*, 1999) diesen Regulationsmechanismus beeinflussen. Die Lokalisation von VASP an Zell-Substrat- (Krause *et al.*, 2000) und Zell-Zell-Kontakten (Vasioukhin *et al.*, 2000) kann auch eine Beteiligung von VASP an der Regulation der Membran-Zytoskelett Interaktion ermöglichen.

Cytochalasin D reduziert die Membranadhäsionsenergie (Raucher *et al.*, 2000). Daher gehen wir davon aus, dass das stabilere und weniger elastische Zytoskelett von VASP-defizienten Zellen zum großen Teil die kürzeren elastischen Membranfortsätze dieser Zellen gegenüber VASP (+/+) Fibroblasten verursacht. Die Messung der Membranrigidität durch Kraft-Distanz-Kurven mit dem Rasterkraftmikroskop ergaben eine etwa gleich starke Membranelastizität für VASP (+/+) und VASP (-/-) Zellen nach Inkubation mit Cytochalasin D.

Die Kräfte, die auf elastisch gebundenen Perlen wirken, steigen mit der Entfernung der Perlen von der Zelloberfläche, wobei die Kraft zum Ende hin immer stärker zunimmt (Raucher and Sheetz, 1999). Jedoch besteht in gewissen Entfernungen kein Zusammenhang zwischen den Rückstellkräften und der Länge der Membranfedern. Daher wurde ein Membranreservoir postuliert, dessen Größe über die Länge der Membranfedern gemessen werden kann (Raucher and Sheetz, 1999). In diesem Fall (Abschnitt 4.6.1.) konnten die elastischen Membranfortsätzen bei Erhöhung der Laserleistung von 40 auf 160 mW sowohl in VASP (+/+) als auch VASP (-/-) Zellen um den Faktor 2-3 verlängert werden. Somit besteht für die Länge der Membranfedern zum größten Teil (mindestens 2/3-3/4) ein Zusammenhang mit den auf sie wirkenden Kräften. Daher sollte das postulierte Membranreservoir zu einem früheren Zeitpunkt erschöpft sein. Die Größe des Reservoirs soll durch die Intensität der Membran-Zytoskelett Interaktion und/oder Festigkeit des Zytoskeletts beeinflusst werden (Raucher and Sheetz, 1999). Es ist offensichtlich, wie die Bindung des Zytoskeletts an die Membran die Länge der elastischen Membranfortsätze beeinflussen kann. Auch eine erhöhte Festigkeit oder Kontraktion der Mikrofilamente des Zellkortex können zu ähnlichen Konsequenzen führen. Es wird daher angenommen, dass eine Verfestigung der Zellform und Topologie der Zelloberfläche die Ausbildung von elastischen Fortsätzen erschwert, die ansonsten aus Plasmamembran nach Abrunden von Zellen, der Auflösung von Membraneinstülpungen, Membran-*Ruffles* oder durch Verwendung interner Membranreservoirs ausgebildet werden können (Burwen and Satir, 1977; Escolar *et al.*, 1989; Raucher and Sheetz, 1999). Dementsprechend war die Menge an Membran, die in elastischen Membranfortsätzen aus den steifen VASP-defizienten Fibroblasten gezogen werden konnte, deutlich geringer als die aus den weicheren VASP (+/+) Zellen und korrelierte zudem direkt mit dem Expressionslevel von VASP in zwei rekonstituierten Zellklonen.

Interessanterweise wurde kürzlich auch ein Zusammenhang von der Ausbreitung von Zellen mit der Membranelastizität festgestellt. So sind stärker ausgebreitete Zellen deutlich steifer (Bhadriraju and Hansen, 2002; Elson, 1988) und zeigen ein erhöhtes Maß an phosphorylierter MLC (Bhadriraju and Hansen, 2002) als weniger stark ausgebreitete Zellen.

Die Membranrigidität wird in erster Linie durch das Akin-Zytoskelett (Raucher and Sheetz, 1999) und die Zytoskelett-Membran Adhäsion bestimmt (Sheetz, 2001). Bestimmungen der Länge der elastischen Bindungen und Membranelastizität nach Inkubation mit Cytochalasin D bestätigen diese Ergebnisse (Abschnitt 4.5. und 4.6.). Eine geringere Membranelastizität nach Behandlung mit Cytochalasinen wurde bereits an Hepatozyten (Bhadriraju and Hansen, 2002) und Fibroblasten (Rotsch and Radmacher, 2000) nachgewiesen. Erstaunlicherweise ändert sich diese jedoch nicht nach partieller Trypsinisierung der Zellen (Bhadriraju and Hansen, 2002). Mikrotubuli besitzen dagegen eine untergeordnete Bedeutung bei der Bestimmung der Membranfestigkeit (Abschnitt 4.5.3.3.; Rotsch and Radmacher, 2000)).

Interessanterweise wurde eine erhöhte Membranrigidität mit der Regulation der Ausbreitung von Lamellipodien in Verbindung gebracht (Raucher and Sheetz, 2000). Dies entspricht sehr gut der reduzierten Fortbewegung der Lamellipodien in Ena/VASP-defizienten Zellen (Bear *et al.*, 2002). Daher sind die Beobachtungen von Bear *et al.* (Bear *et al.*, 2002) möglicherweise ein sekundärer Effekt, der durch die Veränderungen des Spannungszustandes im Akin-Zytoskelett verursacht sein kann. Die Hypothese, dass Ena/VASP-Proteine über ihren Einfluss auf die Membranfestigkeit ein wesentlicher Faktor für die Regulation der Ausbreitung und des Zurückziehens der Lamellipodien sind, wird unter anderem durch ihre Funktion in Axon-Führungsprozessen (Bashaw *et al.*, 2000; Colavita and Culotti, 1998) und ihre Bedeutung für die Substrat-Zytoskelett Bindung bei der Regulation der Wachstumskegel-Motilität und -Führung belegt (Suter and Forscher, 2000).

#### **5.4.2. Der Einfluss der kleinen GTPase Rap1 auf die Länge der elastischen Membranfortsätze**

Die Stimulation mit dem cGMP-Analog 8p-CPT-cGMP führte zur signifikanten Verkürzung der elastischen Membranfortsätzen von VASP (+/+) Fibroblasten, in VASP-defizienten Zellen verkürzt die Behandlung die elastischen Bindungen jedoch nicht weiter. Färbungen der Aktinfilamente weisen keine sichtbaren Unterschiede zwischen stimulierten und unbehandelten Zellen auf. Es ist daher unwahrscheinlich, dass der Effekt von 8p-CPT-cGMP auf die Länge der elastischen Membranfortsätze auf starke Änderungen des Aktin-Zytoskeletts beruht (Abschnitt 4.6.).

