

Untersuchungen zur Bedeutung von Spaltprodukten des vas-
kulär endothelialen (VE-) Cadherin als Auslöser für die
Schrankenstörung des Gefäßendothels.

Characterisation of the endothelial barrier-disruptive effects
of soluble vascular endothelial (sVE-) cadherin.



Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Biomedizin

Vorgelegt von

Juna-Lisa Knop

aus

Buchholz in der Nordheide

Würzburg, 2023



Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Christian Wegener

1. Betreuer: Univ.-Prof. Dr. med. Nicolas Schlegel

2. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Dandekar

3. Betreuer: Uni-Prof. Dr. Thomas Müller

4. Betreuer: Dr. Natalie Burkard

In Erinnerung an meine Oma

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Doktorarbeit nicht zustande gekommen wäre.

Zuallererst geht mein Dank an Herrn Prof. Dr. med. Germer für die Möglichkeit in der Chirurgie I des Universitätsklinikums Würzburg promovieren zu dürfen.

Besonders bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Schlegel für das interessante Thema und den fachlichen Rat. Darüber hinaus ermöglichte er mir die Teilnahme an mehreren internationalen Konferenzen, auf denen ein Austausch mit anderen Expert*innen stattfinden konnte.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Prof Dr. Dandekar und Prof Dr. Müller für das Erstellen des Zweit- und Drittgutachtens, sowie für die Diskussionsbereitschaft und die neuen Anregungen bezüglich meines Projekts.

Zudem möchte ich mich bei der *Graduate School of Life Sciences* (GSLS) für die Organisation und Durchführung des Graduiertenprogramms bedanken und für die Möglichkeit an Workshops und Konferenzen teilzunehmen.

Danken möchte ich außerdem Herrn Prof. Dr. rer. nat. Otto und Frau Dr. rer. nat. Burkard, ohne die das Labor nicht reibungslos funktionieren könnte.

Mein Dank gilt folgenden Personen: Mariola Dragan, Sibylle Eber, Dr. Irina Chodnevskaja, Sabine Gahn, Bettina Pörsch, Thekla Selig, Daniela Kraemer-Alm, Eva Riedel, Veronica Heimbach, Monika Koospal, Andrea Prappacher, Manuela Hofmann und Viktor Krempe, die mich im Laboralltag unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei Lorraine Stevenson-Knebel und Ulrike Faber, die mir immer bei organisatorischen und bürokratischen Fragen zur Seite standen.

Ein großes herzliches Dankeschön an Herr Dr. rer. nat. Hankir, Frau Dr. rer. nat Hoffmann und Rebecca Springer, die nicht nur Kolleginnen und Kollegen, sondern auch

Freundinnen und Freunde geworden sind und mich auf meinem Weg als Wissenschaftlerin unterstützt haben.

Auch meinen Eltern, Schwestern sowie Konstantin und Alexandra Arzt möchte ich meinen Dank aussprechen, da sie Interesse gezeigt haben und Motivation zugleich waren.

Abschließend möchte ich meinem Lebensgefährten Daniel danken, der es geduldet hat, dass ich an Wochenenden und Feiertagen mehr Zeit mit Endothelzellen als mit ihm verbracht habe. Der mir durch seine Diskussionsbereitschaft über Längen und Durststrecken hinweghalf sowie auf mein persönliches Wohlempfinden geachtet hat. Er hat mich privat als auch beruflich in jeglicher Art unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| I. SUMMARY | 1 |
| II. ZUSAMMENFASSUNG..... | 2 |
| III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 3 |
| 1 Einleitung | 7 |
| 1.1 Klinischer Bezug und Hintergrund der Arbeit | 7 |
| 1.2 Das Endothel | 8 |
| 1.2.1 Aufbau der Endothelbarriere | 9 |
| 1.2.2 Zytoskelett der Endothelzellen | 12 |
| 1.2.3 Aufbau der Adhärenskontakte | 13 |
| 1.3 Mechanismen der endothelialen Barriereregulation..... | 20 |
| 1.3.1 Endothel im Ruhezustand..... | 20 |
| 1.3.2 Endothel bei einer inflammatorischen Antwort..... | 20 |
| 1.4 Pathophysiologie des Zusammenbruchs der Endothelbarriere und Bildung von VE-Cadherin Spaltprodukten..... | 25 |
| 2 Zielsetzung der Arbeit..... | 27 |
| 3 Material | 28 |
| 4 Methoden..... | 33 |
| 4.1 Molekularbiologische Methoden..... | 33 |
| 4.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR) | 33 |
| 4.1.2 Aufreinigung von DNA | 35 |
| 4.1.3 BP-Rekombinationsreaktion..... | 35 |
| 4.1.4 LR-Rekombinationsreaktion | 36 |
| 4.1.5 Transformation | 37 |
| 4.1.6 Plasmidisolierung | 37 |
| 4.1.7 DNA-Konzentrationsmessung..... | 38 |
| 4.1.8 Sequenzierung | 38 |
| 4.2 Zellbiologische Methoden | 38 |
| 4.2.1 Zellkultur immortalisierter adhärenter Zelllinien | 38 |
| 4.2.2 Zellzahlbestimmung | 39 |
| 4.2.3 Transfektion..... | 39 |
| 4.2.4 VE-Cadherin ELISA | 39 |
| 4.2.1 Zellkultur primärer Zelllinien..... | 40 |
| 4.2.2 Auftauen primärer Zellen | 40 |
| 4.2.3 Passagieren von primären Zellen..... | 40 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 4.2.4 | Behandlung der primären Zellen | 41 |
| 4.2.5 | <i>Electric Cell-Substrate Impedance Sensing</i> (ECIS) zur Bestimmung des Transendothelialen elektrischen Widerstands (TER)..... | 41 |
| 4.2.6 | Transwell Assay zur Messung der endothelialen Permeabilität <i>in vitro</i> .. | 41 |
| 4.2.7 | Immunfluoreszenz | 42 |
| 4.2.8 | Western Blot Analyse | 43 |
| 4.2.9 | Immunpräzipitation | 45 |
| 4.2.10 | Statistik | 45 |
| 5 | Ergebnisse | 47 |
| 5.1 | sVE-Cadherin ^{EC1-5} Generierung | 47 |
| 5.2 | Das Spaltprodukt sVE-Cadherin ^{EC1-5} und seine Auswirkungen..... | 48 |
| 5.2.1 | Effekt von sVE-Cadherin ^{EC1-5} auf die Endothelbarriere Funktion | 48 |
| 5.2.2 | Effekt von sVE-Cadherin ^{EC1-5} auf den VE-Cadherin-Multiprotein-Komplex 54 | |
| 5.2.3 | Auswirkungen von sVE-Cadherin ^{EC1-5} auf den VE-PTP-Signalweg | 65 |
| 5.2.4 | Signalweg der sVE-Cadherin ^{EC1-5} -Effekte | 70 |
| 5.3 | Klonierung von EC1-4 und EC3-5 in den Vektor pcDNA-pDEST47 | 74 |
| 5.3.1 | EC1-4..... | 74 |
| 5.3.2 | EC3-5..... | 77 |
| 5.4 | Klonierung von EC1-4 in den pcDNA TM 6/ <i>myc</i> -His-B-Vektor | 79 |
| 6 | Diskussion | 83 |
| 6.1 | Generierung von sVE-Cadherin ^{EC1-5} und anderer VE-Cadherin Spaltprodukte zur Untersuchung direkter Effekte auf die Endothelbarriere | 83 |
| 6.2 | sVE-Cadherin ^{EC1-5} führt dosisabhängig zum Zusammenbruch der Endothelbarriere..... | 84 |
| 6.3 | Der negative Effekt von sVE-Cadherin ^{EC1-5} auf den VE-Cadherin Multiprotein-Komplex..... | 86 |
| 6.4 | Der VE-PTP-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei dem sVE-Cadherin ^{EC1-5} -Effekt | 87 |
| 6.5 | Der RhoA-ROCK-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei den sVE-Cadherin ^{EC1-5} -vermittelten Effekten | 89 |
| 6.6 | Herstellung des Konstrukts pcDNA TM 6/ <i>myc</i> -His B_EC1-4 für weiterführende mechanistische Untersuchungen | 92 |
| 6.7 | Schlussfolgerung und mögliche klinische Relevanz der Beobachtungen | 93 |
| 7 | Literaturverzeichnis..... | 94 |
| 8 | Abbildungsverzeichnis | 107 |
| 9 | Tabellenverzeichnis..... | 109 |

| | | |
|------|------------------------|-----|
| 10 | Publikationslist | 110 |
| 11 | Curriculum Vitae..... | 111 |
| 12 | Appendix | 113 |
| 12.1 | Sequenzen..... | 113 |
| 12.2 | Plasmidkarten | 121 |

I. SUMMARY

A key prognostic event preceding organ failure in sepsis and systemic inflammatory processes is dysfunction of the microvascular endothelial barrier. The transmembrane protein vascular endothelial (VE-) cadherin is an important prerequisite to stabilize endothelial barrier. VE-cadherin is cleaved under inflammatory conditions which results in the release of soluble VE-cadherin (sVE-cadherin). The main hypothesis of this thesis is to investigate whether sVE-cadherin itself directly disrupts the endothelial barrier in the absence of proinflammatory stimuli.

Human sVE-cadherin consisting of extracellular domains EC1-5 (sVE-cadherin^{EC1-5}) was generated and applied onto primary human dermal endothelial cells (HDMECs) for structural and functional analysis. Measurements of transendothelial electrical resistance (TER) and 4 kDa FITC-dextran flux revealed that sVE-cadherin^{EC1-5} dose-dependently disrupts endothelial barrier integrity. This was confirmed by immunostaining and immunoblotting analysis which showed that sVE-cadherin^{EC1-5} treatment reduced overall levels of VE-cadherin and the associated proteins α -, γ - and δ -catenin and ZO-1 as well as their distribution at the cell border of HDMECs. sVE-cadherin^{EC1-5} treatment reduced the interaction between the phosphatase VE-PTP and VE-cadherin. Accordingly, pharmacological inhibition of VE-PTP using AKB9778 reversed sVE-cadherin^{EC1-5}-induced endothelial barrier loss. Further analysis showed that the increased expression of GEF-H1 by sVE-cadherin^{EC1-5} is also attenuated by AKB9778. In addition to these studies, the constructs EC1-4 and EC3-5 were cloned into different vectors to determine whether the extracellular domain 5 of VE-cadherin plays the dominant role in sVE-cadherin-mediated effects.

In summary, these studies show for the first time that sVE-cadherin^{EC1-5} actively contributes to breakdown of the endothelial barrier independently of proinflammatory stimuli via activation of the VE-PTP/RhoA signaling pathway. This represents a new pathophysiological mechanism that adds to the understanding of inflammation-induced endothelial barrier changes.

II. ZUSAMMENFASSUNG

Ein Schlüsselereignis, welches dem prognosebestimmenden Organversagen bei systemischen Entzündungsprozessen und Sepsis vorangeht, ist die Entwicklung einer mikrovaskulären endothelialen Schrankenstörung. Das vaskuläre endotheliale (VE-) Cadherin als mechanischer Stabilisator der Endothelbarriere spielt dabei eine wichtige Rolle. In der Inflammation werden Spaltprodukte von VE-Cadherin (sVE-Cadherin) gebildet. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Hypothese ob diese Spaltprodukte selbst an der Störung der endothelialen Barrierefunktion beteiligt sind.

Es wurde hierfür humanes sVE-Cadherin bestehend aus den extrazellulären Domänen EC1-5 (sVE-Cadherin^{EC1-5}) generiert. In Messungen des transendothelialen elektrischen Widerstands (TER), mit Immunfluoreszenzfärbungen und Western Blot Analysen wird gezeigt, dass sVE-Cadherin dosisabhängig die Barriere Integrität in primären humanen dermalen Endothelzellen stört. Dies führt zu einer Reduktion von VE-Cadherin und den assoziierten Proteinen α -, γ - und δ -Catenin und ZO-1, die nach der Applikation von sVE-Cadherin an den Zellgrenzen reduziert sind. Die Interaktion zwischen VE-PTP und VE-Cadherin wird durch sVE-Cadherin^{EC1-5} reduziert. Durch pharmakologische Hemmung der Phosphataseaktivität von VE-PTP mittels AKB9778 wird der durch sVE-Cadherin^{EC1-5}-induzierte Verlust der Endothelbarriere aufgehoben. Dagegen zeigt die direkte Aktivierung von Tie-2 mittels Angiopoetin-1 keinen protektiven Effekt auf die durch sVE-Cadherin^{EC1-5} gestörte Endothelbarriere. Weitere Analysen zeigen eine erhöhte Expression von GEF-H1 durch sVE-Cadherin^{EC1-5}. Diese ist ebenfalls durch AKB9778 hemmbar.

Zusätzlich zu diesen Untersuchungen wurden die Konstrukte EC1-4 und EC3-5 in verschiedene Vektoren kloniert, um zu bestimmen, ob die extrazelluläre Domäne 5 von VE-Cadherin die dominante Rolle bei den sVE-Cadherin-vermittelten Effekten spielt.

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen zum ersten Mal, dass sVE-Cadherin^{EC1-5} unabhängig von proinflammatorischen Auslösern über die Aktivierung des VE-PTP/RhoA-Signalweges den Zusammenbruch der Endothelbarriere mitversursacht. Dies stellt einen neuen pathophysiologischen Mechanismus dar, der zum Gesamtverständnis der entzündungsinduzierten Barriereveränderungen des Endothels beiträgt.

III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|------------------|---|
| ADAM | A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein |
| Ang-1 | Angiopoetin-1 |
| ANGPT1 | Angiopoetin-1 |
| Arf | auxin-response factor |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AUC | area under the curve |
| BCA | Bicinchoninsäure |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| BSS | Balanced Salt Solution |
| Ca ²⁺ | Calcium |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CDH | calcium-dependent cell-cell adhesion molecule |
| CHO | Chinese Hamster Ovary |
| cm | centimeter/ Zentimeter |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CTRL | control/ Kontrolle |
| Da | Dalton |
| dag | donkey anti-goat |
| dam | donkey anti-mouse |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| darb | donkey anti-rabbit |
| dash | donkey anti-sheep |
| DMEM | Dulbeccos modified eagle's medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonucleic acid/ Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | desoxy Nukleosid Tri Phosphat |
| DPBS | dulbecco's phosphate buffered saline |
| DTT | Dithiothreitol |
| EC | extrazelluläre Domäne |
| ECIS | Electric Cell-substrate Impedance Sensing |
| eD | extrazelluläre Domäne |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |

| | |
|------------------|---|
| EGF | Epidermal Growth Factor |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| F-Aktin | Filamentäres Aktin/ Mikrofilamente |
| FNIII | Fibronektin Typ III |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| FGD | FYVE, RhoGEF and PH Domain Containing |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FReD | Fibrinogen-ähnliche Domäne |
| fw | forward, vorwärts |
| g | Gramm |
| g | Erdbeschleunigung (9,81m/s ²) |
| G-Aktin | Aktinmonomere |
| gam | goat anti-mouse |
| GAP | GTPase-activating protein |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| garb | goat anti-rabbit |
| GDI | GDP-dissociation inhibitor |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GEF | Guanotid exchange factor |
| GFP | Green-Fluorescent Protein |
| GPCR | G-Protein gekoppelter Rezeptor |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| GTPasen | GTP-Bindungsproteine |
| h | Stunde |
| H ₂ O | Wasser |
| HDMEC | Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen |
| HEK | human embryonic kidney |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HF | High-Fidelity |
| HPTP-β | human protein tyrosine phosphatase beta |
| HRP | Horseradish peroxidase/ Meerrettichperoxidase |
| Hz | Herz |
| iD | intrazelluläre Domäne |

| | |
|-------------------|--|
| JAM | Junctional Adhesion Molecule |
| JMD | juxtamembranäre Domäne |
| kb | Kilo Basen |
| kg | Kilogramm |
| l | Liter |
| LB | Lurani Bertani |
| LECT | Leukocyte cell-derived chemotaxin |
| LIM | LIN-11, Isl-1 and MEC-3 |
| LIMK | LIM-Kinase |
| LPS | Lipopolysacharid |
| M | Molar [g/mol] |
| MAPK | mitogen-activated protein kinase |
| MgCl ₂ | Magnesium Chlorid |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mM | milli Molar |
| MLC | Myosin-Leichtketten |
| MOPS | 3-(N-Morpholino) propansulfonsäure |
| MYPT | MLC phosphatase target subunit |
| N-Cadherin | neuronales Cadherin |
| NF-κB | nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells |
| ng | nanogramm |
| nm | nanometer |
| NGS | normal goat serum/ normales Ziegenserum |
| PAGE | Polyacrylamid Gelelektrophorese |
| PAK | p21-aktivierte Kinase |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PDZ | PSD-95/SAP90, Dlg und ZO-1-Bindedomäne |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PKC | Proteinkinase C |
| P/S | Penicillin G/Streptomycin |
| RPTP | Receptor-type Protein Tyrosine Phosphatase |

| | |
|--------------|--|
| Rab | Ras-related in brain |
| Rac1 | Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 |
| Ran | Ras-related nuclear protein |
| Ras | Rat sarcoma |
| rev | reverse, rückwärts |
| Rho | Ras-Homologie-Protein |
| RIPA | Radioimmunoprecipitation assay |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROCK | Rho-associated protein kinase |
| rpm | revolutions per minute |
| RT | Raumtemperatur |
| S1P | Site-1 protease |
| SCD | Superclustering Domain |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| s | Sekunde |
| SIRS | Systemic Inflammatory Response Syndrome |
| sVE-Cadherin | soluble VE-Cadherin |
| TBST | Tris buffered saline with Tween20 |
| TE | TRIS EDTA |
| TER | Transendothelialer elektrischer Widerstand |
| Tie | Tunica Interna Endothelial |
| TNF α | Tumornekrosefaktor-alpha |
| U | Unit (Enzymeinheit) |
| μ l | Mikroliter |
| VE-Cadherin | vaskuläres endotheliales Cadherin |
| VEGFR | Vascular Endothelial Growth Factor |
| VE-PTP | vaskuläre endotheliale Protein-Tyrosin-Phosphatase |
| vgl | vergleiche |
| vs | versus |
| Wnt | Wingless-int-1 |
| ZO | Zonula occludens-Protein |

1 Einleitung

1.1 Klinischer Bezug und Hintergrund der Arbeit

Mit einer hohen Sterblichkeitsrate von durchschnittlich 34,7 % weltweit, ist das Krankheitsbild der Sepsis ein schwerwiegendes Problem in der Klinik (Bauer et al., 2020). Die 30-Tage-Sterblichkeit bei dem septischen Schock liegt in Nord Amerika bei 33,7 %, in Europa bei 32,5 % und in Australien bei 26,4 % (Bauer et al., 2020). Jährlich sind in Deutschland ungefähr 75.000 und weltweit elf Millionen Todesfälle aufgrund einer Sepsis zu verzeichnen.