Die Expression der PKG wird in kultivierten Zellen mit steigender Passage häufig, teilweise bis zum vollständigen Verlust, herunterreguliert (Fischer *et al.*, 2001). Dies scheint auch in den kardialen Fibroblasten der Fall zu sein, da die PKG im *Western-Blot* nur bis etwa Passage 15-20 nachweisbar ist (verwendet wurden die Passagen 20-40). Allerdings ist die Phosphorylierung von VASP an der bevorzugten Phosphorylierungsstelle der PKG, Serin 239 (Butt *et al.*, 1994), nach Inkubation mit dem cGMP-Analog bis in hohe Passagen nachweisbar (Garcia Arguinzonis, 2003). Hierdurch kann man auf eine geringe, nicht mehr nachweisbare Expression der PKG – auch in höheren Passagen - schließen. Durch die geringe, wenn überhaupt vorhandene Expression der PKG in den untersuchten Zellen und Passagen ist es aber unwahrscheinlich, dass der Effekt von 8p-CPT-cGMP durch die PKG ausgelöst wird.

Während dieser Arbeit wurde bekannt, dass 8p-CPT-cGMP neben der PKG auch den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (engl.: *guanine nucleotide exchange factor*; GEF) Epac (engl.: *Exchange protein directly activated by cAMP*) aktiviert (Dr. Elke Butt, persönlich Mitteilung). Epac stimuliert den Nukleotidaustausch der kleinen GTPase Rap1. Dieser Austauschfaktor wird *in vivo* durch cAMP aktiviert, was zu einem Austausch von GDP zu GTP und damit zur Aktivierung von Rap1 führt (de Rooij *et al.*, 1998). Rap1 besitzt eine hohe Homologie zu Ras und wurde ursprünglich als Antagonist für die transformierende Wirkung von Ras charakterisiert (Kitayama *et al.*, 1989).

Nach neueren Erkenntnissen beeinflusst Rap1 die Integrin-abhängige Adhäsion insbesondere das „*inside-out-signalling*“ von Integrinen (Arai *et al.*, 2001; Bertoni *et al.*, 2002; Caron *et al.*, 2000; de Bruyn *et al.*, 2002; Katagiri *et al.*, 2000; Ohba *et al.*, 2001; Sebzda *et al.*, 2002; Tsukamoto *et al.*, 1999).

Daher wurde auch der Einfluss des spezifischen Epac-Aktivators 8CPT-2Me-cAMP (Enserink *et al.*, 2002) auf die Länge von elastischen Membranfortsätzen untersucht. Dieser verkürzte, wie schon das cGMP-Analog, die Länge der Fortsätze in VASP (+/+) Zellen signifikant, wohingegen diese in VASP-defizienten Fibroblasten unverändert kurz blieben (Abschnitt 4.6.1.2.). Da 8p-CPT-cGMP und der spezifische Epac Aktivator (Enserink *et al.*, 2002) den gleichen Effekt bewirken, ist anzunehmen, dass die Verkürzung der elastischen Membranfortsätze auf eine Aktivierung der kleinen GTPase Rap1 verursacht wird.

Messungen der Membranfestigkeit sowohl von VASP (+/+) als auch VASP (-/-) Zellen nach Behandlung mit 8CPT-2Me-cAMP mit dem Rasterkraftmikroskop sowie F-Aktin Färbungen mit fluoreszenz-markiertem Phalloidin ergaben keine Änderungen des Aktin-Zytoskeletts (Abb. 22) sowie der Membranelastizitäten im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abschnitt 4.6.2.). Diese Versuche zeigen, dass die Länge der elastischen Membranfortsätze unter bestimmten Bedingungen auch ohne größere Änderungen im Zytoskelett oder der Membranfestigkeit moduliert werden kann.

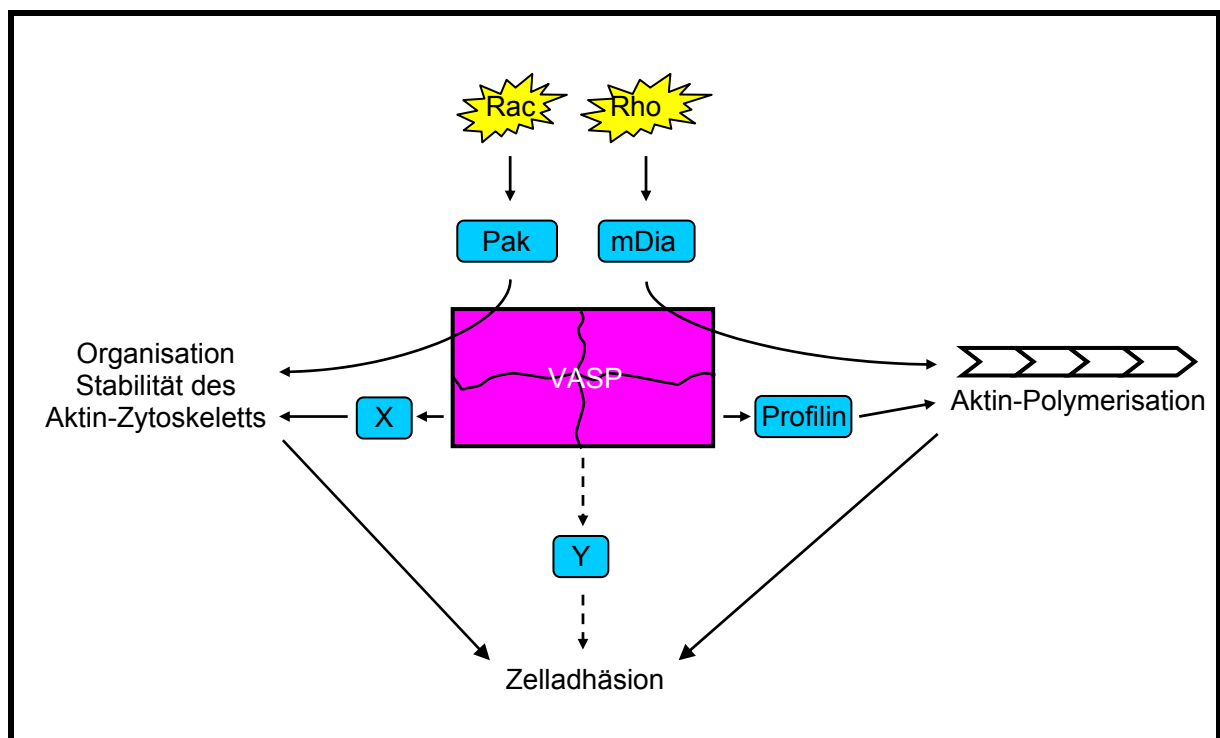
VASP (+/+) Fibroblasten adhären nach Stimulation mit 8p-CPT-cGMP deutlich schneller an Fibronectin als VASP (-/-) Zellen (Galler *et al.*, 2003; Garcia Arguinzonis, 2003). Der Gehalt der Fibronectin-bindenden Integrine  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$  auf den Oberflächen von VASP (+/+) und (-/-) Fibroblasten ist identisch, wie FACS-Analysen ergaben (Galler *et al.*, 2003; Garcia Arguinzonis, 2003). Da diese Zellen keine oder nur sehr geringe Mengen PKG exprimieren (s. o.), wird auch dieser Effekt wahrscheinlich durch Aktivierung von Epac und Rap1 verursacht. Eine verstärkte Adhäsion auf Fibronectin nach Stimulation mit cAMP und 8CPT-2Me-cAMP in Abhängigkeit von Epac und Rap1 wurde kürzlich für ovariäre Karzinomzellen nachgewiesen (Rangarajan *et al.*, 2003).

Erstaunlicherweise führte die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit dem Epac-Aktivator 8CPT-2Me-cAMP und Cytochalasin D zu keiner Verlängerung der elastischen Membranfortsätze im Vergleich zu ausschließlich mit 8CPT-2Me-cAMP behandelten Zellen (Abschnitt 4.6.1.2.). Auch die Ko-Inkubation von 8CPT-2Me-cAMP mit Colchicin A hat wie erwartet (Rotsch and Radmacher, 2000) keinen Effekt auf die Länge der elastischen Membranfortsätze (Abschnitt 4.6.1.2.) im Vergleich zu ausschließlich mit dem Epac-Aktivator behandelten Zellen. Dagegen zeigten sowohl die Immunfluoreszenz-Bilder (Abb. 22, Abschnitt 4.6.1.2.) als auch die Membranfestigkeit keinen Unterschied der ko-inkubierten Zellen zu denen, die ausschließlich mit Cytochalasin D bzw. Colchicin A behandelt wurden (Abb. 22 und , Abschnitt 4.6.1.2. und 4.6.2.). Die Länge der Membranfortsätze nach Behandlung mit 8CPT-2Me-cAMP wird daher weder durch die Stärke des Aktin- noch des Mikrotubuli-Zytoskeletts, sondern durch einen anderen, unbekanntem Mechanismus bestimmt. Möglicherweise spielen hier Zytoskelett-Membranverbindungen in Form von Protein-Lipid- oder auch Protein-Transmembranprotein-Bindungen eine entscheidende Rolle.



### 5.5. Ausblick

VASP beeinflusst neben der Organisation des Zytoskeletts die Adhäsion von Zellen, sowie Signalwege kleiner GTPasen. Es existieren viele Hinweise, dass sich diese Faktoren gegenseitig beeinflussen können (Schoenwaelder and Burrige, 1999). So wird die Integrin-Ligand-Bindung für die Adhäsions-abhängige Aktivierung der Rho-GTPasen-Signaltransduktionswege benötigt (Clark *et al.*, 1998; Defilippi *et al.*, 1999; Price *et al.*, 1998). Umgekehrt spielen diese Signalwege auch bei der Integrin-abhängigen Zell-Adhäsion eine Rolle (Fukata *et al.*, 1999; Schoenwaelder and Burrige, 1999). Des Weiteren beeinflusst das Aktin-Zytoskelett die Adhäsion und umgekehrt (Fukata *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 1999; Schoenwaelder and Burrige, 1999). Ein interessanter Aspekt der zukünftigen Forschung wird sein, zu unterscheiden, ob und wie VASP direkten Einfluss auf die Signalwege kleiner GTPasen nimmt oder ob diese Effekte indirekt über die Modulation des Aktin-Zytoskelett verursacht werden.



**Abb. 29: Die Funktion des VASP-Tetramers als Scaffold-Protein**

Durch die Interaktion mit mDia bzw. Profilin moduliert VASP die Aktin-Polymerisation. VASP beeinflusst die Organisation und Stabilität des Aktin-Zytoskeletts unter anderem über den Rac-Signaltransduktionsweg. Die Integrin-abhängige Zelladhäsion wird möglicherweise direkt durch VASP oder indirekt über seinen Einfluss auf die Aktin-Polymerisation bzw. Organisation und Stabilität des Aktin-Zytoskeletts reguliert.

## 6. Literatur

- Abel, K., Mieskes, G. and Walter, U. (1995) Dephosphorylation of the focal adhesion protein VASP in vitro and in intact human platelets. *FEBS Lett*, **370**, 184-8.
- Ahern-Djamali, S.M., Bachmann, C., Hua, P., Reddy, S.K., Kastenmeier, A.S., Walter, U. and Hoffmann, F.M. (1999) Identification of profilin and src homology 3 domains as binding partners for Drosophila enabled. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4977-82.
- Ahern-Djamali, S.M., Comer, A.R., Bachmann, C., Kastenmeier, A.S., Reddy, S.K., Beckerle, M.C., Walter, U. and Hoffmann, F.M. (1998) Mutations in Drosophila enabled and rescue by human vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) indicate important functional roles for Ena/VASP homology domain 1 (EVH1) and EVH2 domains. *Mol Biol Cell*, **9**, 2157-71.
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y. and Kaibuchi, K. (1996) Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem*, **271**, 20246-9.
- Anderson, S.I., Behrendt, B., Machesky, L.M., Insall, R.H. and Nash, G.B. (2003) Linked regulation of motility and integrin function in activated migrating neutrophils revealed by interference in remodelling of the cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton*, **54**, 135-46.
- Arai, A., Nosaka, Y., Kanda, E., Yamamoto, K., Miyasaka, N. and Miura, O. (2001) Rap1 is activated by erythropoietin or interleukin-3 and is involved in regulation of beta1 integrin-mediated hematopoietic cell adhesion. *J Biol Chem*, **276**, 10453-62.
- Aszodi, A., Pfeifer, A., Ahmad, M., Glauner, M., Zhou, X.H., Ny, L., Andersson, K.E., Kehrel, B., Offermanns, S. and Fassler, R. (1999) The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *Embo J*, **18**, 37-48.
- Bachmann, C. (1999) Die Ena/VASP-Familie Zytoskelett-assoziiierter Proteine: Aufklärung und Funktionen der EVH2 (Ena/VASP homology 2)- Domäne. *Dissertation*.
- Bachmann, C., Fischer, L., Walter, U. and Reinhard, M. (1999) The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. *J Biol Chem*, **274**, 23549-57.
- Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Rivelino, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L. and Geiger, B. (2001) Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol*, **3**, 466-72.