Die anfänglichen Definitionen der Sepsis beruhen auf dem *Systemic Inflammatory Response Syndrom* (SIRS-) Konzept. Dieses wurde 1992 veröffentlicht (Bone et al., 1992). Zu den SIRS-Kriterien gehören Hypo- ($< 36^{\circ}\text{C}$) oder Hyperthermie ($> 38^{\circ}\text{C}$), Tachykardie ($> 90/\text{min}$), Tachypnoe ($> 20/\text{min}$), eine Leukozytose ($> 12.000/\mu\text{l}$) oder Leukopenie ($< 4.000/\mu\text{l}$) und/oder Linksverschiebung ($> 10\%$). Wenn zwei oder mehr dieser Kriterien erfüllt waren und diese in Zusammenhang mit dem Verdacht oder Nachweis einer Entzündung einhergingen, erfüllte dies die Voraussetzung zur Diagnose der Sepsis. Die SIRS-Kriterien wurden bis dato nicht systemisch evaluiert. Daraus lässt sich erkennen, dass sich die mit relativer Sepsis assoziierte Krankenhaussterblichkeit in den Jahren 2004 bis 2009 verringert, jedoch die absolute Anzahl der Verstorbenen beständig erhöht hat (Gaieski et al., 2013). Unter anderem aus diesem Grund wurde im Jahr 2016 die Sepsis auf wissenschaftlicher Basis neu definiert. Sie beschreibt eine lebensbedrohliche Organdysfunktion infolge einer fehlregulierten Antwort des Körpers auf eine Infektion (Singer et al., 2016).

Die Auslöser einer Sepsis sind überwiegend Bakterien, es können jedoch auch Viren, Pilze und Parasiten eine Sepsis auslösen. Gelangen die Krankheitserreger in das Lymph- und Blutgefäßsystem und breiten sich dort aus, reagiert das Immunsystem mit einer übermäßigen Reaktion. Infolgedessen werden nicht nur die Erreger selbst angegriffen, sondern auch das eigene Gewebe. Dies führt zu einer komplexen Kaskade verschiedener Veränderungen, die zur Mikrozirkulationsstörung mit konsekutivem Organversagen führen. Das Organversagen stellt das prognosebestimmende Ereignis bei der Sepsis dar. Dies wird auch durch die neue Sepsis Definition deutlich. Entscheidend bei der Entwicklung eines Organversagen ist die Induktion der Mikrozirkulationsstörung, die zur metabolischen Unterversorgung des Gewebes führt. Hierzu trägt die Störung der endothelialen

Barrierefunktion maßgeblich bei. Die mikrovaskuläre endotheliale Schrankenstörung hat zur Folge, dass die Lymph- beziehungsweise Blutgefäße Durchlässigkeit entwickeln und deren Flüssigkeiten vom Lumen in den extrazellulären Raum des Gewebes fließen. Dies verändert die Rheologie des Blutes, wodurch das Gewebe und die Organe unterversorgt werden und versagen. Die endotheliale Schrankenstörung spielt somit eine entscheidende Rolle in der Entstehung eines Organversagens. Vorarbeiten zeigen, dass Spaltprodukte des für die Aufrechterhaltung der Endothelbarriere verantwortlichen vaskulären endothelialen (VE-) Cadherins durch den Prozess der Schrankenstörung entstehen.

VE-Cadherin ist ein wichtiges Adhäsionskontaktprotein und essenziell für die Integrität der Endothelbarriere. Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind Untersuchungen zur Bedeutung dieser VE-Cadherin-Spaltprodukte in der Pathogenese der mikrovaskulären endothelialen Schrankenstörung.

1.2 Das Endothel

Das Endothel ist eine einschichtige Zellschicht, die alle Blutgefäße von innen auskleidet. Der menschliche Körper besteht aus zehn Billionen Endothelzellen (10^{13}), welche ein Areal von 4.000 bis 7.000 Quadratmeter umfassen (Wolinsky, 1980). Das Endothel bildet eine semi-permeable Barriere mit größen-selektiver Durchlässigkeit zwischen benachbarten Zellen aus. Die Hauptfunktion des Endothels besteht darin, den Stoffaustausch über die Gefäßwand durch hoch regulatorische Transportwege zu kontrollieren (Mehta & Malik, 2006; Vandenbroucke et al., 2008). Eine weitere Funktion des Endothels ist die Regulation des Blutdrucks. Durch die Produktion von Stickstoffmonoxid, Prostacyclin und Endothelin wird der Gefäßtonus der glatten Muskulatur beeinflusst. So führen die beiden Ersteren zur Entspannung und zur Senkung des Blutdrucks. Letzteres spielt eine Rolle in der Kontraktion der glatten Muskulatur und löst somit die Blutdruckerhöhung aus. Außerdem werden Leukozyten durch die lokale Aktivierung des Endothels angelockt und helfen so bei der Wirt-Abwehr-Reaktion. Das Endothel setzt zudem Stoffe frei, die eine Sprossung neuer Blutgefäße bewirkt (Angiogenese) (Benninghoff, 2008; Faller & Schünke, 2008; Gerok, 2007). Endothelzellen stehen in direktem Kontakt zu den Zellen des Immunsystems. Hierbei haben sie unter anderem die Aufgabe die Transmigration von Leukozyten zu regulieren. Dieser Mechanismus besteht aus mehreren Schritten: Der erste Kontakt wird durch Selektine vermittelt, es folgt das Rollen der Leukozyten entlang des Endothels. Hier werden verschiedene Signalwege aktiviert. Die Leukozyten adhären und wandern aus der Blutbahn durch das Endothel in entzündetes Gewebe.

Es existieren drei Endothelarten: Fenestriertes, diskontinuierliches und kontinuierliches Endothel. Ersteres ist permeabel für Wasser und kleine hydrophile Stoffe. Es besitzt kleine Fenster und ist peritubulär in der Niere, in endokrinen Organen, in der intestinalen und nasalen Mukosa zu finden. Das diskontinuierliche Endothel bildet eine hoch permeable Zellbarriere. Zwischen den Zellen befinden sich Fenster mit einer Größe bis zu 40 Mikrometern. Es beinhaltet Poren und die meistgelösten Stoffe können passieren. Das diskontinuierliche Endothel ist funktionell für den parazellulären Transport verantwortlich und ist häufig im Knochenmark, Glomerulum und Leberläppchen zu finden.

Das kontinuierliche Endothel ist weniger permeabel. Gelöste Stoffe mit einem molekularen Radius von bis zu drei Nanometern passieren passiv die Barriere über den parazellulären Weg. Das kontinuierliche Endothel besitzt keine Poren, dafür sind jedoch viele Einbuchtungen der Plasmamembran (Caveolen) vorhanden. Es bildet dichte Zell-Zell-Kontakte zwischen benachbarten Zellen aus. Die wichtigste Funktion ist es, eine Diffusionsbarriere zwischen Blut und Gewebe auszubilden. Diese Endothelart kommt in der Lunge, dem Herzen, der Skelettmuskulatur, im Thymus, im Fettgewebe, in der Haut und im Nervensystem vor.

1.2.1 Aufbau der Endothelbarriere

Die Barrierefunktion des Endothels wird durch verschiedene Komponenten ermöglicht. Hierzu gehören die Endothelzellen selbst, die Glykokalix des Endothels und die Zell-Zell-Kontakte zwischen den benachbarten Endothelzellen. Die Glykokalix ist eine kohlenhydratreiche Schicht, die an der luminalen Seite der Endothelzelle zu finden und ein funktioneller Bestandteil der vaskulären Barriere ist (Abbildung 1). Es schützt die Zelloberfläche, besitzt Rezeptorstrukturen und ist an der Resorption von Nährstoffen beteiligt. Durch das dynamische Gleichgewicht der Glykokalix ist die Zusammensetzung heterogen.

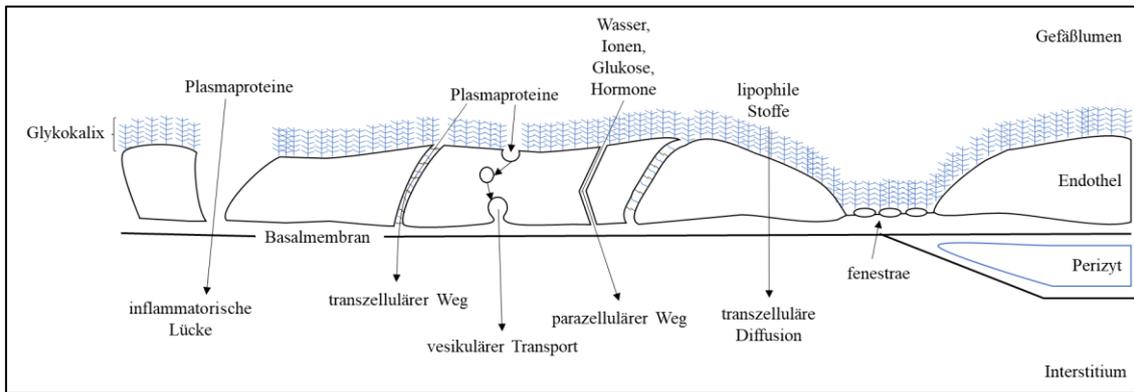


Abbildung 1-1: Aufbau des Endothels: die Abbildung zeigt schematisch wie die einzelnen Endothelzellen benachbart aneinanderragen. Die Barrierefunktion wird durch die Glykokalix und die Zell-Zellkontakte gebildet. In der Inflammation wird der parazelluläre Spalt geöffnet („inflammatorische Lücke“). Dieser wird genau wie der transzelluläre Transport unter physiologischen Bedingungen genutzt.

Die Glykokalix besteht aus dem membrangebundenen Proteoglykan, an welches die Glykosaminoglykane als Seitenketten kovalent gebunden sind. Es treten fünf Glykosaminoglykane auf: Heparansulfat, welches 90 % der Glykosaminoglykane ausmacht, Chondroitinsulfat, Dermatan-sulfat, Keratansulfat und Hyaluronsäure. Durch die negative Ladung der Seitenketten der Glykosaminoglykanen bilden diese eine negativ geladene Schicht entlang des Endothels aus. Je nach Größe und Ladung der Blutbestandteile ist die Glykokalix unterschiedlich permeabel (Carey, 1997; Reitsma et al., 2007). Grundsätzlich gibt es die Möglichkeit diese Barriere sowohl trans- als auch parazellulär zu überwinden. Die Öffnung des parazellulären Weges spielt bei der Entzündung die fundamentalste Rolle. Aus diesem Grund ist die Untersuchung der Mechanismen, die diesen Aspekt beeinflussen, für das Verständnis von großer Wichtigkeit.

Zwischen den Endothelzellen gibt es drei verschiedene Typen der Zell-Zell-Kontakte: Occludenskontakte (*tight junctions*), Adhäsionskontakte (*adherens junctions*), und Kommunikationskontakte (*gap junctions*). Erstere bestehen hauptsächlich aus drei Proteinfamilien: den Claudinen, den Occludinen sowie *junctional adhesion molecules* (JAMs) A, B & C. Die Funktion der Occludenskontakte besteht darin den parazellulären Spalt abzudichten. Sowohl die Occludine als auch die Claudine besitzen vier Transmembrandomänen. Der N- und C-Terminus sind im Zytoplasma lokalisiert. Der C-Terminus der Claudine hat am Ende eine PSD-95/SAP90-Dlg-ZO-1 (PDZ)-Bindedomäne und kann so direkt mit *zonula occludens* (ZO)-1, ZO-2 und ZO-3 interagieren. Die Proteine sind durch ihre intrazelluläre Domäne an das periphere Aktin-Zytoskelett durch Adapterproteine,

wie zum Beispiel ZO-1, Cingulin und Paracingulin, verknüpft. Sie interagieren mit regulatorischen Proteinen wie *rat sarcoma* (Ras) Homolog (Rho), Guanosintriphosphat (GTP)-Bindungsproteine (GTPasen) sowie Kinasen und Phosphatasen. Claudin-5 ist das im Endothel vorherrschend vorhandene Claudin, kommt jedoch auch in anderen Geweben vor und ist daher nicht endothel-spezifisch. Claudin-3, Claudin-5 und Claudin-12 werden hauptsächlich in den Endothelzellen des Gehirns exprimiert (Morita et al., 1999; Wolburg et al., 2003). Claudin-5 und Claudin-15 werden in renalen Endothelzellen gebildet (Kiuchi-Saishin et al., 2002; Morita et al., 1999). Claudin-2 und Claudin-16 kontrollieren die parazelluläre Ionenselektivität durch die Bildung von Ionenkanälen (Amasheh et al., 2002; Simon et al., 1999). Claudin-8 kontrolliert die parazelluläre Na²⁺ Permeabilität (Yu et al., 2003). JAMs kontrollieren die Transmigration von Leukozyten über das Endothel und tragen zur Regulation der parazellulären Permeabilität bei (Liang et al., 2000).

Die mechanische Stabilität der Zell-Zell-Kontakte wird durch die Adhäsionskontakte gewährleistet. Diese stabilisieren die Occludenskontakte und sind für die Kontrolle der Integrität der Endothelbarriere von entscheidender Bedeutung. Das wichtigste Protein der Adhäsionskontakte ist VE-Cadherin, welches über eine homophile, Ca²⁺-abhängige Interaktion ihrer extrazellulären Domänen die Aufrechterhaltung der Endothelbarriere kontrolliert (Baumgartner et al., 2000; Dejana et al., 2008). Über seine zytoplasmatische Domäne bindet VE-Cadherin direkt an δ -Catenin, β -Catenin sowie γ -Catenin und bildet so einen Proteinkomplex aus. Dieser verbindet VE-Cadherin mit dem Aktin-Zytoskelett. Dadurch wird nachvollziehbar, dass dynamische Prozesse im Aktin-Zytoskelett die treibende Kraft für eine stabile VE-Cadherin-Interaktion sind. Die Stärke der VE-Cadherin-vermittelten Adhäsion ist dadurch abhängig von der Aktin-Depolymerisierung, da mit der daraus resultierenden Verankerung am Zytoskelett die laterale Mobilität von Cadherin Molekülen in der Membran verändert wird. Adhäsionskontakte und Occludenskontakte assoziieren und interagieren funktionell sowohl in Endothel- als auch in Epithel-Zellen. ZO-Proteine und Adhäsionskontakte kommunizieren miteinander. Die Rekrutierung von Mechanotransducer, wie Vinculin und p21-aktivierte Kinase-2 (PAK2), zum VE-Cadherin Komplex wird durch ZO-1 reguliert. Dies geschieht über die Rekrutierung des RhoA-Aktivators p114Rho *guanotid exchange factor* (GEF), die zusammen einen junctionalen Regulationskomplex bilden (Tornavaca et al., 2015).

Die Kommunikationskontakte formen Connexin-vermittelte transmembranäre Kanäle zwischen benachbarten Zellen aus. Diese lassen Wasser, Ionen und kleine Signalmoleküle passieren und sind damit in der Lage ein funktionelles Synzytium zwischen den benachbarten Zellen auszubilden. Dies wird als Signalleiter innerhalb eines konfluenten Zellmonolayers benötigt.

1.2.2 Zytoskelett der Endothelzellen

Die mechanische Stabilität von Endothelzellen wird durch ein dynamisches Protein-Struktur-Geflecht im Zytoplasma vermittelt, dem Zytoskelett. Es dient zur aktiven Bewegung der Zelle und vermittelt Transportvorgänge und Signale innerhalb dieser (Benninghoff, 2008). Drei Proteinklassen sind involviert: Intermediärfilamente, Mikrotubuli und Aktin-Filamente.

Die Klassen verhalten sich dynamisch, das heißt, dass sie auf- und abbaubare Strukturproteine sind. Durch Polymersisierungsvorgänge lagern sie sich zusammen und können durch diesen Prozess Netzwerke bilden. Adapterproteine verstärken die Filamente und können sich entlang dieser bewegen und mit Strukturen, wie zum Beispiel mit dem Cadherin-Catenin Komplex, verbinden.

Die Mikrotubuli sind Hohlzylinder und der größte Bestandteil des Zytoskeletts. Sie bestehen aus Tubulin und haben einen Durchmesser zwischen 15 und 25 nm. Die Mikrotubuli sind weniger an der mechanischen Stabilisierung der Zelle beteiligt, sondern für längere Vesikel-Transportwege sowie die Bewegung und Befestigung von Organellen im Zytosol verantwortlich. Zudem sind Mikrotubuli an der Regulation der Endothelbarriere Integrität beteiligt. Die Destabilisierung dieser führt zur Aktivierung von RhoA (Birukova, Birukov, Adyshev, et al., 2005; Birukova, Smurova, Birukov, Kaibuchi, et al., 2004; Birukova, Smurova, Birukov, Usatyuk, et al., 2004; van Horck et al., 2001) über verschiedene GEFs (van Horck et al., 2001) oder *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) (Birukova, Birukov, Gorshkov, et al., 2005; Birukova, Smurova, Birukov, Kaibuchi, et al., 2004; Birukova, Smurova, Birukov, Usatyuk, et al., 2004). Dieser Vorgang führt zur Stressfaserausbildung und gesteigerter Kontraktilität. Zudem interagieren Mikrotubuli mit δ -Catenin und sind so am Transport von Cadherinen und anderen Proteinen beteiligt (Ichii & Takeichi, 2007).

Intermediärfilamente sind aus Monomeren aufgebaut und besitzen einen Durchmesser von 8-10 nm. Die genaue Funktion der Intermediärfilamente ist unbekannt. Ihnen wird jedoch eine passive mechanische Stützfunktion zugeschrieben (Mehta & Malik, 2006).

Die Aktin-Filamente sind die kleinsten Filamente im Zytoskelett, haben einen Durchmesser von circa 6 nm und bestehen größtenteils aus Aktin. Aktin ist das am stärksten exprimierte Protein im Zytoplasma. Aktin-Filamente haben eine Stützfunktion und halten die Zelle in Form. Die Aktinmonomere (G-Aktin) bilden F-Aktin (Mikrofilamente). Das Ausbilden von „Stressfasern“, also die Verstärkung der Aktinbündel, dient als Schutzreaktion zur Stabilisierung der Zelle gegen externe Zugkräfte. Dabei spielt das Zusammenwirken mit Myosin eine wichtige Rolle. Das Aktin-Zytoskelett ist über Integrine sowohl mit der extrazellulären Matrix der Zelle als auch mit den Adhäsionskontakten verbunden. Über α -Catenin werden in einer dynamischen Weise Aktin-Filamente mit dem Cadherin-Catenin-Komplex verknüpft. Die Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts hat zur Folge, dass die endotheliale Barrierefunktion gestört ist. Es kommt zu einer erhöhten Permeabilität inklusive Lückenbildung (Blum et al., 1997; Haselton et al., 1996; Waschke et al., 2005).

Die Kontraktilität von Endothelzellen wird durch die Interaktion zwischen Aktin und Myosin vermittelt. Gesteuert wird die Aktivität von Myosin durch den Phosphorylierungsstatus seines Regulators *myosin light chain* (MLC). Die MLC-Kinase kann MLC an Thr-18 und Ser-19 phosphorylieren, dadurch verändert sich seine tertiäre Struktur und seine Bewegung gegen Aktin (Garcia et al., 1995; Goeckeler & Wysolmerski, 1995; Hixenbaugh et al., 1997; Verin et al., 1998). Als Gegenspieler dephosphoryliert die MLC-Phosphatase MLC und beendet so die Kontraktion (Verin et al., 1995). In diesem Zusammenhang agiert RhoA als molekularer Schalter. Wenn RhoA von seiner inaktiven Guanosindiphosphat (GDP) gebundenen Form zur aktiven GTP-gebundenen Form wechselt, kann seine *Rho-associated protein kinase* (ROCK)-Kinase die MLC-Phosphatase durch Phosphorylierung inaktivieren. Wodurch die MLC-Phosphorylierung und Aktomyosin-Kontraktion unterstützt werden (Essler et al., 1998; Essler et al., 1999; Totsukawa et al., 2000). Y27632 kann die RhoA-Kinase hemmen, sodass eine verminderte Kontraktion stattfindet (Adamson et al., 2002).

1.2.3 Aufbau der Adhärenskontakte

Da die Adhäsionskontakte für die vorliegende Arbeit eine wichtige Rolle spielen, werden deren Struktur und Funktion im Folgenden genauer beschrieben.

1.2.3.1 VE-Cadherin

Das humane vaskuläre endotheliale Cadherin gehört zu den klassischen Typ 2 Cadherinen und wird durch das humane Gen *calcium-dependent cell-cell adhesion molecule* (CDH) 5 kodiert, welches auf dem langen Arm des Chromosoms 16 liegt. Synonyme für VE-Cadherin sind Cadherin-5 und *cluster of differentiation* (CD)144.

VE-Cadherin besteht aus drei Domänen (Abbildung 1-2): Die erste kurze intrazelluläre Domäne enthält konservierte Bindeseiten für β - und γ -Catenin. Diese Domäne vermittelt die Anheftung an das Zytoskelett und kontrolliert den Cadherin Transport. Die zweite Domäne ist die juxtamembranäre Domäne (JMD), welche δ -Catenin bindet. Letztere ist die extrazelluläre Domäne (EC). Diese besteht aus fünf Untereinheiten (EC1-5), die durch Ca^{2+} -Bindestellen verknüpft sind. In der Untereinheit EC1 existiert eine hydrophobe Tasche. EC1 und EC2 vermitteln die adhäsive Region. VE-Cadherin formt adhäsive Transdimere zwischen Monomeren aus, die auf gegenüberliegenden Zelloberflächen lokalisiert sind (Angst et al., 2001; Gumbiner, 2005; Hirano et al., 1987; Takeichi, 1988).

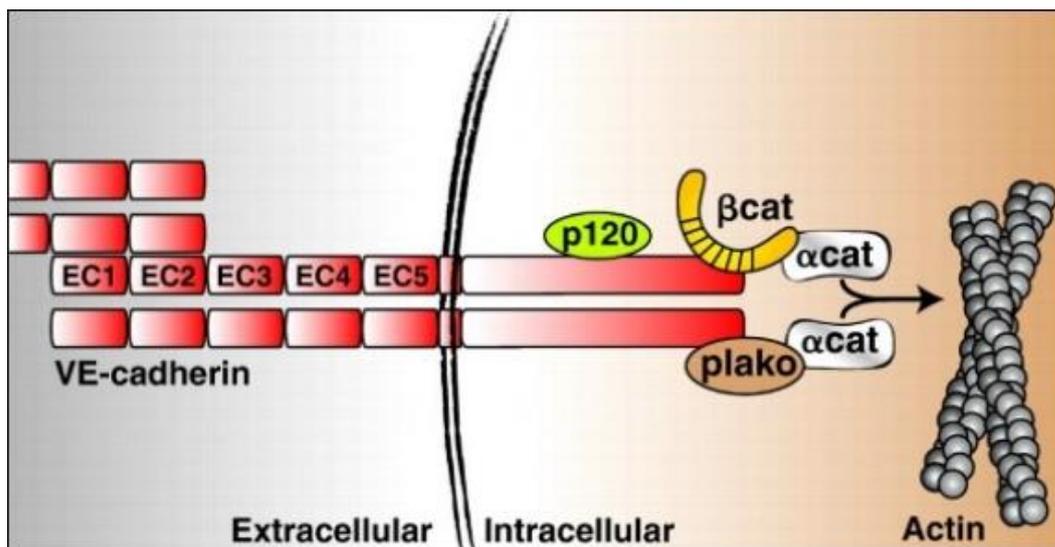


Abbildung 1-2: VE-Cadherin Komplex (mit freundlicher Genehmigung von Journal of Cell Science; Dejana et al., 2008).

VE-Cadherin ist essenziell für die embryonale Angiogenese, die vaskuläre Aufrechterhaltung und die Wiederherstellung der vaskulären Integrität nach Endothelverletzung. Zudem reguliert es zelluläre Prozesse, wie zum Beispiel Leukozytentransport, kontrolliert die vaskuläre Permeabilität und spielt eine zentrale Rolle in der Bildung einer kontrollierten Barriere zwischen Blut und darunterliegendem Gewebe. VE-Cadherin kann lysosomal degradiert werden, oder wird durch den *Ras-related in brain* (Rab)11a-vermittelten

Transport zurück an die endotheliale Oberfläche recycelt. Außerdem interagiert VE-Cadherin direkt mit der *vascular endothelial protein tyrosine phosphatase* (VE-PTP). Vor allem dieser Prozess ist für die Aufrechterhaltung der Endothelbarriere von großer Bedeutung. Dieser Aspekt wird unter Punkt 1.2.3.5 näher erläutert. VE-Cadherin kontrolliert nicht nur die Adhäsion zwischen benachbarten Zellen, sondern auch unterschiedliche zelluläre Signalwege.

1.2.3.2 Neuronales (N-) Cadherin

Neuronales (N-) Cadherin ist ein Transmembranprotein, welches nicht endothel-spezifisch ist. Es wird ebenso in Neuronen, Fibroblasten, Oozyten, Spermatozyten, Sertoli-Zellen, Lens-Zellen, Osteoblasten, Endothelzellen, Perizyten und glatten Muskelzellen (Navarro et al., 1998; Salomon et al., 1992) exprimiert. Anders als VE-Cadherin ist N-Cadherin diffus verteilt und nicht an den Adhäsionskontakten der Endothelzelloberfläche lokalisiert (Navarro et al., 1998). Als primäre Funktion wird die Verknüpfung des Endothels an die umgebenden nicht-Endothelzellen (Navarro et al., 1998) vermutet. Heterotypische N-Cadherin-Interaktionen stimulieren die Migration.

Verschiedene Zellen zeigen eine veränderte Expression von N-Cadherin, was bei Krebszellen die Invasion in das umliegende Interstitium ermöglicht. Neuronale Zellen wandern auf Oligodendrozyten durch das Exprimieren von N-Cadherin. Laut Luo und Radice (2005) kontrolliert N-Cadherin den Signalweg der Vaskulogenese im Signalweg stromaufwärts von VE-Cadherin, da der Verlust von N-Cadherin in Embryonen zur Letalität während der mittleren Schwangerschaftsperiode führt. Grund hierfür sind vaskuläre Defekte. Der Knock-down von N-Cadherin verursacht eine Reduktion der VE-Cadherin-Expression (Luo & Radice, 2005). Die Endothel-spezifische Deletion von N-Cadherin oder VE-Cadherin führt zur Erhöhung der vaskulären Permeabilität in Mäusen und zur Letalität von Embryonen an Tag 9,5 aufgrund von Defekten in der Vaskularisierung (Gefäßneubildung) (Carmeliet et al., 1999; Luo & Radice, 2005). N-Cadherin hat eine einzigartige Rolle in der Rekrutierung von Perizyten während der neonatalen und postnatalen Angiogenese (Gerhardt et al., 2000; Tillet et al., 2005). Studien zeigen, dass N-Cadherin zur Erhöhung der VE-Cadherin-Proteinexpression durch einen unbekanntem Mechanismus führt (Luo & Radice, 2005).

Es wird beschrieben, dass das GEF-Trio eine kritische Komponente des N-Cadherin Adhäsionskomplexes ist. Dieses aktiviert *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1) und RhoA-Signalwege (Kruse et al., 2019).

1.2.3.3 Catenine (Catena = Kette)

Catenine sind Verbindungsproteine, die an die zytoplasmatischen Domänen von Cadherinen binden und die Verknüpfung der Aktin-Filamente des Zellskeletts mit diesen vermittelt. Die wichtigsten Vertreter dieser Proteinfamilie sind α -Catenin, β -Catenin, γ -Catenin (auch Plakoglobin genannt) und δ -Catenin (p120-Catenin). Diese können auch als Transkriptionsfaktoren agieren. Die Degradation dieser Proteine wird durch sezernierte Glykoproteine der *wingless-int-1* (Wnt) Familie reguliert.

Synonyme für α -Catenin sind *Cadherin-associated Protein* oder *Catenin α -1*. Es ist ungefähr 102 kDa groß und besteht aus 906 Aminosäuren. Seine Bindung an β -Catenin und den Aktin-Filamenten findet dynamisch statt.

Im Wnt-Signalweg agiert β -Catenin als Signalmolekül. Es kann ebenfalls in den Zellkern transportiert werden und dort als Transkriptionsfaktor wirken. Ein hoch homologes Protein zu β -Catenin ist γ -Catenin, auch Plakoglobin genannt.

Ein Regulator des *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) Transkriptionsfaktors ist δ -Catenin. Es vermittelt die seitliche Gruppierung der Cadherine und reguliert deren Stabilität an der Zellmembran (M. A. Davis et al., 2003; Ireton et al., 2002; Thoreson et al., 2000; Xiao et al., 2003; Yap et al., 1998). Wahrscheinlich unterstützt es durch seine Fähigkeit Kinesin zu binden und sich entlang der Mikrotubuli zu bewegen, ebenfalls den Zelloberflächentransport von Cadherinen (Chen et al., 2003; Franz & Ridley, 2004; Yanagisawa et al., 2004). Zudem hat δ -Catenin einen Einfluss auf die Aktivität von kleinen Rho GTPasen. Diese agieren als molekulare Schalter, welche die Balance zwischen zellulärer Adhäsion und Migration aufrechterhalten (Anastasiadis et al., 2000; Magie et al., 2002; Noren et al., 2000). Außerdem wurde gezeigt, dass δ -Catenin RhoA direkt bindet (Magie et al., 2002) und so die Aufrechterhaltung des inaktiven GDP gebundenen Status vermittelt (Anastasiadis et al., 2000).

1.2.3.4 VE-Cadherin Multiprotein-Komplex

An die JMD Domäne von VE-Cadherin bindet δ -Catenin. Hingegen binden β - und γ -Catenin in einer dynamischen Weise an den C-Terminus von VE-Cadherin (Vandenbroucke et al., 2008) und an α -Catenin. Dieses verknüpft den Komplex an das Aktin-Zytoskelett (Mehta & Malik, 2006). Die N-terminale Domäne von β - und γ -Catenin kann α -Catenin zu einem ternären Komplex rekrutieren und so die Adhäsionskontakte an das Aktin-Zytoskelett verknüpfen (Zhurinsky et al., 2000).

1.2.3.5 Vaskuläre endotheliale Protein-Tyrosin-Phosphatase (VE-PTP)

VE-PTP interagiert direkt mit VE-Cadherin und wird daher hier als Teil der Adhäsionskontakte beschrieben. VE-PTP wurde zuerst von Fachinger et al. (1999) charakterisiert und ist ein endothel-spezifisches Membranprotein, welches zu der Unterklasse III der *receptor-like protein tyrosine phosphatases* (RPTPs) gehört. Es trägt Fibronektin Typ III (FNIII) ähnliche Wiederholungen in der extrazellulären Domäne und besitzt nur eine einzelne katalytische Domäne in der zytoplasmatischen Region (Abbildung 1-3).

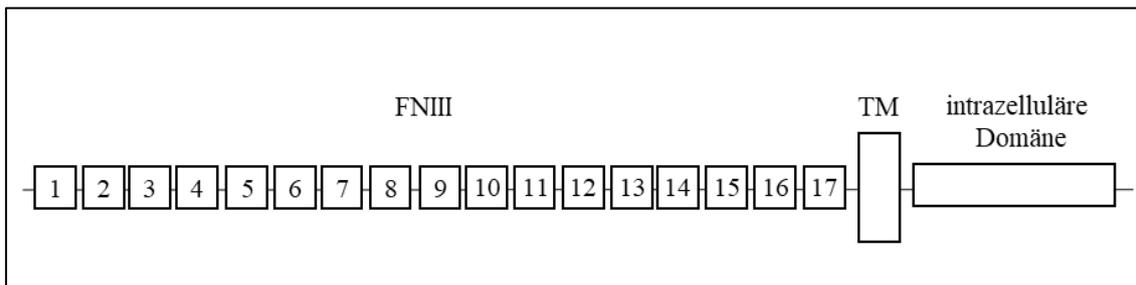


Abbildung 1-3: Aufbau von VE-PTP. Links/extrazellulär befinden sich FNIII ähnliche Wiederholungen, gefolgt von der transmembranären Domäne (TM), sowie rechts die intrazelluläre katalytische Domäne.

Ungleich zu anderen Tyrosin Phosphatasen wird VE-PTP hoch selektiv in Endothelzellen exprimiert. Es wurde zuerst als *human protein tyrosine phosphatase beta* (HPTP- β) bei einer RPTP homologen Überprüfung humaner Plazenta beschrieben und kloniert (Krueger et al., 1990). Fachinger et al. (1999) überprüften das Vorhandensein von VE-PTP über Ribonukleinsäure (RNA)-Analysen in Mausendothelzellen, wobei das Homolog in der Maus identifiziert wurde. Aufgrund seines Endothel-spezifischen Expressionsmusters in in-situ Hybridisierungen von Schnitten aus Mausembryonen wurde das identifizierte Protein in VE-PTP umbenannt. VE-PTP wird in Endothelzellen der Blutgefäße, jedoch nicht in lymphatischen Endothelzellen, exprimiert (He et al., 2018; Souma et al., 2018; Vanlandewijck et al., 2018). Eine Ausnahme bilden die dermalen lymphatischen Endothelzellen (Deng et al., 2015). Weitere Expressionsorte sind mamilläre Stammzellen (Soady et al., 2017), Osteosarkomzellen (Luo et al., 2019), braune Adipozyten (Choi et al., 2013; Kim et al., 2019) und das kolorektale Karzinom (Weng et al., 2019). In Nieren von Mäusen wurde VE-PTP Promotoraktivität entdeckt, jedoch konnte keine Proteinexpression gefunden werden (Takahashi et al., 2017).