- Ball, L.J., Kuhne, R., Hoffmann, B., Hafner, A., Schmieder, P., Volkmer-Engert, R., Hof, M., Wahl, M., Schneider-Mergener, J., Walter, U., Oschkinat, H. and Jarchau, T. (2000) Dual epitope recognition by the VASP EVH1 domain modulates polyproline ligand specificity and binding affinity. *Embo J*, **19**, 4903-14.
- Barzik, M., Carl, U.D., Schubert, W.D., Frank, R., Wehland, J. and Heinz, D.W. (2001) The N-terminal domain of Homer/Vesl is a new class II EVH1 domain. *J Mol Biol*, **309**, 155-69.
- Barzik, M., Schubert, W.D., Carl, U., Wehland, J. and Heinz, D.W. (2000) Crystallization and preliminary X-ray analysis of the EVH1 domain of Vesl-2b. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **56**, 930-2.
- Bashaw, G.J., Kidd, T., Murray, D., Pawson, T. and Goodman, C.S. (2000) Repulsive axon guidance: Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the roundabout receptor. *Cell*, **101**, 703-15.
- Baumgartner, W., Weiss, P. and Schindler, H. (1998) A Nonparametric Test for the General Two-Sample Problem. *Biometrics*, **54**, 1129-1135.
- Bear, J.E., Krause, M. and Gertler, F.B. (2001) Regulating cellular actin assembly. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 158-66.
- Bear, J.E., Loureiro, J.J., Libova, I., Fassler, R., Wehland, J. and Gertler, F.B. (2000) Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins. *Cell*, **101**, 717-28.
- Bear, J.E., Svitkina, T.M., Krause, M., Schafer, D.A., Loureiro, J.J., Strasser, G.A., Maly, I.V., Chaga, O.Y., Cooper, J.A., Borisy, G.G. and Gertler, F.B. (2002) Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell*, **109**, 509-21.
- Bearer, E.L., Prakash, J.M., Manchester, R.D. and Allen, P.G. (2000) VASP protects actin filaments from gelsolin: an in vitro study with implications for platelet actin reorganizations. *Cell Motil Cytoskeleton*, **47**, 351-64.
- Bennett, J.S., Zigmond, S., Vilaire, G., Cunningham, M.E. and Bednar, B. (1999) The platelet cytoskeleton regulates the affinity of the integrin alpha(IIb)beta(3) for fibrinogen. *J Biol Chem*, **274**, 25301-7.
- Bertoni, A., Tadokoro, S., Eto, K., Pampori, N., Parise, L.V., White, G.C. and Shattil, S.J. (2002) Relationships between Rap1b, affinity modulation of integrin alpha IIb beta 3, and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, **277**, 25715-21.
- Bhadiraju, K. and Hansen, L.K. (2002) Extracellular matrix- and cytoskeleton-dependent changes in cell shape and stiffness. *Exp Cell Res*, **278**, 92-100.
- Binnig, G., Quate, C.F. and Gerber, C. (1986) Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, **56**, 930-933.

- Bullock, W.O., Fernandez, F.M. and Short, J.M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming rec A Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques*, **5**, 376-379.
- Burack, W.R. and Shaw, A.S. (2000) Signal transduction: hanging on a scaffold. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 211-6.
- Burridge, K. and Chrzanowska-Wodnicka, M. (1996) Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **12**, 463-518.
- Burwen, S.J. and Satir, B.H. (1977) Plasma membrane folds on the mast cell surface and their relationship to secretory activity. *J Cell Biol*, **74**, 690-7.
- Butt, E., Abel, K., Krieger, M., Palm, D., Hoppe, V., Hoppe, J. and Walter, U. (1994) cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J Biol Chem*, **269**, 14509-17.
- Butt, E., Gambaryan, S., Gottfert, N., Galler, A., Marcus, K. and Meyer, H.E. (2003) Actin binding of human LIM and SH3 protein (LASP) is regulated by cGMP- and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation on Ser-146. *J Biol Chem*, **5**, 5.
- Callebaut, I., Cossart, P. and Dehoux, P. (1998) EVH1/WH1 domains of VASP and WASP proteins belong to a large family including Ran-binding domains of the RanBP1 family. *FEBS Lett*, **441**, 181-5.
- Caron, E., Self, A.J. and Hall, A. (2000) The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin alphaMbeta2 by LPS and other inflammatory mediators. *Curr Biol*, **10**, 974-8.
- Chew, T.L., Masaracchia, R.A., Goeckeler, Z.M. and Wysolmerski, R.B. (1998) Phosphorylation of non-muscle myosin II regulatory light chain by p21- activated kinase (gamma-PAK). *J Muscle Res Cell Motil*, **19**, 839-54.
- Choquet, D., Felsenfeld, D.P. and Sheetz, M.P. (1997) Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin- cytoskeleton linkages. *Cell*, **88**, 39-48.
- Chrzanowska-Wodnicka, M. and Burridge, K. (1996) Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol*, **133**, 1403-15.
- Clark, E.A., King, W.G., Brugge, J.S., Symons, M. and Hynes, R.O. (1998) Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J Cell Biol*, **142**, 573-86.
- Colavita, A. and Culotti, J.G. (1998) Suppressors of ectopic UNC-5 growth cone steering identify eight genes involved in axon guidance in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, **194**, 72-85.
- Collard, C.D., Park, K.A., Montalto, M.C., Alapati, S., Buras, J.A., Stahl, G.L. and Colgan, S.P. (2002) Neutrophil-derived glutamate regulates vascular endothelial barrier function. *J Biol Chem*, **277**, 14801-11.