VE-PTP ist ein wichtiger Regulator der vaskulären Permeabilität und endothelialen Junctionen Integrität (Frye et al., 2015; Nottebaum et al., 2008; Shen et al., 2014). Die katalytisch aktive Form von VE-PTP induziert Dephosphorylierung von VE-Cadherin, jedoch

stabilisiert es VE-Cadherin Phosphatase-unabhängig. Außerdem bindet VE-PTP an VE-Cadherin. Hierbei ist wichtig zu erwähnen, dass die Interaktion zwischen VE-PTP und VE-Cadherin im Bereich der extrazellulären Domäne von VE-PTP stattfindet. Hierbei binden die EC5 von VE-Cadherin und die membranproximale, extrazelluläre 17. Fibronectin-III Domäne von VE-PTP aneinander. Diese Interaktion wurde als ein maßgeblicher Faktor für die Interaktion und Stabilität der VE-Cadherin-vermittelten Adhäsion und Stabilität der Endothelbarriere beschrieben (Juettner et al., 2019; Nawroth et al., 2002).

Zusätzlich bindet VE-PTP an die endotheliale Rezeptor-Tyrosinkinase Tie-2 (Dejana & Vestweber, 2013; Juettner et al., 2019; Saharinen et al., 2017). Zudem wird der *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR2) als Zielprotein im Signalweg stromabwärts von VE-PTP beschrieben (Hayashi et al., 2013; Mellberg et al., 2009). GEF-*FYVE, RhoGEF and PH Domain Containing* (FGD) 5 wird als direktes Substrat von VE-PTP charakterisiert. Dies ist essenziell für die regulatorische Rolle der endotheliale Verbindungsintegrität von VE-PTP (Braun et al., 2020; Braun et al., 2019). Die Aktivierung von Tie-2 und die vaskuläre Stabilität wird von AKB9778 begünstigt. Dies ist ein pharmakologischer spezifischer niedermolekularer Inhibitor („*small molecule*“) von VE-PTP (Gurnik et al., 2016; Shen et al., 2014). Die Bindung von VE-PTP an Tie-2 spielt eine wichtige Rolle in der vaskulären Stabilität, weshalb der Tie-2 Ligand Angiopoetin-1 (Ang-1) nachfolgend genauer beschrieben wird.

1.2.3.6 Angiopoetin-1 (Ang-1)

Angiopoetin-1 (Ang-1) ist ein 70 kDa großes Glykoprotein und wird durch das Gen ANGPT1, welches auf dem Chromosom 8 liegt, kodiert. Es besteht aus einer *superclustering domain* (SCD), einer *coiled-coil* Domäne und einer Fibrinogen-ähnlichen (FR_{ED}) und Tie-2-Bindedomäne (Abbildung 1-4). Es bildet meist Di-, Tri- oder Tetramere, sowie Höhere oder Multimere via seiner SCD Domäne aus (Kim et al., 2005).

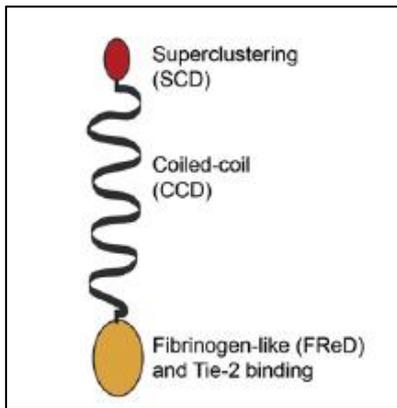


Abbildung 1-4: Aufbau von Angiopoetin (mit freundlicher Genehmigung von Elsevier; verändert nach Fagiani & Christofori, 2013).

Der Status der Ligandoligomerisation beeinflusst die Ligandbindung und Ligand-spezifische Antwort von Tie-2, wobei Tetra- oder höhere Multimere Formen den Tie-2 Rezeptor aktivieren (Kim et al., 2005; Pietilä et al., 2012). Ang-1 wird überwiegend in perivaskulären Zellen exprimiert, wie zum Beispiel Perizyten, Tumorzellen, Fibroblasten, Gefäßzellen und glatte Muskelzellen. Es bindet spezifisch an Tie-2 und ist dessen primärer physiologischer Ligand und Agonist. Ang-1 wird für das Endothelzell-Überleben, die Proliferation und die Gefäßreifung benötigt. Die Bindung von Ang-1 an Tie-2 wird durch die FReD Domäne vermittelt (S. Davis et al., 2003; Procopio et al., 1999). Dieser Vorgang katalysiert die Autophosphorylierung am fünften Tyrosin Rest (Barton et al., 2005) innerhalb der intrazellulären Kinase Domäne (Abbildung 1-5).

1.2.3.7 Kleine GTPasen

Kleine GTPasen sind an der Kontrolle von mikrovaskulärer, parazellulärer Permeabilität mit beteiligt und gehören zu den wichtigen Regulatoren der endothelialen Barriere Funktion *in vivo*. Sie sind 21-25 kDa groß und in der Regulation von Zelladhäsion und Zytoskelett Dynamiken involviert. Es existieren fünf Familien: Rho, Ras, Rab, *ras-related nuclear protein* (Ran) und *auxin-response factor* (Arf¹⁸).

Kleine GTPasen können zwischen aktiver und inaktiver Form wechseln, dies wird durch drei Proteinklassen kontrolliert. *GTPase-activating protein* (GAPs) inaktivieren, *GDP-dissociation inhibitor* (GDIs) binden GTPasen im Zytosol und stabilisieren die GDP gebundene Form. GEFs aktivieren und stabilisieren die GTP gebundene Form. Kleine GTPasen binden in ihrer aktiven Form Effektoren und erlauben damit die Weiterleitung oder Initiierung vor- und nachgeschalteter Signalkaskaden.

1.3 Mechanismen der endothelialen Barriereregulation

1.3.1 Endothel im Ruhezustand

Im Ruhezustand, das heißt unter physiologischen Bedingungen, bildet das Endothel eine selektive Schicht, welche den Austausch von Flüssigkeit und gelösten Stoffen mit dem umgebenen Gewebe kontrolliert.

Unter normalen Bedingungen sind Endothelzellen hoch aktiv, reagieren auf Veränderungen und haben eine konstante Signalübermittlung in die lokale extrazelluläre Umgebung. Die Aktivierung von Endothelzellen findet als normale adaptive Antwort statt. Die Adhäsionskontakt Integrität wird durch den Phosphorylierungsstatus des VE-Cadherins kontrolliert. Dafür sind spezifische Phosphatasen zuständig, wie zum Beispiel VE-PTP. Die Adapterproteine, die sowohl die Adhäsionskontakte als auch die Occludenskontakte mit dem kortikalen Aktin-Zytoskelett verknüpfen, regulieren die Barriere Eigenschaften via GEFs und GAPs, um die Aktivität von kleinen GTPasen, wie Rac1 und RhoA, einzustellen. Die beiden GTPasen wirken mit an der intakten Barriere. In Teilen stabilisiert Rac1 die Junctionen durch die Organisation von Aktin-Bindeproteinen. Außerdem ist es ein Ziel von extrazellulären Signalmolekülen, wie Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Ang-1, die Barriere Funktion zu erhöhen. Meist ist die Veränderung der Permeabilität im Endothel reversibel und die Lücken schließen relativ schnell, sofern keine chronische Inflammation auftritt.

1.3.2 Endothel bei einer inflammatorischen Antwort

In der Situation der inflammatorischen Antwort, wie zum Beispiel Anaphylaxie oder Sepsis, brechen die interzellulären Kontakte in den postkapillaren Venolen zusammen und führen zur Bildung von interzellulären Lücken. Es kommt zu einer Ödembildung und kann sowohl einen Schock als auch multiples Organversagen hervorrufen. Inflammatorische Mediatoren, wie zum Beispiel Lipopolysaccharid (LPS) und Tumornekrosefaktor- α (TNF α), inhibieren den zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP)/Rac1-Signalweg, woraus eine starke Aktivierung von RhoA und die Phosphorylierung der Adhäsionskontakte resultiert. Diese führt zur Endozytose und Spaltung von VE-Cadherin. Die Occludenskontakte zerfallen, folglich bricht die Endothelbarriere zusammen.

Der Transport von Stoffen durch das Endothel geschieht über zwei verschiedene Wege: Den transzellulären und den parazellulären Weg. Der transzelluläre Transport führt durch die Endothelzellen hindurch, auch Transzytose genannt. Der parazelluläre Transport –

zwischen benachbarten Endothelzellen hindurch – wird durch ein dynamisches Öffnen und Schließen der interzellulären Junctionen ermöglicht. Eine Inflammation führt zur Öffnung des parazellulären Weges. Durch das Aufrechterhalten der interzellulären Kontakte zwischen benachbarten Zellen und der Oberflächen Glykokalyschicht, kann der Inflammation entgegengewirkt werden. Spezifische Ansätze dies therapeutisch zu adressieren, existieren bis heute nicht. Dies liegt vor allem daran, dass viele Aspekte in diesem Prozess unbekannt sind.

1.3.2.1 Angiogenese

Der *angiopoetin-tyrosine kinase with immunoglobulin-like and epidermal growth factor (EGF)-like domains* (Tie)-Signalweg spielt eine wichtige Rolle im vaskulären System, wie zum Beispiel bei der Angiogenese, der vaskulären Entwicklung und Umgestaltung, der Permeabilität, der Homöostase und der Endothel Stabilität (Augustin et al., 2009; Eklund & Saharinen, 2013; Fukuhara & Mochizuki, 2010; Takakura et al., 1998). Das Ang-Tie-System besteht aus den Liganden Ang-1, Ang-2, Ang-3 und Ang-4, sowie aus den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen Tie-1 und Tie-2 (Abbildung 1-5) (Gale & Yancopoulos, 1999). Die Hauptliganden von Tie-2 sind Ang-1 und Ang-2. Ang-3 und Ang-4 hingegen sind Maus und Mensch Orthologe, deren biologische Funktion nicht bekannt ist, da sie bisher kaum erforscht wurden (Fagiani & Christofori, 2013; Lee et al., 2004). Die Tie-Rezeptoren werden spezifisch in hämatopoetischen Stammzellen, endothelialen Vorläuferzellen (Angioblasten) und Endothelzellen exprimiert (Dumont et al., 1992; Iwama et al., 1993; Korhonen et al., 1994; Partanen et al., 1992; Sato et al., 1993; Schnürch & Risau, 1993) und liegen hauptsächlich in der Plasmamembran vor.

Der funktionelle Ligand von Tie-1 ist *Leukocyte cell-derived chemotaxin 2* (LECT2) (Xu et al., 2019). Zudem wurde gezeigt, dass Heparansulfat Glykosaminoglykane Tie-1 binden und den Ang-Tie-Signalweg regulieren können (Griffin et al., 2021). Jedoch ist der genaue Mechanismus der Tie-1-Interaktion und deren Auswirkung auf Tie-2 nicht bekannt. Tie-1 kann sowohl als Inhibitor als auch als Verstärker der Tie-2-Aktivierung dienen. Die extrazellulären Domänen der beiden Tie-Rezeptoren können konstitutiv und als Antwort auf bestimmte Wachstumsfaktoren und Zytokine von der Zelloberfläche abgespalten werden (Findley et al., 2007; Marron et al., 2007; Reusch et al., 2001). Lösliches Tie-2 wurde in einigen mikrovaskulären Erkrankungen detektiert, unter anderem bei der Inflammation (Parikh, 2017). Es supprimiert den Tie-2-Signalweg in einer Konzentrations-abhängigen Weise *in vitro* (Alawo et al., 2017). In einem Computermodell zeigt

Zhang et al. (2019) eine konzentrations-abhängige Inhibierung der Tie-2-Aktivierung durch lösliches Tie-2 und den inhibierenden Effekt durch die erhöhte Spaltungsrate der extrazellulären Domäne von Tie-2 (Zhang et al., 2019). Tie-1 und Tie-2 co-lokalisieren an den Zell-Zell-Kontakten als Heterodimer (Chen-Konak et al., 2003; Korhonen et al., 2016; Leppänen et al., 2017; Marron et al., 2000; Mirando et al., 2019). Ang-2 wird primär als Antagonist von Tie-2 beschrieben, der die Ang-1 Bindung an Tie-2 konkurrierend inhibiert (Daly et al., 2013; Maisonpierre et al., 1997; Thurston & Daly, 2012). Jedoch kann Ang-2 kontextabhängig auch als Agonist fungieren (Kim et al., 2000; Souma et al., 2018; Thurston & Daly, 2012; Yuan et al., 2009). Ang-1 bindet an die extrazelluläre Tie-2 Domäne, wodurch es zu einer Rezeptor Dimerisierung kommt und die Kinase Domäne aktiviert wird. Dies führt zur Tyrosin-Autophosphorylierung. Effektor-Proteine können so an Tie-2 binden und assoziieren diesen mit zytoplasmatischen Signalwegen (Hubbard & Till, 2000; Thurston & Daly, 2012). VE-PTP reguliert durch Katalyse der Tie-2-Dephosphorylierung die Tie-2-Aktivierung (Fachinger et al., 1999; Winderlich et al., 2009). Die Hypothese von Zhang et al. (2019) besagt, dass die Internalisierungsrate von Tie-2 die Antwort auf die VE-PTP-Regulierung beeinflusst und die Regulierung der Tie-2-Aktivierung durch Ang-2 erschwert (Zhang et al., 2019). Tie-1 kann extrazellulär abgespalten werden, dies geschieht durch Aktivierung der Proteinkinase C und Metalloproteasen (McCarthy et al., 1999; Yabkowitz et al., 1997).

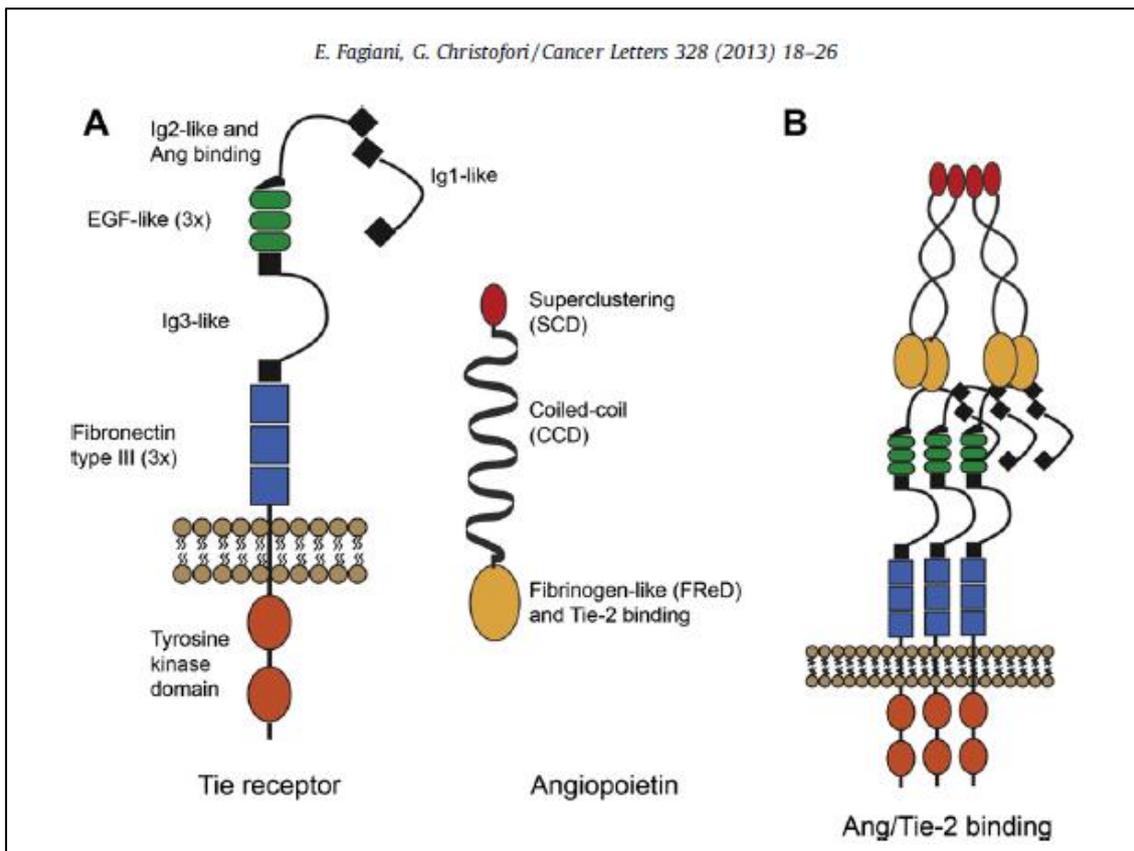


Abbildung 1-5: Aufbau Tie-2-Rezeptor und Angiopoetin, sowie Darstellung der Ang/Tie-2 Bindung (mit freundlicher Genehmigung von Elsevier; Fagiani & Christofori, 2013).

Ang-1 und Ang-2 induzieren Tie-2 subzelluläre Lokalisierung zu endothelialen Zell-Kontakt Proteinen in konfluenten Endothelzellen (Fukuhara et al., 2008; Saharinen et al., 2008). Der stromabwärts gerichtete Akt-Signalweg wird durch junktionales Tie-2 aktiviert, was die Stabilität und das Überleben des Endothels unterstützt (DeBusk et al., 2004; Fukuhara et al., 2008; Saharinen et al., 2008). Tie-2 kann aktiviert ebenso antagonistisch wirken (Cascone et al., 2003; Gavard et al., 2008).

Das Modell von Zhang et al. (2021) zeigt, dass Tie-1 an der Zelloberfläche, durch das Ausbilden von Heterodimeren mit Tie-2, diesen inhibiert. Gleichzeitig unterstützt und hält die Heterodimer-Ausbildung die Tie-2-Aktivierung aufrecht, da er Tie-2 vor der Internalisierung, Degradation und Dephosphorylierung durch VE-PTP schützt. Die Inhibierung der Tie-2-Spaltung unterstützt die Tie-1 junktionale Lokalisation (Zhang et al., 2021). Die VE-PTP-Inhibierung ist ein potenzielles Ziel, um die unterbrochene Tie-2-Aktivierung zu retten.

1.3.2.2 Rho-ROCK-MLC-Signalweg

Ein weiterer Signalweg, der im Endothel eine wichtige Rolle spielt, ist der RhoA-ROCK-Signalweg. Dieser ist an der Kontraktionsregulation glatter Muskelzellen, der Organisation des Aktin-Zytoskeletts, der Zelladhäsion, der Zellmigration, der Zytokinese, der Zellproliferation und der Immunzellenmigration beteiligt.

Das Enzym ROCK, welches durch das Gen ROCK1 kodiert wird, phosphoryliert nach der Ausbildung einer Bindung mit RhoA weitere Enzyme und aktiviert diese dadurch. ROCK gehört zu den Serin-/Threonin-Kinasen. Es wird in zwei Isoformen exprimiert: ROCK1 und ROCK 2, welche zahlreiche Substrate besitzen. Die GTPase RhoA kann von verschiedenen membrangebundenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) wie G12/13 über RhoGEF aktiviert werden.

Die Effekte von ROCK auf das Zytoskelett kann durch zwei parallele Signalwege vermittelt werden: Den MLC-Signalweg und über Cofilin (Amano et al., 2000; Rath & Olson, 2012).

ROCK kann die *MLC-phosphatase target subunit 1* (MYPT1) an Thr-696 und Thr-853 phosphorylieren. Dies inaktiviert die Phosphataseaktivität Richtung MLC, was in einer erhöhten Phosphorylierung von MLC an Ser-19 und Ser-20 mündet. Dies erhöht die Akto-Myosin-Kontraktilität. ROCK kann ebenso direkt MLC phosphorylieren. Der Stellenwert der direkten versus indirekten Phosphorylierung ist bisher nicht ausreichend untersucht (Totsukawa et al., 2000). ROCK phosphoryliert MYPT und reguliert somit die Myosin-Kontraktilität.

Auf der anderen Seite kann ROCK die *LIN-11, Isl-1 and MEC-3* (LIM)-Kinasen LIMK1 und LIMK2 phosphorylieren. Dies führt zu deren Aktivierung und Phosphorylierung von Cofilin, wodurch die Aktinabbau Funktion inaktiviert wird (Maekawa et al., 1999).

Ein Inhibitor des Rho-ROCK-Signalweges ist Y27637. Es ist ein kleines Molekül mit einem Molekulargewicht von 320,26 g/mol, welches selektiv die Kontraktion der glatten Muskulatur als Adenosintriphosphat (ATP)-kompetitiver ROCK-Inhibitor supprimiert (Uehata et al., 1997). Zudem reprimiert es die Ca²⁺-Sensibilisierung und die Rho-induzierte, p160ROCK-vermittelte Bildung von Stressfasern (Uehata et al., 1997). Neben ROCK werden 15 andere Kinasen von Y27632 inhibiert, unter anderem einige aus der Proteinkinase C (PKC) Familie (Anastassiadis et al., 2011; Vigil et al., 2012) (Abbildung 1-6).

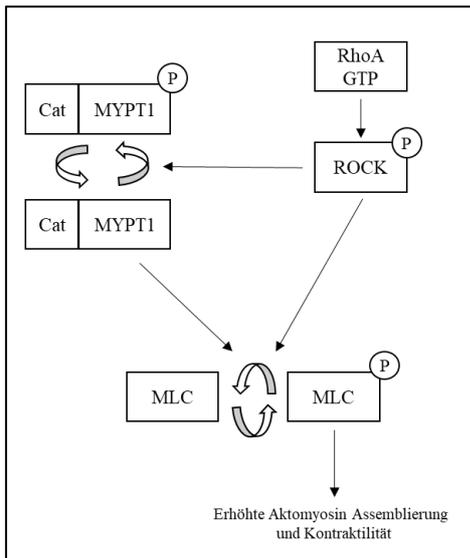


Abbildung 1-6: Rho-ROCK-Signalweg

1.3.2.3 Signalwege in der Pathogenese der mikrovaskulären Schrankenstörung

Sowohl der Tie-2-Signalweg als auch der RhoA-ROCK-Signalweg spielen eine entscheidende Rolle bei der Endothelbarriere Funktion. Wenn die Kinase Domäne von Tie-2 durch die Bindung von Ang-1 aktiviert wird, wird stromabwärts der Akt-Signalweg aktiviert, welches die Endothel Stabilität unterstützt. VE-PTP unterbricht dieses und hat somit einen negativen Effekt auf die Endothelbarriere. Da gezeigt wurde, dass VE-PTP und VE-Cadherin interagieren, könnte der Tie-2-Signalweg eine wichtige Rolle bei der mikrovaskulären Schrankenstörung spielen. Der RhoA-ROCK-Signalweg wird über TNF- α , einem inflammatorischen Auslöser, aktiviert. Es erhöht die RhoA-Aktivität (Xu et al., 2006) und ruft über den Phosphorylierungsstatus von MLC die gesteigerte Kontraktilität und Stressfaserausbildung hervor. Dies führt zur Destabilisierung der Integrität der Endothelbarriere. Beide Signalwege können eine wichtige Rolle in der Pathogenese der mikrovaskulären Schrankenstörung spielen.

1.4 Pathophysiologie des Zusammenbruchs der Endothelbarriere und Bildung von VE-Cadherin Spaltprodukten

Eine Auffälligkeit in der Pathogenese der systemischen Entzündung und Sepsis ist das Ablösen von Membranproteinen. Durch inflammatorische Auslöser, wie zum Beispiel LPS oder TNF- α , werden lösliche Fragmente der transmembranären Proteine freigesetzt.

Beispielhafte Proteine hierfür sind Wachstumsfaktoren, Chemokine, Zytokine und Adhäsionsmoleküle. Die Spaltung geschieht hauptsächlich durch spezifische Disintegrine und Metalloproteinasen (ADAM).

Die Proteinase ADAM-10 schneidet VE-Cadherin (Ponnuchamy & Khalil, 2008; Schulz et al., 2008), wodurch die extrazelluläre Domäne (EC1-5) von VE-Cadherin freigesetzt wird. Diese lösliche, sich nach der Spaltung im Zytosol der Zelle befindliche extrazelluläre Domäne, wird sVE-Cadherin^{EC1-5} genannt (Flemming et al., 2015). Das sVE-Cadherin^{EC1-5} trägt zum endothelialen Barrierezusammenbruch (Flemming et al., 2015) bei. Hohe sVE-Cadherin^{EC1-5}-Level wurden bei Patienten mit akutem Nierenversagen (Yu et al., 2019, 2021), Subarachnoidalblutung (Takase et al., 2020), chronischer spontaner Urtikaria (T. Chen et al., 2017), Pupura Schönlein-Henoch, systemischer Vaskulitis (Chen et al., 2014) und multiplem Myelom (Wrobel et al., 2006) beschrieben. Zudem sind erhöhte sVE-Cadherin^{EC1-5}-Level bei metastasierendem Brustkrebs mit kürzerem progressionsfreiem Überleben sowie Gesamtüberleben assoziiert (Rochefort et al., 2017). Zunächst wurde die Erhöhung von sVE-Cadherin^{EC1-5} in Patienten mit Entzündungsreaktionen und Sepsis als ein Marker für eine gestörten endotheliale Barriere Funktion gesehen. Der definitive Beweis im Rahmen einer validierenden systematischen Beobachtungsstudie fehlt jedoch.

Unabhängig davon, ist eine interessante Beobachtung hierbei, dass die Konzentration des sVE-Cadherin^{EC1-5} Spiegels im Blut von Patienten mit Sepsis mit deren Prognose korreliert (Yu et al., 2019, 2021; Zhang et al., 2010). In weiteren detaillierten Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe zeigte sich, dass die Hemmung der sVE-Cadherin^{EC1-5} Bildung, zum Beispiel durch die ADAM-10 Hemmung, dazu führt, dass sich die Endothelbarriere stabilisiert. Gleichzeitig wurde beobachtet, dass allein das Vorhandensein von sVE-Cadherin^{EC1-5} Spaltprodukten auch in Abwesenheit proinflammatorischer Auslöser mit einer gestörten endothelialen Barrierefunktion korreliert (Flemming et al., 2015). Damit liegt nahe, dass sVE-Cadherin^{EC1-5} selbst die Barrierefunktion kompromittiert. Ein direkter Beweis für diese Hypothese wurde nicht erbracht. Allerdings könnte dieser Nachweis einen neuen wichtigen Faktor in der Pathophysiologie des Zusammenbruchs der Endothelbarriere bei Sepsis und anderen Entzündungsprozessen spielen.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war daher, dass VE-Cadherin Spaltprodukte, bestehend aus den extrazellulären Domänen EC1-5 (sVE-Cadherin^{EC1-5}), unabhängig von proinflammatorischen Auslösern den Zusammenbruch der Endothelbarriere induzieren. Für eine kausale Untersuchung wurde bereits in Vorarbeiten das humane sVE-Cadherin^{EC1-5} kloniert. Nachfolgend sollte die stabile Expression über CHO-Zellen erreicht werden. Der Plan war hierbei die rekombinante Herstellung des sVE-Cadherins^{EC1-5}, die möglichen Effekte von sVE-Cadherin^{EC1-5} auf Endothelzellen in verschiedenen Konzentrationen zu untersuchen, sowie die Mechanismen dahinter *in vitro* und *in vivo* zu charakterisieren. Der Schwerpunkt lag im Rahmen dieser Arbeit auf den Untersuchungen *in vitro*. Zusätzlich zu diesen Untersuchungen war das Ziel, zwei gekürzte Fragmente von sVE-Cadherin^{EC1-5} – mit und ohne extrazellulärer Domäne 5 – zu klonieren. Diese Fragmente sollen zukünftige Untersuchungen, in denen die Rolle der unterschiedlichen extrazellulären Domänen von VE-Cadherin Spaltprodukten charakterisiert werden, ermöglichen. Das Ziel der Arbeit stellt somit die Identifizierung möglicher Auswirkungen und Signalwege von sVE-Cadherin^{EC1-5} in Endothelzellen dar, um damit einen neuen pathophysiologischen Aspekt herauszuarbeiten, der für den Zusammenbruch der Endothelbarriere bei Sepsis und Entzündungen relevant sein könnte.

3 Material

Tabelle 1: Reagenzien

| Name | Firma | Bestellnummer |
|---|--|----------------|
| AKB9778/Razuprotafib | Hycultec GmbH, Beutelsbach | hy109041-5mg |
| Ampicillin | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe | HP62.1 |
| Angiopoetin-1 | Sigma-Aldrich, Darmstadt | A5226-25 µg |
| BSA | Sigma-Aldrich, Darmstadt | A4503 |
| BP Clonase | Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Dreieich | 11789-013 |
| 0,5M β-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, Darmstadt | M6250/ 60-24-2 |
| CheLuminate-HRP PicoDetect BC | PanReac Applichem, Darmstadt | A3417,1200A+B |
| DMSO | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe | A994.1 |
| GenRuler 1 kb Plus DNA Ladder | ThermoFisher Scientific, Dreieich | #SM1333 |
| 10 mM dNTP Mix | ThermoFisher Scientific, Dreieich | R0191 |
| DTT BioChemica | PanReac Applichem, Darmstadt | A1101,0005 |
| Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (DPBS) | Gibco, ThermoFisher Scientific, Dreieich | 14190-094 |
| FBS, Qualified | Gibco, ThermoFisher Scientific, Dreieich | 10270-106 |
| FITC-Dextran-Lösung (70 kDa) | Sigma-Aldrich, Darmstadt | 46945 |
| Isopropanol / 2-propanol | Sigma-Aldrich, Darmstadt | 33539-1L-M |
| Halt Protease Inhibitor Cocktail 100x | ThermoFisher Scientific, Dreieich | 78438 |
| LB-Agar (Luria/Miller) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe | Art-Nr. X969.1 |
| LB-Medium (Luria/Miller) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe | Art-Nr. X968.1 |
| L-Glutamin 200 mM (100x) | Gibco, ThermoFisher Scientific, Dreieich | 2530-024 |
| Lipopolysaccharid aus <i>E.coli</i> O111:B4 | Sigma-Aldrich, Darmstadt | L2630-100MG |
| LR Clonase | Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Dreieich | 11791-019 |
| NGS | Sigma-Aldrich, Darmstadt | G0023 |
| NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x) | Life Technologies, ThermoFisher Scientific, Dreieich | NP0001-02 |
| Nonfat dried milk powder / Magermilchpulver | PanReac Applichem, Darmstadt | A0830,1000 |
| PFA-Ampullen | ThermoFisher Scientific, Dreieich | 28908 |
| Phusion-Polymerase | ThermoFisher Scientific, Dreieich | F5305 |
| T4-Ligase | Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Dreieich | 15224017 |
| Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder | ThermoFisher Scientific, Dreieich | 26619 |
| Pen/Strep | Gibco, ThermoFisher Scientific, Dreieich | 15140-122 |
| Taq DNA-Polymerase, native, without BSA | ThermoFisher Scientific, Dreieich | EP0282 |
| NuPAGE® Transfer Buffer (20x) | Life Technologies, ThermoFisher Scientific, Dreieich | NP0006-1 |
| Tris ultrapure | PanReac Applichem, Darmstadt | A1086,1000 |
| Triton X 100 | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe | 3051.2 |
| 0,4% Trypanblau | Sigma-Aldrich, Darmstadt | 93595 |
| Trypsin EDTA Solution | Sigma-Aldrich, Darmstadt | T3924 |
| recombinantes VE-Cadherin | R&D Systems GmbH, Wiesbaden | 938-VC-050 |
| VectaShield HardSet™ mit DAPI | Vector Laboratories, Newark, USA | H1500 |

| | | |
|----------------------|--|----------|
| recombinantes VE-PTP | Fisher scientific, ThermoFisher Scientific, Dreieich | 16024130 |
| Y27632 | Sigma-Aldrich, Darmstadt | 688000 |

Tabelle 2: Kits

| Name | Firma | Bestellnummer |
|--|---|-------------------|
| GenElute™ PCR Clean-Up | Sigma-Aldrich, Darmstadt | NA1020-1KT |
| Human VE-Cadherin Quantikine ELISA Kit | R&D Systems GmbH, Wiesbaden | DCADV0 |
| Immuniprecipitation Starter Pack | Cytiva Europe GmbH, Freiburg im Breisgau | 17600235 |
| Lipofectamine® LTX and PLUS™ Reagent | Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Dreieich | 15338-100 |
| Nucleo Bond® Xtra Maxi Kit | Machery-Nagel, Düren | 740414.10/.50.100 |
| Pierce™ BCA Protein Assay Kit | Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Dreieich | 23227 |
| DetachKit | PromoCell GmbH, Heidelberg | C-41210 |

Tabelle 3: Geräte

| Name | Firma |
|--|---|
| Blot-Kammer | PEQLAB; Erlangen/ seit 2015 avantor; Darmstadt |
| ChemiDoc™ Imaging System | Bio-Rad Laboratories GmbH, Neuburg |
| ECIS ZØ | Applied Biophysics, Troy, USA |
| Heracell 240 Inkubator | ThermoFisher Scientific, Dreieich |
| Heraeus Biofuge fresco | ThermoFisher Scientific, Dreieich |
| Heraeus Multifuge 1 S-R | ThermoFisher Scientific, Dreieich |
| LabGard Class II biological safety cabinet | ibs tecnomara GmbH, Fernwald |
| Olympus TH4-200 Mikroskop | Olympus Deutschland GmbH |
| Leica TCS SP2 | Leica, Wetzlar |
| NanoDrop™ 2000c Spektralphotometer | ThermoFisher Scientific, Dreieich |
| peqSTAR Thermocycler | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Hamburg |
| TECAN GENios Pro | Tecan Group, Männedorf, Schweiz |
| Tecan sunrise | Tecan Group, Männedorf, Schweiz |
| Thermocycler Primus 96 advanced | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Hamburg |
| Thermomixer comport | Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf |
| VWR Incubating Orbital Shaker | VWR International GmbH |