- Comer, A.R., Ahern-Djamali, S.M., Juang, J.L., Jackson, P.D. and Hoffmann, F.M. (1998) Phosphorylation of Enabled by the Drosophila Abelson tyrosine kinase regulates the in vivo function and protein-protein interactions of Enabled. *Mol Cell Biol*, **18**, 152-60.
- Comerford, K.M., Lawrence, D.W., Synnestvedt, K., Levi, B.P. and Colgan, S.P. (2002) Role of vasodilator-stimulated phosphoprotein in protein kinase A- induced changes in endothelial junctional permeability. *Faseb J*, **12**, 12.
- Coppolino, M.G., Krause, M., Hagendorff, P., Monner, D.A., Trimble, W., Grinstein, S., Wehland, J. and Sechi, A.S. (2001) Evidence for a molecular complex consisting of Fyb/SLAP, SLP-76, Nck, VASP and WASP that links the actin cytoskeleton to Fcγ receptor signalling during phagocytosis. *J Cell Sci*, **114**, 4307-18.
- Dai, J., Ting-Beall, H.P., Hochmuth, R.M., Sheetz, M.P. and Titus, M.A. (1999) Myosin I contributes to the generation of resting cortical tension. *Biophys J*, **77**, 1168-76.
- de Bruyn, K.M., Rangarajan, S., Reedquist, K.A., Figdor, C.G. and Bos, J.L. (2002) The small GTPase Rap1 is required for Mn(2+)- and antibody-induced LFA- 1- and VLA-4-mediated cell adhesion. *J Biol Chem*, **277**, 29468-76.
- de Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A. and Bos, J.L. (1998) Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, **396**, 474-7.
- Defilippi, P., Olivo, C., Venturino, M., Dolce, L., Silengo, L. and Tarone, G. (1999) Actin cytoskeleton organization in response to integrin-mediated adhesion. *Microsc Res Tech*, **47**, 67-78.
- Dettmann, W. (1999) Dynamische Kraftspektroskopie von einzelnen Rezeptor-Ligand Paaren zur Interaktion von Zellen. *Dissertation*.
- Drees, B., Friederich, E., Fradelizi, J., Louvard, D., Beckerle, M.C. and Golsteyn, R.M. (2000) Characterization of the interaction between zyxin and members of the Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein family of proteins. *J Biol Chem*, **275**, 22503-11.
- Elson, E.L. (1988) Cellular mechanics as an indicator of cytoskeletal structure and function. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, **17**, 397-430.
- Enserink, J.M., Christensen, A.E., De Rooij, J., Van Triest, M., Schwede, F., Genieser, H.G., Döskeland, S.O., Blank, J.L. and Bos, J.L. (2002) A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat Cell Biol*, **4**, 901-6.
- Ermekova, K.S., Zambrano, N., Linn, H., Minopoli, G., Gertler, F., Russo, T. and Sudol, M. (1997) The WW domain of neural protein FE65 interacts with proline-rich motifs in Mena, the mammalian homolog of Drosophila enabled. *J Biol Chem*, **272**, 32869-77.

- Escolar, G., Leistikow, E. and White, J.G. (1989) The fate of the open canalicular system in surface and suspension- activated platelets. *Blood*, **74**, 1983-8.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature*, **420**, 629-35.
- Fedorov, A.A., Fedorov, E., Gertler, F. and Almo, S.C. (1999) Structure of EVH1, a novel proline-rich ligand-binding module involved in cytoskeletal dynamics and neural function. *Nat Struct Biol*, **6**, 661-5.
- Felgner, H. (1998) Messung mechanischer Eigenschaften von einzelnen Zytoskelett-Proteinen mit einer Laser-Pinzette. *Dissertation*.
- Felsenfeld, D.P., Choquet, D. and Sheetz, M.P. (1996) Ligand binding regulates the directed movement of beta1 integrins on fibroblasts. *Nature*, **383**, 438-40.
- Fischer, T.A., Palmetshofer, A., Gambaryan, S., Butt, E., Jassoy, C., Walter, U., Sopper, S. and Lohmann, S.M. (2001) Activation of cGMP-dependent protein kinase Ibeta inhibits interleukin 2 release and proliferation of T cell receptor-stimulated human peripheral T cells. *J Biol Chem*, **276**, 5967-74.
- Fukata, M., Nakagawa, M., Kuroda, S. and Kaibuchi, K. (1999) Cell adhesion and Rho small GTPases. *J Cell Sci*, **112**, 4491-500.
- Fukata, Y., Amano, M. and Kaibuchi, K. (2001) Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci.*, **22**, 22-29.
- Galler, A.B., Garcia Arguinzonis, M.I., Baumgartner, W., Kuhn, M., Smolenski, A., Drenckhahn, D., Simm, A. and Reinhard, M. (2003) VASP-dependent regulation of cell adhesion, detachment, and actin-cytoskeleton rigidity. *eingereicht*.
- Gambaryan, S., Hauser, W., Kobsar, A., Glazova, M. and Walter, U. (2001) Distribution, cellular localization, and postnatal development of VASP and Mena expression in mouse tissues. *Histochem Cell Biol*, **116**, 535-43.
- Garcia Arguinzonis, M.I. (2003) Analysis of signal-transduction pathways and the cytoskeleton in VASP-deficient cell lines and mouse models. *Dissertation*.
- Garcia Arguinzonis, M.I., Galler, A.B., Walter, U., Reinhard, M. and Simm, A. (2002) Increased spreading, Rac/p21-activated kinase (PAK) activity, and compromised cell motility in cells deficient in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP). *J Biol Chem*, **277**, 7.
- Geese, M., Loureiro, J.J., Bear, J.E., Wehland, J., Gertler, F.B. and Sechi, A.S. (2002) Contribution of Ena/VASP Proteins to Intracellular Motility of *Listeria* Requires Phosphorylation and Proline-rich Core but Not F-Actin Binding or Multimerization. *Mol Biol Cell*, **13**, 2383-96.

- Geese, M., Schluter, K., Rothkegel, M., Jockusch, B.M., Wehland, J. and Sechi, A.S. (2000) Accumulation of profilin II at the surface of *Listeria* is concomitant with the onset of motility and correlates with bacterial speed. *J Cell Sci*, **113**, 1415-26.
- Gertler, F.B., Comer, A.R., Juang, J.L., Ahern, S.M., Clark, M.J., Liebl, E.C. and Hoffmann, F.M. (1995) Enabled, a dosage-sensitive suppressor of mutations in the *Drosophila* Abl tyrosine kinase, encodes an Abl substrate with SH3 domain-binding properties. *Genes Dev*, **9**, 521-33.
- Gertler, F.B., Doctor, J.S. and Hoffmann, F.M. (1990) Genetic suppression of mutations in the *Drosophila* abl proto-oncogene homolog. *Science*, **248**, 857-60.
- Gertler, F.B., Niebuhr, K., Reinhard, M., Wehland, J. and Soriano, P. (1996) Mena, a relative of VASP and *Drosophila* Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell*, **87**, 227-39.
- Gordon, D.J., Eisenberg, E. and Korn, E.D. (1976) Characterization of cytoplasmic actin isolated from *Acanthamoeba castellanii* by a new method. *J Biol Chem*, **251**, 4778-86.
- Grevengoed, E.E., Loureiro, J.J., Jesse, T.L. and Peifer, M. (2001) Abelson kinase regulates epithelial morphogenesis in *Drosophila*. *J Cell Biol*, **155**, 1185-98.
- Griffiths, E.K. and Penninger, J.M. (2002a) ADAP-ting TCR signaling to integrins. *Sci STKE*, **2002**, RE3.
- Griffiths, E.K. and Penninger, J.M. (2002b) Communication between the TCR and integrins: role of the molecular adapter ADAP/Fyb/Slap. *Curr Opin Immunol*, **14**, 317-22.
- Grosse, R., Copeland, J.W., Newsome, T.P., Way, M. and Treisman, R. (2003) A role for VASP in RhoA-Diaphanous signalling to actin dynamics and SRF activity. *Embo J*, **22**, 3050-3061.
- Haffner, C., Jarchau, T., Reinhard, M., Hoppe, J., Lohmann, S.M. and Walter, U. (1995) Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP. *Embo J*, **14**, 19-27.
- Halbrugge, M., Friedrich, C., Eigenthaler, M., Schanzenbacher, P. and Walter, U. (1990) Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *J Biol Chem*, **265**, 3088-93.
- Halbrugge, M. and Walter, U. (1989) Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets. *Eur J Biochem*, **185**, 41-50.
- Han, Y.H., Chung, C.Y., Wessels, D., Stephens, S., Titus, M.A., Soll, D.R. and Firtel, R.A. (2002) Requirement of a vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) family member for cell adhesion, the formation of filopodia, and chemotaxis in *Dictyostelium*. *J Biol Chem*, **277**, 17.