Tabelle 4: Material

| Name | Firma | Bestellnummer |
|--|---|---------------|
| 4-12 % Bis-Tris Gel NuPAGE™ 1,5 mm x 10 Well | Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Dreieich | NPO335BOX |
| Falcon® Cell Culture Inserts | Corning, NY, USA | 353180 |
| Cellstar®, Greiner-Bio One 6 Well Cell Culture Plate | Greiner-Bio One International GmbH, Frickenhausen | 657 160 |
| Cellstar®, Greiner-Bio One 12 Well Cell Culture Plate | Greiner-Bio One International GmbH, Frickenhausen | 665 180 |
| Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Gel | Bio-Rad Laboratories GmbH, Neuburg | 4568023 |
| Nitrocellulose/ Filterpapier, 0,2µm, Novex™ | ThermoFisher Scientific, Dreieich | 12040146 |
| SuperFrost® Plus Objektträger | R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen | 03-0060 |
| TC-Schale 35, Standard | Sarstedt, Nürnberg | 83.3900 |

Tabelle 5: Zellkulturmedien

| Name | Firma | Zusätze | Bestellnummer |
|---|--|----------------------------|-----------------|
| DMEM/F-12 (1:1) 1x -L-Glu | Gibco, ThermoFisher Scientific, Dreieich | P/S FCS 200 mM L-Glu | 21331-020 |
| Endothelial Cell Growth Medium MV | PromoCell GmbH, Heidelberg | P/S Supplement | C-22020 |
| Endothelial Cell Basal Medium MV prf | PromoCell GmbH, Heidelberg | P/S | C-22225 |
| F-12 Nut Mix (Ham) 1x + L-Glu | Gibco, ThermoFisher Scientific, Dreieich | P/S FCS | 21765-029 |
| OPTI-MEM® I (1x) | Gibco, ThermoFisher Scientific, Dreieich | - | REF.: 31985-062 |

Tabelle 6: primäre Antikörper

| Name | Firma | Bestellnummer | Wirt | Verdünnung | Größe | Aufbewahrung |
|---------------|---|---------------|------|-------------------|---------|--------------|
| Beta-Aktin | Sigma-Aldrich, Darmstadt | A3854 | m | 1:1000 | 42 | -20°C |
| Catenin alpha | ThermoFisher Scientific, Dreieich | 71-1200 | rb | 1:500 | 102 | -20°C |
| Catenin delta | Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Dreieich | 33-9600 | rb | 1:500 | 110 | -20°C |
| Catenin beta | Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Dreieich | 71-2700 | rb | 1:1000 | 92 | -20°C |
| Catenin gamma | Cell Signaling Technology Europe, Frankfurt | 2309 | rb | 1:1000 | 83 | -20°C |
| GAPDH | MERCK Millipore, Darmstadt | MAB374 | m | 1:1000- 1:3000 | 38 | -20°C |
| Anti-GEF H1 | Abcam, Cambridge | ab155785 | rb | 1:500 | 111 | -20°C |
| N-Cadherin | R&D Systems GmbH, | AF6426 | sh | 1:500 | 100-130 | -20°C |

| | | | | | | |
|---------------------------|--|---------|----|--------|-----|-------|
| | Wiesbaden | | | | | |
| VE-Cadherin extrazellulär | R&D Systems GmbH, Wiesbaden | MAB9381 | m | 1:1000 | 130 | -20°C |
| VE-Cadherin | Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg | sc-9989 | m | 1:1000 | 130 | -20°C |
| ZO-1 | MERCK Millipore, Darmstadt | AB2272 | rb | 1:1000 | 260 | + 4°C |

Tabelle 7: sekundäre Antikörper

| Name | Firma | Bestellnummer | Wirt | Verdünnung | Aufbewahrung |
|----------------------------|---|---------------|------|-------------------|--------------|
| gam pox | Dianova, BIOZOL GmbH, Hamburg | 115-035-003 | m | 1:2000 bis 1:3000 | -20°C |
| garb pox | Dianova, BIOZOL GmbH, Hamburg | 111-035-003 | rb | 1:3000 | -20°C |
| gam cy3 | Dianova, BIOZOL GmbH, Hamburg | 115-165-003 | m | 1:600 | -20°C |
| garb cy3 | Dianova, BIOZOL GmbH, Hamburg | 111-165-003 | rb | 1:600 | -20°C |
| dam Alexa Fluor 488 | Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Dreieich | A-21201 | m | 1:200 | +4°C |
| darb Alexa Fluor 488 | Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Dreieich | A-21206 | rb | 1:200 | +4°C |
| donkey anti sheep | Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Dreieich | A16041 | sh | 1:1000 | -20°C |
| Alexa Fluor 488 Phalloidin | Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Dreieich | A12379 | / | 1:60 | -20°C |

Tabelle 8: Primer

| Name | Firma | Sequenz | GC-Gehalt | Länge |
|---------------------|-----------------------------------|---|-----------|-------|
| EC1-4_attB1_F1 | Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg | GGGGACAAGTTTG-TACAAAAAAGCAGGC TTCACCATGGAT-GCAGAGGCTGAT-GATGC | 49.1 % | 57 bp |
| EC1-4_attB2_AgeI_R1 | Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg | GGGGACCACTTTG-TACAAGAAAGCTGGG TCTGGCCAGTAG-AAGGGCTGCTGGAA-GAT | 54.4 % | 57 bp |
| EC3-5_attB1_KF1 | Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg | GGGGACAAGTTTG-TACAAAAAAGCAGGC TTCACCATGGAT-GGTGGGGACCTCAGT-CATCT | 50 % | 60 bp |
| EC3-5_attB2_AgeI_R3 | Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg | GGGGACCACTTTG-TACAAGAAAGCTGGG TCTGGCCATCGAACTG GCCGTA CTCA | 54.5 % | 55 bp |

| | | | | |
|---------------|-----------------------------------|---|------|-------|
| EC1-4_CI2_fw | Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg | TAAGCAG-GATCCTAAT-GCAGAGGCTCATG | 48 % | 29 bp |
| EC1-4_CI2_rev | Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg | TGCTTACTCGAGCTT-CAGCTGGAAGTGGT | 52 % | 29 bp |
| EC3-5_21_fw | Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg | TAAGCAGGATCCGT-CATGGGTGGGGACCT-CAGTCATC | 57 % | 37 bp |
| EC3-5_21_rev | Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg | TGCTTACTCGAGTGT-CAAACCTGCCCATAC | 48 % | 29 bp |

Tabelle 9: Enzyme

| Name | Firma | Bestellnummer |
|-------|-----------------------------------|---------------|
| Xho I | ThermoFisher Scientific, Dreieich | ER0691 |
| BamHI | ThermoFisher Scientific, Dreieich | ER0051 |

Tabelle 10: Lösungen

| Name | Zusammensetzung | Lagerung |
|------------------|--|----------------|
| BSA/NGS | 3 % BSA 1 % NGS | - 20 °C |
| RIPA-Puffer | 50 mM Tris-Cl pH 7,4 150 mM NaCl 1 % NP-40 0,5 % Natriumdeoxycholat 0,1 % SDS | +4°C |
| SDS-Lysepuffer | 25 mM Hepes pH 7,6 2 mM EDTA 25 mM NaF 1 % SDS Kurz vor Benutzung + Protease-Inhibitor | - 20 °C |
| Stripping-Puffer | 2 % SDS 0,5 M Tris HCl pH 6,8 | Raumtemperatur |

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist ein grundlegendes Werkzeug in der molekularen Biologie, um spezifische Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Sequenzen zu amplifizieren und zu vervielfältigen. Die doppelsträngige DNA wird im ersten Schritt bei 94°C denaturiert, wobei die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Strängen aufgetrennt werden und danach die DNA in Einzelsträngen vorliegt. Im zweiten Schritt, der Primer-Hybridisierung, binden die Primer, welche hierfür entworfen wurden, spezifisch an das 3'-Ende der gewünschten DNA-Sequenz. Die Bindungstemperatur ist abhängig von der Länge und dem GC-Gehalt der Primer. Im dritten Schritt wird bei 72°C der komplementäre Strang durch eine Polymerase in 5'-3'-Richtung synthetisiert. Die Dauer dieses Schrittes ist abhängig von der Größe des Amplifikats und der Polymeraseaktivität. Diese drei Schritte werden 30-mal wiederholt, damit die Vervielfältigung der gewünschten DNA-Sequenz stattfindet. Im letzten Schritt wird nochmals bei 72°C inkubiert, um die DNA-Amplifikation zu beenden.

4.1.1.1 Amplifikations-PCR

In dieser PCR wird die Phusion-Polymerase verwendet. Diese besitzt eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, wodurch eine Überprüfung der synthetisierten DNA stattfindet und eine hohe Genauigkeit des Endprodukts gewährleistet werden kann. Als Template wird das schon etablierte Plasmid pcDNA-DEST47-EC1-5 verwendet und mit 150 ng eingesetzt. Der PCR-Ansatz ist in Tabelle 11 dargestellt, sowie das verwendete Thermocycler Programm in Tabelle 12.

Tabelle 11: Reagenzien des Reaktionsansatzes für die Phusion-PCR

| Reagenzien | Volumen | Endkonzentration |
|-----------------------------|----------|------------------|
| Template pcDNA-DEST47-EC1-5 | 01,00 µl | 150 ng |
| 5 x HF-Puffer | 10,00 µl | 1 x |
| 2 mM dNTPs | 05,00 µl | 0,2 mM |
| 100 % DMSO | 01,50 µl | 3 % |
| 10 µM Vorwärtsprimer | 02,50 µl | 0,5 µM |
| 10 µM Rückwärtsprimer | 02,50 µl | 0,5 µM |

| | | |
|-------------------------------------|----------------|-----------------|
| 2 U/ μ l Phusion DNA-Polymerase | 00,50 μ l | 1 U/ 50 μ l |
| Nuklease freies H ₂ O | Auf 50 μ l | |

Tabelle 12: Phusion-PCR-Thermocycler Programm

| Schritt | Temperatur | Dauer | Zyklen |
|-----------------------|-----------------|----------------|--------|
| Anfangs-Denaturierung | 98°C | 30 Sekunden | 1 |
| Denaturierung | 98°C | 10 Sekunden | 30 |
| Primer-Hybridisierung | Primer abhängig | 30 Sekunden | |
| Elongation | 72°C | 30 Sekunden/kb | |
| End-Elongation | 72°C | 10 Minuten | 1 |
| Gehalten bei | 4°C | ∞ | 1 |

4.1.1.2 Verifizierungs-PCR

In dieser PCR wird die Taq-Polymerase zur Sequenzüberprüfung der Klone verwendet. Diese besitzt keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, wodurch die Fehlerrate höher ist als bei der Phusion-Polymerase. Der PCR-Ansatz ist in Tabelle 13 dargestellt, sowie das verwendete Thermocycler-Programm in Tabelle 14.

Tabelle 13: Reagenzien des Reaktionsansatzes für die Verifizierungs-PCR

| Reagenzien | Volumen | Endkonzentration |
|----------------------------------|----------------|------------------|
| Template (1 Kolonie) | 01,00 μ l | 150 ng |
| 10 x Taq Puffer | 02,50 μ l | 1 x |
| 2 mM dNTPs | 02,50 μ l | 0,2 mM |
| 25 mM MgCl ₂ | 02,00 μ l | 2 mM |
| 10 μ M Vorwärtsprimer | 01,25 μ l | 0,5 μ M |
| 10 μ M Rückwärtsprimer | 01,25 μ l | 0,5 μ M |
| 5 U/ μ l Taq Polymerase | 00,25 μ l | 1,25 U |
| Nuklease freies H ₂ O | Auf 25 μ l | |

Tabelle 14: Verifizierungs-PCR-Thermocycler Programm.

| Schritt | Temperatur | Dauer | Zyklen |
|-----------------------|------------|-------------|--------|
| Anfangs-Denaturierung | 95°C | 10 Minuten | 1 |
| Denaturierung | 95°C | 30 Sekunden | 30 |

| | | | |
|-----------------------|-----------------|-------------|---|
| Primer-Hybridisierung | Primer abhängig | 30 Sekunden | |
| Elongation | 72°C | 1 Minute/kb | |
| | | | |
| End-Elongation | 72°C | 10 Minuten | 1 |
| Gehalten bei | 4°C | ∞ | 1 |

4.1.2 Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung der PCR-Produkte wird mithilfe des SIGMA GenElute™ PCR Clean-Up Kits durchgeführt. Dieses ist geeignet für PCR-Produkte von 100 bp bis 10 kb. Durch die Aufreinigung werden die PCR-Produkte von der DNA-Polymerase, Primern, Nukleotiden, Ölen und Salzen gereinigt. Als Erstes wird das fünffache Volumen der DNA an Bindepuffer hinzugegeben, anschließend die DNA-Lösung auf eine Silica-Membran aufgetragen und eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die dadurch gebundene DNA wird einmal mit Waschpuffer gewaschen und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und nochmals für drei Minuten zentrifugiert. Die DNA wird zum Schluss mit der Eluierungslösung aus der Silica-Membran herausgelöst.

4.1.3 BP-Rekombinationsreaktion

Durch die BP-Rekombinationsreaktion wird die DNA-Sequenz von Interesse, beziehungsweise das bereits amplifizierte PCR-Produkt, welches *attB*-Seiten enthält, in einen Donor Vektor, welcher *attP*-Seiten enthält, rekombiniert. Das Produkt heißt Entry Clone (Abbildung 4-1).



Abbildung 4-1: Klonierungsstrategie Nr.1. direktionale Klonierung von PCR-Produkten mit der Gateway Technologie (mit freundlicher Genehmigung von ThermoFisher).

Der Reaktionsansatz wird, wie in Tabelle 15 dargestellt, pipettiert. Der BP Clonase II-Enzym-Mix wird auf Eis zwei Minuten aufgetaut und zweimal zwei Minuten gemixt. Anschließend wird 4 µl des BP Clonase-Enzym-Mixes zum Ansatz und zur Positivkontrolle hinzugegeben. Der Ansatz wird zweimal zwei Minuten gemixt und daraufhin über

Nacht bei 25°C inkubiert. Am nächsten Tag wird, um die Freisetzung von den Nukleinsäuren zu gewährleisten, 2 µl Proteinase K-Lösung zur Reaktion hinzugegeben und bei 37°C für 10 Minuten inkubiert. Dieser fertige Ansatz ist bei -20°C bis zu einer Woche haltbar.

Tabelle 15: Reagenzien der BP-Rekombinationsansätze.

| Reagenzien | Probe | | Positivkontrolle | Negativkontrolle |
|--------------------------------|-----------|--------|------------------|------------------|
| PCR-Produkt | 40 ng | 0,4 µl | - | - |
| pDONR Vektor | 150 ng | 1 µl | 1 µl | 1 µl |
| Pexp/-Tet positive Kontrolle | 50 ng | 1 µl | 2 µl | - |
| 5 x BP Clonase Reaktionspuffer | 4 µl | | 4 µl | 4 µl |
| TE Puffer, pH 8.0 | Auf 16 µl | | 9 µl | 15 µl |

4.1.4 LR-Rekombinationsreaktion

Der Entry Clone wird durch die LR-Rekombinationsreaktion in den End-, beziehungsweise Expressionsvektor kloniert. Dafür wird die *attL*-flankierte DNA-Sequenz in den *attR*-enthaltenden Expressionsvektor rekombiniert. Der Reaktionsansatz wird, wie in Tabelle 16 dargestellt, pipettiert. Der LR-Clonase II-Enzym-Mix wird auf Eis zwei Minuten aufgetaut und zweimal zwei Minuten gemixt. Daraufhin wird 4 µl des LR-Clonase-Enzym-Mixes zum Ansatz und zur Positivkontrolle hinzugegeben. Der Ansatz wird zweimal zwei Minuten gemixt und daraufhin über Nacht bei 25°C inkubiert. Am nächsten Tag wird, um die Freisetzung von den Nukleinsäuren zu gewährleisten, 2 µl Proteinase K-Lösung zur Reaktion hinzugegeben und bei 37°C für 10 Minuten inkubiert. Dieser fertige Ansatz ist bei -20°C bis zu einer Woche haltbar.

Tabelle 16: Reagenzien der LR-Rekombinationsansätze

| Reagenzien | Probe | | Positivkontrolle | Negativkontrolle |
|--------------------------------|------------|--------|------------------|------------------|
| pDONR-EC1-4 bzw. EC3-5 | 100-300 ng | 4 µl | - | - |
| pcDNA-DEST47 Vektor | 300 ng | 1,5 µl | 1,5 µl | 1,5 µl |
| pENTR-gus | - | | 2 µl | - |
| 5 x BP Clonase Reaktionspuffer | 4 µl | | 4 µl | 4 µl |
| TE-Puffer, pH 8.0 | Auf 16 µl | | 8,5 µl | 14,5 µl |

4.1.5 Transformation

Damit Bakterien das gewünschte Protein produzieren, muss das zuvor klonierte Plasmid in das Bakterium eingebracht werden. Dafür wird die Transformation durchgeführt. Nachdem die DH5 α -Zellen auf Eis aufgetaut worden, werden diese mit 2 μ l 0,5 M β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Darmstadt) und 10 μ l Plasmid versetzt und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wird für genau 30 Sekunden bei 42°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wird 250 μ l Lurani Bertani (LB)-Medium hinzugegeben und für mindestens eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Dieser Ansatz wird danach entweder auf LB-Platten mit Antibiotikum ausplattiert oder zum Animpfen von Übernachtskulturen verwendet.