- Harbeck, B., Huttelmaier, S., Schluter, K., Jockusch, B.M. and Illenberger, S. (2000) Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J Biol Chem*, **275**, 30817-25.
- Hauser, W., Knobloch, K.P., Eigenthaler, M., Gambaryan, S., Krenn, V., Geiger, J., Glazova, M., Rohde, E., Horak, I., Walter, U. and Zimmer, M. (1999) Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8120-5.
- Horstrup, K., Jablonka, B., Honig-Liedl, P., Just, M., Kochsiek, K. and Walter, U. (1994) Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur J Biochem*, **225**, 21-7.
- Hou, Y., Lascola, J., Dulin, N.O., Ye, R.D. and Browning, D.D. (2003) Activation of cGMP-dependent Protein Kinase by Protein Kinase C. *J Biol Chem*, **278**, 16706-16712.
- Howe, A.K., Hogan, B.P. and Juliano, R.L. (2002) Regulation of Vasodilator-stimulated Phosphoprotein Phosphorylation and Interaction with Abl by Protein Kinase A and Cell Adhesion. *J Biol Chem*, **277**, 38121-6.
- Huttelmaier, S., Harbeck, B., Steffens, O., Messerschmidt, T., Illenberger, S. and Jockusch, B.M. (1999) Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP. *FEBS Lett*, **451**, 68-74.
- Juliano, R.L. (2002) Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin- superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **42**, 283-323.
- Kang, F., Laine, R.O., Bubb, M.R., Southwick, F.S. and Purich, D.L. (1997) Profilin interacts with the Gly-Pro-Pro-Pro-Pro sequences of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP): implications for actin- based Listeria motility. *Biochemistry*, **36**, 8384-92.
- Katagiri, K., Hattori, M., Minato, N., Irie, S., Takatsu, K. and Kinashi, T. (2000) Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Mol Cell Biol*, **20**, 1956-69.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Kaibuchi, K. (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho- kinase). *Science*, **273**, 245-8.
- Kitayama, H., Sugimoto, Y., Matsuzaki, T., Ikawa, Y. and Noda, M. (1989) A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell*, **56**, 77-84.
- Klostermann, A., Lutz, B., Gertler, F. and Behl, C. (2000) The orthologous human and murine semaphorin 6A-1 proteins (SEMA6A- 1/Sema6A-1) bind to the enabled/vasodilator-



- stimulated phosphoprotein-like protein (EVL) via a novel carboxyl-terminal zyxin-like domain. *J Biol Chem*, **275**, 39647-53.
- Krause, M., Sechi, A.S., Konradt, M., Monner, D., Gertler, F.B. and Wehland, J. (2000) Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol*, **149**, 181-94.
- Krugmann, S., Jordens, I., Gevaert, K., Driessens, M., Vandekerckhove, J. and Hall, A. (2001) Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. *Curr Biol*, **11**, 1645-55.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Lambrechts, A., Kwiatkowski, A.V., Lanier, L.M., Bear, J.E., Vandekerckhove, J., Ampe, C. and Gertler, F.B. (2000) cAMP-dependent protein kinase phosphorylation of EVL, a Mena/VASP relative, regulates its interaction with actin and SH3 domains. *J Biol Chem*, **275**, 36143-51.
- Lanier, L.M., Gates, M.A., Witke, W., Menzies, A.S., Wehman, A.M., Macklis, J.D., Kwiatkowski, D., Soriano, P. and Gertler, F.B. (1999) Mena is required for neurulation and commissure formation. *Neuron*, **22**, 313-25.
- Lanier, L.M. and Gertler, F.B. (2000) From Abl to actin: Abl tyrosine kinase and associated proteins in growth cone motility. *Curr Opin Neurobiol*, **10**, 80-7.
- Laurent, V., Loisel, T.P., Harbeck, B., Wehman, A., Grobe, L., Jockusch, B.M., Wehland, J., Gertler, F.B. and Carlier, M.F. (1999) Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol*, **144**, 1245-58.
- Lawrence, D.W., Comerford, K.M. and Colgan, S.P. (2002) Role of VASP in reestablishment of epithelial tight junction assembly after Ca<sup>2+</sup> switch. *Am J Physiol Cell Physiol*, **282**, C1235-45.
- Lawrence, D.W. and Pryzwansky, K.B. (2001) The vasodilator-stimulated phosphoprotein is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase during neutrophil spreading. *J Immunol*, **166**, 5550-6.
- Levchenko, A., Bruck, J. and Sternberg, P.W. (2000) Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signaling and reduce its threshold properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5818-23.
- Liu, B.P., Chrzanowska-Wodnicka, M. and Burridge, K. (1998) Microtubule depolymerization induces stress fibers, focal adhesions, and DNA synthesis via the GTP-binding protein Rho. *Cell Adhes Commun*, **5**, 249-55.
- Loisel, T.P., Boujemaa, R., Pantaloni, D. and Carlier, M.F. (1999) Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature*, **401**, 613-6.

- Loureiro, J.J., Rubinson, D.A., Bear, J.E., Baltus, G.A., Kwiatkowski, A.V. and Gertler, F.B. (2002) Critical Roles of Phosphorylation and Actin Binding Motifs, but Not the Central Proline-rich Region, for Ena/Vasodilator-stimulated Phosphoprotein (VASP) Function during Cell Migration. *Mol Biol Cell*, **13**, 2533-46.
- Machesky, L.M. (2000) Putting on the brakes: a negative regulatory function for Ena/VASP proteins in cell migration. *Cell*, **101**, 685-8.
- Machesky, L.M. (2002) Sharks' teeth and dunes. *Nature*, **417**, 494-7.
- Massberg, S., Grüner, S., Konrad, I., Garcia Arguinzonis, M.I., Eigenthaler, M., Hemler, K., Kersting, J., Schulz, C., Müller, I., Heinzmann, U., Walter, U. and Gawaz, M. (2003) Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice. *eingereicht*.
- Nakagawa, H., Miki, H., Ito, M., Ohashi, K., Takenawa, T. and Miyamoto, S. (2001) N-WASP, WAVE and Mena play different roles in the organization of actin cytoskeleton in lamellipodia. *J Cell Sci*, **114**, 1555-65.
- Nakano, K., Takaishi, K., Kodama, A., Mammoto, A., Shiozaki, H., Monden, M. and Takai, Y. (1999) Distinct actions and cooperative roles of ROCK and mDia in Rho small G protein-induced reorganization of the actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell*, **10**, 2481-91.
- Niebuhr, K., Ebel, F., Frank, R., Reinhard, M., Domann, E., Carl, U.D., Walter, U., Gertler, F.B., Wehland, J. and Chakraborty, T. (1997) A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *Embo J*, **16**, 5433-44.
- Nishizaka, T., Shi, Q. and Sheetz, M.P. (2000) Position-dependent linkages of fibronectin-integrin-cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 692-7.
- Obergfell, A., Judd, B.A., del Pozo, M.A., Schwartz, M.A., Koretzky, G.A. and Shattil, S.J. (2001) The molecular adapter SLP-76 relays signals from platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, **276**, 5916-23.
- Ohba, Y., Ikuta, K., Ogura, A., Matsuda, J., Mochizuki, N., Nagashima, K., Kurokawa, K., Mayer, B.J., Maki, K., Miyazaki, J. and Matsuda, M. (2001) Requirement for C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion and embryogenesis. *Embo J*, **20**, 3333-41.
- Ohta, S., Mineta, T., Kimoto, M. and Tabuchi, K. (1997) Differential display cloning of a novel rat cDNA (RNB6) that shows high expression in the neonatal brain revealed a member of Ena/VASP family. *Biochem Biophys Res Commun*, **237**, 307-12.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L. and Mullins, R.D. (2000) Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **29**, 545-76.

- Pollard, T.D. and Borisy, G.G. (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, **112**, 453-65.
- Prehoda, K.E., Lee, D.J. and Lim, W.A. (1999) Structure of the enabled/VASP homology 1 domain-peptide complex: a key component in the spatial control of actin assembly. *Cell*, **97**, 471-80.
- Price, C.J. and Brindle, N.P. (2000) Vasodilator-stimulated phosphoprotein is involved in stress-fiber and membrane ruffle formation in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 2051-6.
- Price, L.S., Leng, J., Schwartz, M.A. and Bokoch, G.M. (1998) Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol Biol Cell*, **9**, 1863-71.
- Rangarajan, S., Enserink, J.M., Kuiperij, H.B., de Rooij, J., Price, L.S., Schwede, F. and Bos, J.L. (2003) Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the beta 2-adrenergic receptor. *J Cell Biol*, **160**, 487-93.
- Raucher, D. and Sheetz, M.P. (1999) Characteristics of a membrane reservoir buffering membrane tension. *Biophys J*, **77**, 1992-2002.
- Raucher, D. and Sheetz, M.P. (2000) Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *J Cell Biol*, **148**, 127-36.
- Raucher, D., Stauffer, T., Chen, W., Shen, K., Guo, S., York, J.D., Sheetz, M.P. and Meyer, T. (2000) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. *Cell*, **100**, 221-8.
- Reinhard, M., Giehl, K., Abel, K., Haffner, C., Jarchau, T., Hoppe, V., Jockusch, B.M. and Walter, U. (1995a) The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *Embo J*, **14**, 1583-9.
- Reinhard, M., Halbrugge, M., Scheer, U., Wiegand, C., Jockusch, B.M. and Walter, U. (1992) The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *Embo J*, **11**, 2063-70.
- Reinhard, M., Jarchau, T. and Walter, U. (2001) Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins. *Trends Biochem Sci*, **26**, 243-9.
- Reinhard, M., Jouvenal, K., Tripier, D. and Walter, U. (1995b) Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7956-60.
- Reinhard, M., Rudiger, M., Jockusch, B.M. and Walter, U. (1996) VASP interaction with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs. *FEBS Lett*, **399**, 103-7.
- Ren, X.D., Kiosses, W.B. and Schwartz, M.A. (1999) Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *Embo J*, **18**, 578-85.

- Renfranz, P.J. and Beckerle, M.C. (2002) Doing (F/L)PPPPs: EVH1 domains and their proline-rich partners in cell polarity and migration. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 88-103.
- Rotsch, C. and Radmacher, M. (2000) Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study. *Biophys J*, **78**, 520-35.
- Rottner, K., Behrendt, B., Small, J.V. and Wehland, J. (1999) VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat Cell Biol*, **1**, 321-2.
- Sahai, E., Olson, M.F. and Marshall, c.J. (2001) Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *Embo J*, **20**, 755-766.
- Salmon, E.D., McKeel, M. and Hays, T. (1984) Rapid rate of tubulin dissociation from microtubules in the mitotic spindle in vivo measured by blocking polymerization with colchicine. *J Cell Biol*, **99**, 1066-75.
- Schmidt, C.E., Horwitz, A.F., Lauffenburger, D.A. and Sheetz, M.P. (1993) Integrin-cytoskeletal interactions in migrating fibroblasts are dynamic, asymmetric, and regulated. *J Cell Biol*, **123**, 977-91.
- Schoenwaelder, S.M. and Burridge, K. (1999) Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 274-86.
- Sebzda, E., Bracke, M., Tugal, T., Hogg, N. and Cantrell, D.A. (2002) Rap1A positively regulates T cells via integrin activation rather than inhibiting lymphocyte signaling. *Nat Immunol*, **3**, 251-8.
- Sheetz, M.P. (2001) Cell control by membrane-cytoskeleton adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 392-6.
- Simon, A., Cohen-Bouhacina, T., Porté, M.C., Aimé, J.P., Amédée, J., Bareille, R. and Baquey, C. (2003) Characterization of dynamic cellular adhesion of osteoblasts using atomic force microscopy. *Cytometry*, **54A**, 36-47.
- Skoble, J., Auerbuch, V., Goley, E.D., Welch, M.D. and Portnoy, D.A. (2001) Pivotal role of VASP in Arp2/3 complex-mediated actin nucleation, actin branch-formation, and *Listeria monocytogenes* motility. *J Cell Biol*, **155**, 89-100.
- Smith, G.A., Theriot, J.A. and Portnoy, D.A. (1996) The tandem repeat domain in the *Listeria monocytogenes* ActA protein controls the rate of actin-based motility, the percentage of moving bacteria, and the localization of vasodilator-stimulated phosphoprotein and profilin. *J Cell Biol*, **135**, 647-60.
- Smolenski, A., Poller, W., Walter, U. and Lohmann, S.M. (2000) Regulation of human endothelial cell focal adhesion sites and migration by cGMP-dependent protein kinase I. *J Biol Chem*, **275**, 25723-32.