4.1.6 Plasmidisolierung

Vorbereitend zur Transfektion werden mittels Nucleo Bond[®] Xtra Maxi Kit (Machery-Nagel, Düren) die Plasmide aus den Bakterien isoliert. Hierfür wird zuerst eine 3 ml Startkultur der DH5 α -Zellen, die das gewünschte Plasmid erhalten, in LB-Medium über Nacht bei 37°C und 300 rpm angesetzt. Am nächsten Tag wird diese in 250-300 ml LB-Medium verdünnt und über Nacht bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Die DH5 α -Zellen werden bei 4000 xg für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in 12 ml Resuspensionspuffer aufgenommen und 12 ml Zellysepuffer hinzugegeben, fünfmal invertiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wird die NucleoBond[®] Xtra Column inklusive Filter mit 25 ml Equilibrationspuffer versetzt. Nach der Bakterien Lyse wird 12 ml Neutralisierungspuffer hinzugegeben und invertiert bis der Farbumschlag stattfindet. Es wird bei 4000 xg für zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand auf die Säule gegeben. Die Säule entleert sich, wie auch in den nächsten Schritten durch Schwerkraft. Danach wird mit 15 ml Equilibrationspuffer gewaschen. Anschließend wird der Filter entfernt und 25 ml Waschpuffer hinzugegeben. Daraufhin wird 15 ml Elutionspuffer hinzugegeben und der Durchfluss in einem 25 ml Falcon aufgefangen. Danach wird 10,5 ml Isopropanol hinzugegeben, um das eluierte Plasmid zu präzipitieren. Anschließend wird gemischt und bei 4°C für 15 Minuten mit 4000 xg zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen. Das Pellet wird mit 14 ml 70 %igen Ethanol gewaschen. Hierfür wird mit 4000 xg für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird komplett abgenommen, das Pellet an der Luft getrocknet und danach in Nuklease-freiem Wasser aufgenommen. Daraufhin wird die Konzentration gemessen.

4.1.7 DNA-Konzentrationsmessung

Die DNA-Konzentration wird mit Hilfe des NanoDrop™ 2000c Spektralphotometer (ThermoFisher Scientific; Dreieich) gemessen. Hierfür wird 1 µl der isolierten Plasmidlösung verwendet. Die Konzentration sollte deutlich über 10 ng/µl liegen, da bei geringerer Konzentration nur von Kontaminationen ausgegangen werden kann. Um die Reinheit der Probe zu überprüfen, werden die Absorptionsverhältnisse 260/280 und 260/230 gemessen. Ersteres sollte bei 1,8 liegen und zeigt bei einer Abweichung < 1,8 eine Verunreinigung mit beispielsweise Proteinen und Phenolen an. Letzteres sollte zwischen 2,0 und 2,2 liegen und deutet bei einer Abweichung < 2,0 auf eine Kontamination mit Ethyldiamintetraacetat (EDTA), Phenol, Guanidinhydrochlorid oder Kohlenhydraten hin.

4.1.8 Sequenzierung

Zur Überprüfung, ob das gewünschte Insert im Vektor vorhanden und in der richtigen Orientierung ist, wird eine 200 ml Übernachtskultur der Klone angesetzt und anschließend eine Plasmidisolierung durchgeführt. Die Plasmide werden mit Hilfe von Eurofins Genomics sequenziert. Hierfür wird ein 17 µl Ansatz hergestellt, der 50-100 ng/µl Plasmid-DNA, sowie 10 µM des M13 Primers enthält. Es wird jeweils ein Ansatz für den Vorwärts- und Rückwärtsprimer pipettiert.

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Zellkultur immortalisierter adhärenter Zelllinien

In dieser Arbeit werden Zellen aus den Ovarien des chinesischen Zwerghamsters (CHO) und humane, embryonale Nierenzellen (HEK 293T) verwendet. Die Zellen werden in Zellkulturflaschen (Cellstar®, Greiner-Bio One International GmbH, Frickenhausen) mit spezifischem Medium unter sterilen Bedingungen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Wenn die Zellen eine Konfluenz von 95 % erreichen, werden sie passagiert. Hierfür wird das verbrauchte Medium abgenommen und die Zellen mit *dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS; Gibco®, ThermoFisher Scientific, Dreieich) gewaschen. Anschließend werden diese mit 3 ml 0,05% Trypsin fünf Minuten behandelt, damit eine Ablösung von der Oberfläche stattfindet. Zur Neutralisierung des Trypsins werden 7 ml Medium zu den Zellen hinzugegeben und die Zelllösung in ein 50 ml Falcon überführt und für vier Minuten bei 330 xg zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert.

4.2.2 Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung werden 10 µl der Zellsuspension zu 90 µl 0,4% Trypanblau (1 /10 verdünnt, Sigma-Aldrich, Darmstadt) hinzugegeben. Davon werden 10 µl in eine Neubauer-Kammer (improved) gegeben und die vier Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Mit folgender Formel wird daraufhin die Zellzahl bestimmt:

$$\text{Zellzahl} = \text{Mittelwert} \times 10^5$$

Wenn die Zellen in mehr als 1 ml Medium aufgenommen werden, wird der Mittelwert mit der Anzahl der Milliliter multipliziert.

4.2.3 Transfektion

Damit die CHO- beziehungsweise die HEK 293T-Zellen das Protein von Interesse produzieren, mussten diese mit dem Plasmid, welches die DNA-Sequenz dessen enthält, transfiziert werden. Hierfür wird zuerst eine Zellzahl von 1×10^6 für die CHO-Zellen und 1×10^7 für die HEK 293T Zellen auf einer 6-Well Platte pro Well ausgesät. Nach 24 Stunden wird die Transfektion nach dem Lipofectamine[®] LTX and PLUS[™] Reagent Kit (invitrogen, Thermofisher Scientific, Dreieich) Protokoll durchgeführt. Ein Well pro 6-Well Platte dient der Kontrolle und wird nicht transfiziert. Zuerst werden zwei Lösungen angesetzt. In Lösung 1 wird 150 µl OPTI-MEM (gibco, Life Technologies Corporation, Grand Island, USA) und 6 µl LTX-Reagenz angesetzt. In Lösung 2 wird zu 170 µl OPTI-MEM (gibco, Life Technologies Corporation, Grand Island, USA) 3,5 µl Plus Reagenz und 2 µg Plasmid hinzugegeben. Beide Lösungen werden daraufhin gemischt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wird der Überstand der Zellen abgenommen, diese mit DPBS (Gibco®, Thermofisher Scientific, Dreieich) gewaschen und anschließend 700 µl Medium sowie 300 µl des inkubierten Transfektionsansatzes auf die Zellen gegeben. Nach 2-3 Tagen wird der Überstand in ein 15 ml Falcon überführt und mit 1x Protease Inhibitor versetzt.

4.2.4 VE-Cadherin ELISA

Zur Bestimmung der Konzentration von sVE-Cadherin^{EC1-5} im Überstand der CHO-Zellen wird das humane VE-Cadherin *Quantikine Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) Kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis) verwendet. Der Antikörper in diesem ELISA erkennt Epitope zwischen Asp-48 und Gln-593, die der extrazellulären Domäne

von VE-Cadherin entsprechen. Die Proben werden vorweg in *Calibrator Diluent RD5p* (1:5 verdünnt) verdünnt. Die Verdünnung war abhängig von Probenart und Zelllinie. Zuerst wird 100 µl *Assay Diluent RD1-57* in jedes Well gegeben. Anschließend wird 50 µl der Standardproben, der Qualitätskontrolle oder der verdünnten Proben hinzugegeben. Die Inkubation findet für zwei Stunden bei Raumtemperatur und unter Schütteln (400 rpm) statt. Danach werden die Wells viermal mit jeweils 200 µl Waschpuffer gewaschen. Daraufhin wird 200 µl Human *VE-cadherin Conjugate* in jedes Well gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur bei 400 rpm inkubiert. Anschließend wird der Waschschritt wiederholt. Danach wird 200 µl *Substrate Solution* hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln bei 400 rpm inkubiert. Daraufhin wird 50 µl *Stop Solution* hinzugegeben und die optische Dichte mittels TECAN sunrise (Tecan Group Ltd.; Männedorf, Schweiz) und der zugehörigen Software Magellan 7.2 SP1 bei 450 nm bestimmt.

4.2.1 Zellkultur primärer Zelllinien

In dieser Arbeit werden primäre humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC) von der Firma Promocell (Heidelberg) verwendet. Um eine hohe Variabilität zwischen den verschiedenen Kulturen zu verhindern, wurde darauf geachtet, dass die Zellen alle aus dem gleichen Präparationslot der Firma stammten, sofern dies möglich war.

4.2.2 Auftauen primärer Zellen

Vorab wird mindestens 9 ml Wachstums-Medium für ungefähr 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ in einer T25 Zellkulturflasche inkubiert. Das Kryovial wird aus der Trockeneisbox geholt und direkt für zwei Minuten in dem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Nach sorgfältiger Desinfektion des Kryovials werden die primären Zellen unter sterilen Bedingungen in eine T25 Flasche überführt. Nach einer Inkubation von 16-24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ wird das Medium gewechselt.

4.2.3 Passagieren von primären Zellen

Wenn die Zellen eine Konfluenz von 70-90 % erreicht haben, werden diese passagiert. Hierfür wird vorab das *PromoCell DetachKit* auf Raumtemperatur gebracht. Daraufhin wird das Medium abgenommen und die Zellen für 15 Sekunden mit 5 ml 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) *balanced salt solution* (BSS) Lösung gewaschen. Nachdem die HEPES BSS Lösung abgenommen wurde, wird die

Trypsin/EDTA Lösung hinzugegeben und für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den abgelösten Zellen wird 5 ml Trypsin Neutralisierungs-Lösung hinzugegeben und die Zellen in ein 50 ml Falcon überführt. Dies wird daraufhin für drei Minuten bei 220 xg zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und die Zellen in 20 ml resuspendiert. Alle zwei bis drei Tage wird das Medium gewechselt.

4.2.4 Behandlung der primären Zellen

In den verschiedenen experimentellen Setups werden die Zellen unterschiedlichen Behandlungen ausgesetzt. Die verwendeten Konzentrationen der Reagenzien sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Konzentration der Behandlungsreagenzien.

| Reagenz | Menge |
|-------------------------------|--------------------------------|
| sVE-Cadherin ^{EC1-5} | 50 ng/ml; 100 ng/ml; 130 ng/ml |
| Angiopoetin-1 | 500 ng/ml |
| Y27632 | 30 μ M |
| AKB9778 | 1 μ M |

4.2.5 *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing* (ECIS) zur Bestimmung des Transendothelialen elektrischen Widerstands (TER)

Um die Endothelbarriere indirekt messen zu können, werden Impedanzmessungen mittels *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing* (ECIS) ZØ (Applied Biophysics, Troy, USA) durchgeführt. Die HDMEC Zellen werden auf den Goldelektroden 8W10E+ (ibidi GmbH, Gräfelfing) ausgesät und kultiviert, bis diese konfluent sind. Die Messung findet bei 4000 Hz statt. Nach 30 Minuten Adaptierungszeit der Zellen wird die Behandlung durchgeführt und die Widerstandsmessung 24 Stunden lang aufrechterhalten.

4.2.6 Transwell Assay zur Messung der endothelialen Permeabilität *in vitro*

Um die Permeabilität der endothelialen Zellkulturen zu messen, wird ein Transwell Assay durchgeführt. Die HDMEC Zellen werden auf 12-Well Platten mit Zellkultur Inserts (Falcon, Wiesbaden) mit einer Porengröße von 0,4 μ m ausgesät und 10-14 Tage kultiviert, bis diese konfluent sind. Die Vorbehandlung findet 24 Stunden vor dem Start des Experimentes statt. Am Versuchstag wird die Transwell Platte zweimal mit Medium ohne Phenolrot gewaschen und 96-Well Platten vorbereitet. Hierfür wird für den Leerwert in Well A2 und A3 100 μ l Medium ohne Phenolrot, sowie in Reihe B Well 1-12 je 50 μ l vorgelegt. Anschließend werden die Inserts 1:1 in frische mit 1,6 ml Medium ohne Phenolrot

vorbereitete Wells gesetzt. In die Inserts wird 500 µl Medium ohne Phenolrot gegeben. Daraufhin wird in jedes Well 100 µl Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Dextran-Lösung (70 kDa, Sigma-Aldrich, Darmstadt) gegeben und vorsichtig resuspendiert. Anschließend wird die Platte für genau 30 Sekunden in den 37°C warmen Schüttel-Inkubator gestellt. Nun wird jeweils 50 µl Medium aus dem Transwell Insert abgenommen und in die 96-Well Platte in Reihe B pipettiert. Die Platte wird bei 37°C im Schüttel-Inkubator gestellt und nach 30, 60, 90 und 120 Minuten jeweils 100 µl Medium aus dem unteren Bereich abgenommen und in die 96-Well Platte überführt. Während des Prozesses wird die 96-Well Platte bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Die Fluoreszenz Messung erfolgt mit dem Tecan GENios Pro Gerät (Tecan Group Ltd.; Männedorf). Für alle experimentellen Bedingungen wurde der Permeabilitätskoeffizient anhand folgender Formel bestimmt:

$$P_E = [(\Delta C_A / \Delta t) \times V_A] / S \times \Delta C_L$$

Dabei ist P_E = diffusive Permeabilität (cm/s), ΔC_A = Änderung der FITC-Dextrankonzentration, Δt = Zeitänderung, V_A = Volumen des abluminalen Mediums, S = Oberfläche und ΔC_L = konstante luminale Konzentration.

4.2.7 Immunfluoreszenz

Die Zellen werden in eine Petrischale mit fünf Deckgläschen ausgesät und kultiviert bis diese konfluent waren. Zuerst wird das Medium abgesaugt. Um die Zellen zu fixieren, werden diese für zehn Minuten mit 2 % Paraformaldehyd (PFA) inkubiert. Anschließend wird dreimal fünf Minuten mit PBS gewaschen. Daraufhin wird die Zellmembran permeabilisiert, hierfür wird 0,1 % TritonX100 verwendet. Nach einer fünfminütigen Inkubation wird dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen werden nach dem Waschen auf Objektträger gelegt und eine Stunde mit 30 µl bovines Serumalbumin (BSA)/ normales Ziegen Serum (NGS) pro Deckgläschen inkubiert. Nachdem diese dreimal fünf Minuten mit PBS gewaschen worden, wird 25 µl primärer Antikörper (Tabelle 6) auf die Deckgläschen gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wird viermal mit PBS für fünf Minuten gewaschen und anschließend der sekundäre Antikörper (Tabelle 7: sekundäre Antikörper Tabelle 7) mit einem Volumen von 25 µl auf die Deckgläschen gegeben. Nach einer einstündigen lichtgeschützten Inkubation werden die Deckgläschen dreimal fünf Minuten mit PBS gewaschen und anschließend mit VectaShield HardSet™ inklusive 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) (Vector Laboratories, Inc.; Burlingame) eingedeckt. Die Objektträger werden bei 4°C aufbewahrt. Fotos

werden an dem Konfokal Mikroskop Leica TCS SP2 (Wetzlar, Germany) in verschiedenen Vergrößerungen aufgenommen. Pro Bedingung werden zwei bis drei Fotos aufgenommen. Mittels ImageJ werden von diesen Fotos insgesamt 30 Messdaten gesammelt. Diese Messdaten beinhalten den *gray value* und die *distance* [microns]. Die Daten werden unter Zuhilfenahme von GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA) analysiert und graphisch dargestellt.

4.2.8 Western Blot Analyse

4.2.8.1 Zelllysate

Um die exprimierten Proteine der HDMEC Zellen analysieren zu können, müssen vorab Zelllysate hergestellt werden. Dafür werden HDMEC Zellen auf 6-Well Platten ausgesät und inkubiert, bis diese konfluent sind. Anschließend werden diese je nach Experiment behandelt (Tabelle 17). Nach der Inkubation wird einmal mit Raumtemperatur warmen PBS gewaschen und anschließend Lysepuffer hinzugegeben. Je nach Experiment werden verschiedene Puffer verwendet (Tabelle 18). Nachdem der Lysepuffer hinzugegeben wurde, werden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt, in ein Eppendorf Gefäß überführt, sonifiziert und bei -20°C eingefroren.

Tabelle 18: Verwendete Lysepuffer.

| Experiment | Lysepuffer |
|--------------------|----------------|
| Western Blot | SDS Lysepuffer |
| Immunpräzipitation | RIPA-Puffer |

4.2.8.2 Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay

Um den Gesamtproteingehalt in den Zelllysatsproben zu bestimmen, wird ein Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay durchgeführt. Hierfür wird das PierceTM BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Dreieich) verwendet. Zuerst wird die Albumin Standardreihe hergestellt (Tabelle 19). Als Verdünnungsreagenz wird der zugehörige Lysepuffer verwendet. In eine 96-Well Platte werden je 10 μl Standardprobe, sowie 5 μl Probe und 5 μl Lysepuffer pipettiert. Anschließend werden Reagenz A und Reagenz B in einem Verhältnis von 1:50 gemischt und 200 μl zu jeder Standardprobe und Probe hinzugegeben. Daraufhin wird für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wird die Extinktion mittels TECAN sunrise (Tecan Group Ltd.; Männedorf, Schweiz) bei 540-590 nm, gemessen.