- Southwick, F.S., Li, W., Zhang, F., Zeile, W.L. and Purich, D.L. (2003) Actin-based endosome and phagosome rocketing in macrophages: activation by the secretagogue antagonists lanthanum and zinc. *Cell Motil Cytoskeleton*, **54**, 41-55.
- Spudich, J.A. and Watt, S. (1971) The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J Biol Chem*, **246**, 4866-71.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, **189**, 113-30.
- Suter, D.M. and Forscher, P. (2000) Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *J Neurobiol*, **44**, 97-113.
- Svitkina, T.M., Bulanova, E.A., Chaga, O.Y., Vignjevic, D.M., Kojima, S., Vasiliev, J.M. and Borisy, G.G. (2003) Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol*, **160**, 409-21.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4.
- Tsukamoto, N., Hattori, M., Yang, H., Bos, J.L. and Minato, N. (1999) Rap1 GTPase-activating protein SPA-1 negatively regulates cell adhesion. *J Biol Chem*, **274**, 18463-9.
- Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M. and Fuchs, E. (2000) Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell*, **100**, 209-19.
- Vasioukhin, V. and Fuchs, E. (2001) Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 76-84.
- Wakatsuki, T., Schwab, B., Thompson, N.C. and Elson, E.L. (2001) Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *J Cell Sci*, **114**, 1025-36.
- Wakioka, T., Sasaki, A., Kato, R., Shouda, T., Matsumoto, A., Miyoshi, K., Tsuneoka, M., Komiya, S., Baron, R. and Yoshimura, A. (2001) Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature*, **412**, 647-51.
- Walders-Harbeck, B., Khaitlina, S., Hinssen, H., Jockusch, B. and Illenberger, S. (2002) The vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes actin polymerisation through direct binding to monomeric actin. *FEBS Lett*, **529**, 275.
- Wessel, D. and Flugge, U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*, **138**, 141-3.
- Yu, T.W., Hao, J.C., Lim, W., Tessier-Lavigne, M. and Bargmann, C.I. (2002) Shared receptors in axon guidance: SAX-3/Robo signals via UNC-34/Enabled and a Netrin-independent UNC-40/DCC function. *Nat Neurosci*, **5**, 1147-54.

- Zettl, M. and Way, M. (2002) The WH1 and EVH1 Domains of WASP and Ena/VASP Family Members Bind Distinct Sequence Motifs. *Curr Biol*, **12**, 1617.
- Zimmermann, J., Labudde, D., Jarchau, T., Walter, U., Oschkinat, H. and Ball, L.J. (2002) Relaxation, Equilibrium Oligomerization, and Molecular Symmetry of the VASP (336-380) EVH2 Tetramer. *Biochemistry*, **41**, 11143-51.

## 7. Abkürzungen

„His-tag“	hier: MRGSH <sub>6</sub> GSAM (Peptidsequenz)
„VSV-tag“	hier: MYTDIEMNRLGKP (Peptidsequenz)
8CPT-2Me-cAMP	8-(4-Chlorophenylthio)-2'-O-methyladenosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
8p-CPT-cGMP	8-(4-Chlorophenylthio)guanosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
A	Ampère
A <sub>280</sub>	Absorption bei 280 nm
Abb.	Abbildung
Abl	<i>Abelson tyrosine kinase</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arp	<i>actin related protein</i>
Arp	<i>actin related protein</i>
AS	Aminosäure(n)
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Avena	<i>avian Enabled</i>
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Bovine serum albumin</i> )
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
Da	<i>Dalton</i>
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbeccos's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	Dithioerithrit
DTT	Dithiothreit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ena	<i>Enabled</i>
EVH1	<i>Ena/VASP homology 1</i>
EVH2	<i>Ena/VASP homology 2</i>
Evl	<i>Ena/VASP-like</i>
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	<i>Fetal calf Serum</i> , fötales Kälberserum
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G-Aktin	globuläres Aktin
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
h	Stunden
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HUVEC	<i>human endothelial cells</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IF	Immunfluoreszenz
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalakto(pyrano)sid
ITS	Insulin-Transferrin-Selenit

---

## Abkürzungen

---

Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
l	Liter
lac	
LCR	<i>low complexity region</i>
Lyn	
m	milli
M	molar
mAK	Monoklonaler Antikörper
min	Minute
MLC	<i>myosin light chain</i>
MWCO	<i>molecular weight cutoff</i>
Nickel-NTA	<i>nitrilotriacetic acid</i>
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
p	piko
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
Pak	<i>p21 activated kinase</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pH	pH-Wert
pI	isoelektrischer Punkt
PKA	Protein Kinase A (cAMP abhängige Proteinkinase)
PKG	Protein Kinase G (cGMP abhängige Proteinkinase)
PKI	Inhibitor der PKA
PtK	<i>Potorous tridactylis kidney</i>
Robo	<i>roundabout</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
src	<i>Sarcoma producing protein</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfates</i>
SH2	<i>src homology 2</i>
SH3	<i>src homology 3</i>
src	
Sulfo-SMCC	Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	<i>Unit</i> (Enzymeinheit)
UV	ultraviolett
V	Volt
v, Vol.	Volumen
v/v	<i>volume per volume</i>
VASP	<i>vasodilator stimulated phosphoprotein</i>
VSV-G	<i>vesicular stomatitis virus glycoprotein G</i>
W	Watt
w	Gewicht
w/v	<i>weight per volume</i>
WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndorme associated protein</i>
WB	<i>Western Blot</i>
WH1	<i>WASP homology domain 1</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
μ	mikro



## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Name: Annette Bettina Galler  
Geburtsdaten: 05. Februar 1975 in Münster  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung:**

08/81-05/94 Grundschule und Gymnasium in Münster  
Abschluss: Abitur

### **Studium:**

10/94-08/99 Biochemie, Ruhr-Universität Bochum  
Abschluss: Diplom-Biochemikerin

11/93-08/99 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zellphysiologie der Fakultät für  
Biologie unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. H. Hatt  
Thema: Molekularbiologische und elektrophysiologische  
Charakterisierung retinaler Glycinrezeptoren

### **Berufliche Tätigkeit:**

seit 10/99 Doktorarbeit am Institut für klinische Biochemie und  
Pathobiochemie der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg  
bei Prof. Dr. U. Walter

### **Weiterbildung:**

08/2002 FEBS-EMBO advanced lecture course, Spetses, Griechenland  
„Molecular Mechanisms in Signal Transduction“

### **sonstige Tätigkeiten:**

10/95-08/99 Leitung und Organisation von Tutorien  
Mitglied im Fachschaftsrat, Fakultätsrat, Berufungs- und  
Prüfungskommission  
01/99 Betreuung eines Studentenpraktikums

Würzburg, 30. Juli 2003