Tabelle 19: Pipettierschema der Albumin Standardreihe.

| Eppendorf Gefäß | Endkonzentration [$\mu\text{g/ml}$] | Volumen und Quelle des BSA [μl] | Volumen des Lysepuffers |
|-----------------|---------------------------------------|--|-------------------------|
| A | 2000 | 300 des Stockes | 0 |
| B | 1500 | 375 des Stockes | 125 |
| C | 1000 | 325 des Stockes | 325 |
| D | 750 | 175 des Gefäßes B | 175 |
| E | 500 | 325 des Gefäßes C | 325 |
| F | 250 | 325 des Gefäßes E | 325 |
| G | 125 | 325 des Gefäßes F | 325 |
| H | 25 | 100 des Gefäßes G | 400 |
| I | 0 = Blank | 0 | 400 |

4.2.8.3 Western Blot

Ein Western Blot wird durchgeführt, um die Größe und quantitative Menge des Proteins von Interesse zu bestimmen. Hierfür werden zuerst die Lysate aufgetaut und mit vierfachem Ladepuffer inklusive Dithiothreitol (DTT) versetzt. Verdünnungen werden hergestellt, damit alle Lysatproben mit gleicher Gesamtproteinmenge aufgetragen werden können. Die Proben werden für fünf Minuten bei 95°C erhitzt, damit die Disulfidbrücken aufbrechen. Daraufhin werden die Proben abgekühlt und kurz zentrifugiert. Die Proben werden zusammen mit dem Marker (Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder, ThermoFisher, Dreieich) auf ein 4-12 % Bis-Tris NuPAGE™ Gel (Invitrogen, ThermoFisher, Dreieich) aufgetragen. Die Elektrophorese wird zuerst für 15 Minuten mit 120 V und danach für 1 bis $1\frac{1}{2}$ Stunden mit 200 V durchgeführt. Anschließend wird das Gel zusammen mit Filterpapier (Nitrocellulose/ Filterpapier, $0,2\ \mu\text{m}$, Novex™, ThermoFisher, Dreieich) in die Blotkammer (PEQLAB; Erlangen/ seit 2015 Avantor; Darmstadt) gelegt und bei 4°C für eine Stunde bei 200 V und 200 mA geblottet. Um die unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu vermindern, wird die geblottete Membran in 5 % Magermilch-*Tris buffered saline with Tween 20* (TBST)-Lösung bei Raumtemperatur geblockt. Danach wird die Membran mit dem primären Antikörper (Tabelle 6), der gegen das Protein von Interesse gerichtet ist, bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Membran wird dreimal sieben Minuten in TBST gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper (Tabelle 7) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wird dreimal sieben Minuten in TBST gewaschen. Danach wird die Membran im Chemilumines-

zenz-Substrat (CheLuminate-HRP PicoDetect BC, PanReac Applichem, Darmstadt) entwickelt und mit dem ChemiDoc™ (*Imaging System*, BioRad Laboratories, Feldkirchen) Gerät aufgenommen. Anschließend wird zweimal zehn Minuten in TBST gewaschen und daraufhin eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem β -Aktin oder Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) Antikörper inkubiert. Danach wird dreimal sieben Minuten in TBST gewaschen, im Chemilumineszenz-Substrat (CheLuminate-HRP PicoDetect BC, PanReac Applichem, Darmstadt) entwickelt und mittels ChemiDoc™ (*Imaging System*, BioRad Laboratories, Feldkirchen) aufgenommen. Die Quantifizierung wird mittels ImageLab Software (BioRad Laboratories, Feldkirchen) durchgeführt.

4.2.9 Immunpräzipitation

Um Protein-Interaktionen analysieren zu können, wird die Immunpräzipitation durchgeführt. Die Zelllysate werden auf Eis aufgetaut. Anschließend werden pro 500 μ l Zelllysate 25 μ l nProtein A und 25 μ l Protein G hinzugegeben und eine Stunde bei 4°C in einem Drehkarussell inkubiert. Danach wird eine Minute bei 12.000 xg zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Daraufhin wird zu den Proben der primäre Antikörper (Tabelle 6), der gegen das Protein von Interesse gerichtet ist, mit einer Konzentration von 2,5 μ g hinzugegeben und der Ansatz über Nacht bei 4°C in dem Drehkarussell inkubiert. Am nächsten Tag wird zu den Proben 25 μ l nProtein A und 25 μ l Protein G hinzugegeben und für eine Stunde bei 4°C in dem Drehkarussell inkubiert. Anschließend wird dreimal mit 1 ml *radioimmunoprecipitation assay* (RIPA)-Puffer inklusive Protease Inhibitor gewaschen. Zwischen den Waschschritten wird jeweils für eine Minute bei 4°C und 12.000 xg zentrifugiert. Danach wird einmal mit 50 mM Tris, pH 8.0 gewaschen und ein letzter Zentrifugationsschritt durchgeführt. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 25 μ l vierfach Probenpuffer aufgenommen. Anschließend werden die Proben mittels Western Blot analysiert. Dieser wird mit den Antikörpern (Tabelle 6), die zugehörig zu dem Interaktionspartner von Interesse sind, durchgeführt.

4.2.10 Statistik

Alle Daten werden mittels GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA) analysiert und als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Um diese auf Normalverteilung zu testen, wird der D'-Agostino-Pearson-Test angewandt. Lediglich bei den Immunfluoreszenz und Transwell Daten wird aufgrund der geringen n-Zahl der dafür besser geeignete Shapiro-Wilk-Test verwendet.

Bei Normalverteilung werden die Daten mit dem ungepaarten parametrischen Zweistichproben-t-Test, einfaktorielle Varianzanalyse oder zweifaktorielle Varianzanalyse jeweils mit Sidak-Post-hoc-Test parametrisch auf statistische Signifikanz getestet.

Im Falle der nicht-Normalverteilung werden die Daten mittels Logarithmierens transformiert, erneut auf Normalverteilung getestet und bei Bestehen mit dem bereits genannten parametrischen Test analysiert. Bei nicht-normalverteilten Daten werden der ungepaarte, nicht-parametrische Zweistichproben Mann-Whitney-U-Test, Kruskal-Wallis-Test oder der Friedman-Test jeweils mit Dunn´s-Post-hoc-Test angewandt. Soweit nicht anders angegeben, werden alle Gruppen selektiv gegen die Kontrolle getestet. Die Signifikanzniveaus werden folgendermaßen dargestellt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

5 Ergebnisse

5.1 sVE-Cadherin^{EC1-5} Generierung

In Vorarbeiten wurde die extrazelluläre Domäne des VE-Cadherins in den pcDNA-DEST47 Vektor kloniert. Das daraus resultierende Konstrukt pcDNA-DEST47_EC1-5 (siehe Anhang) wird zur Transfektion in CHO-Zellen verwendet. Die erfolgreiche Etablierung der Transfektion von CHO-Zellen zur stabilen Generierung des sVE-Cadherin^{EC1-5}-Proteins in nennenswerten Konzentrationen war zunächst Gegenstand zeitaufwändiger Versuchsreihen. Es wurde hierzu zunächst mit CHO- und HEK-Zellen gearbeitet. Der Versuch eine stabile Zelllinie zu generieren, die konstant relevante Mengen des sVE-Cadherin^{EC1-5}-Proteins generiert war nicht erfolgreich. Nach kürzester Zeit produzierten die Zellen das sVE-Cadherin^{EC1-5}-Protein nicht mehr. Verschiedene Ansätze hierzu führten nicht zum Erfolg. Es gelang jedoch schließlich das Transfektionsprotokoll so zu optimieren, dass für alle weiteren Versuche frisch transfizierte CHO-Zellen verwendet wurden. Diese Zellen produzieren und sezernieren das sVE-Cadherin^{EC1-5}-Protein reproduzierbar in den Überstand der Zellkulturen. Die Konzentration von sVE-Cadherin^{EC1-5} im Zellkulturüberstand wird mittels eines humanen VE-Cadherin ELISAs, welches gegen die Aminosäuren Asp-48 bis Gln-593 gerichtet ist, gemessen (Abbildung 5-1). Die Konzentrationen schwanken zwischen 140 ng/ml und 500 ng/ml mit einem Mittelwert von 244 ng/ml.

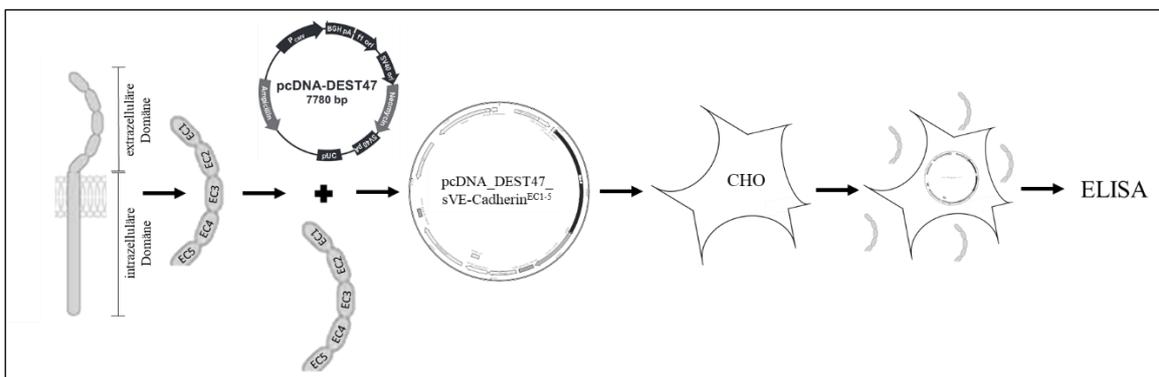


Abbildung 5-1: Schematische Abbildung der Generierung von sVE-Cadherin^{EC1-5}.

Zusätzlich wird in Western Blot Analysen verifiziert, dass sVE-Cadherin^{EC1-5} im Überstand vorhanden ist. Hierfür wird ein Antikörper verwendet, der gegen die extrazelluläre Domäne von VE-Cadherin gerichtet ist. In Abbildung 5-2 zeigt die erste und zweite Bande Lysatproben aus CHO-Zellen, nicht transfizierte und mit dem Konstrukt pcDNA-

DEST47_EC1-5 transfizierte. Bande drei und vier sind die zu den CHO-Zellen zugehörigen Überstände. Probe drei ist der Überstand von nicht transfizierten und Probe vier von transfizierten CHO-Zellen.

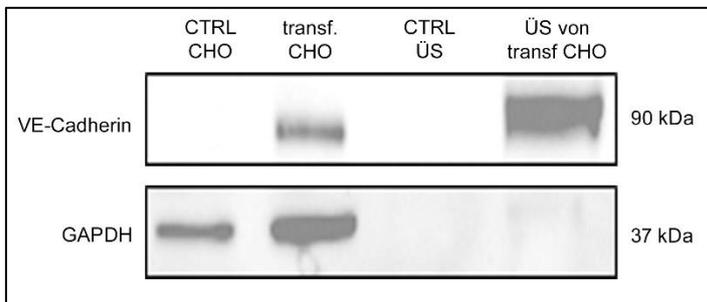


Abbildung 5-2: Western Blot Analyse von Lysaten und Überstände von CHO-Zellen, die entweder nicht oder mit dem Konstrukt pcDNA-DEST47_EC1-5 transfiziert wurden.

CTRL = Kontrolle; ÜS = Überstände; transf. = transfiziert.

Um einen möglichen funktionellen Effekt von sVE-Cadherin^{EC1-5} zu testen, wird in der Folge mit Endothelkulturen gearbeitet. Hierfür wird zur Imitation einer Endothelbarriere *in vitro* humane dermale mikrovaskuläre Endothel Zellen (HDMECs) ausgesät und zum konfluenten Monolayer wachsen gelassen. Auf diesen Monolayer wird sVE-Cadherin^{EC1-5} in unterschiedlichen Konzentrationen appliziert.

5.2 Das Spaltprodukt sVE-Cadherin^{EC1-5} und seine Auswirkungen

5.2.1 Effekt von sVE-Cadherin^{EC1-5} auf die Endothelbarriere Funktion

Um den Effekt von sVE-Cadherin^{EC1-5} auf die Funktion der Endothelbarriere zu untersuchen, werden zwei verschiedene Messungen durchgeführt, die des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TER) und die der Permeabilität. Der elektrische Widerstand wird über 24 Stunden unter Stimulation mit aufsteigenden sVE-Cadherin^{EC1-5}-Konzentrationen (50 ng/ml sVE-Cadherin^{EC1-5}, 100 ng/ml sVE-Cadherin^{EC1-5} oder 130 ng/ml sVE-Cadherin^{EC1-5}) gemessen. Die Applikation dieser unterschiedlichen sVE-Cadherin^{EC1-5}-Konzentrationen auf die Endothelkulturen zeigt einen dosisabhängigen Effekt auf den elektrischen Widerstand (Abbildung 5-3 A), der mit steigender sVE-Cadherin^{EC1-5}-Konzentration abnimmt. Wobei die Kontrolle im Mittel einen TER-Wert von $108,00 \pm 0,81$ % hat und sich von 50 ng/ml sVE-Cadherin^{EC1-5} ($87,93 \pm 1,15$ %; $p = 0,0304$), 100 ng/ml sVE-Cadherin^{EC1-5} ($70,35 \pm 2,28$ %; $p < 0,0001$) und 130 ng/ml sVE-Cadherin^{EC1-5} ($55,09 \pm 2,87$ %; $p < 0,0001$) unterscheidet. Die zusätzliche Analyse der Daten als Fläche unter der Kurve (*area under the curve/AUC*) relativ zur Kontrolle (Abbildung 5-3 B) zeigt ein

ähnliches Muster. Hier hat die Kontrollgruppe (CTRL) einen Wert von $1,00 \pm 0,039$. Nach der Behandlung mit sVE-Cadherin^{EC1-5} reduzieren sich die AUC-Werte für sVE-Cadherin^{EC1-5} [50 ng/ml] auf $0,81 \pm 0,05$ ($p = 0,2432$), für sVE-Cadherin^{EC1-5} [100 ng/ml] auf $0,65 \pm 0,053$ ($p < 0,0001$) und für sVE-Cadherin^{EC1-5} [130 ng/ml] auf $0,50 \pm 0,064$ ($p < 0,0001$).

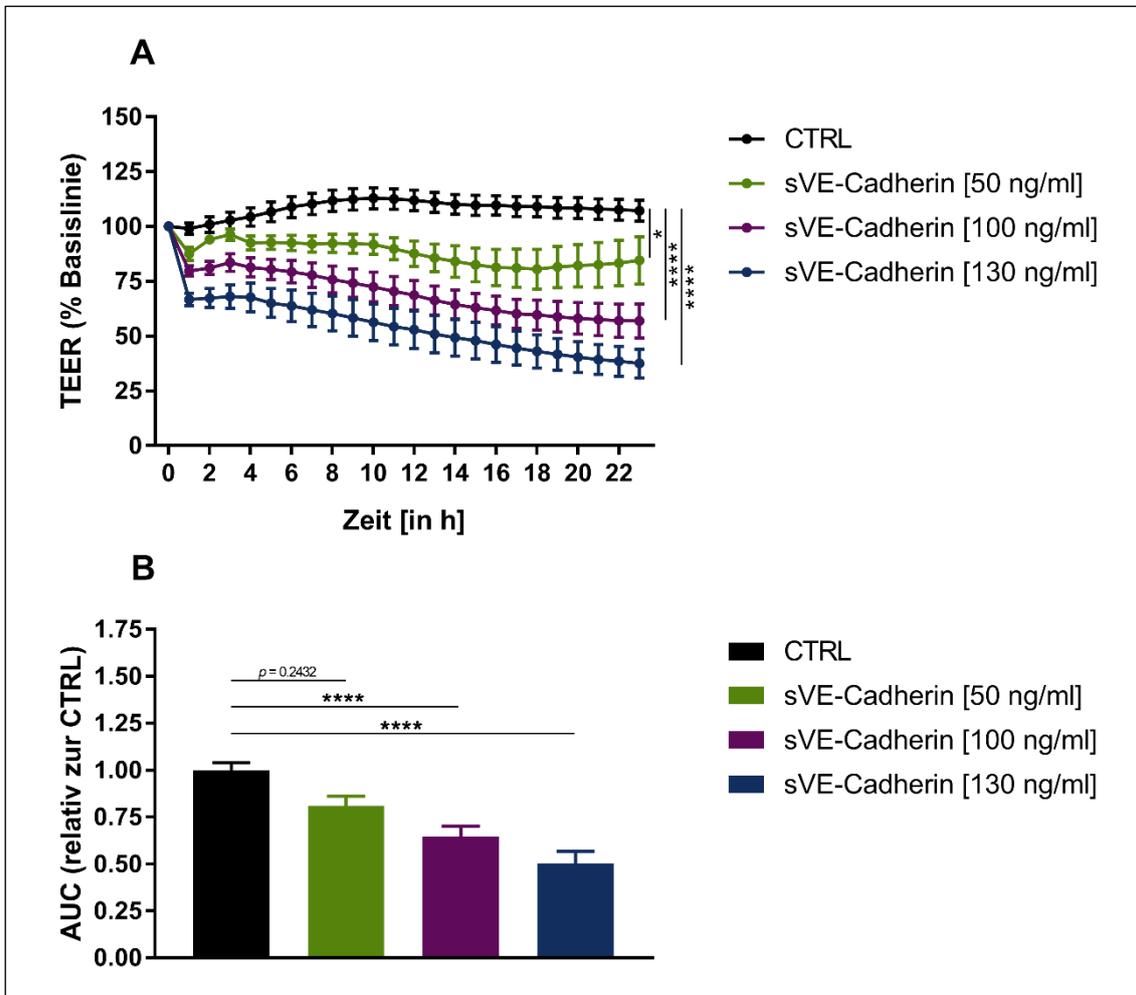


Abbildung 5-3: Effekt von sVE-Cadherin^{EC1-5} auf die Integrität der Endothelbarriere.

A: Transendotheliale elektrische Widerstandsmessung (TER) über 24 Stunden. Applikation von drei unterschiedlichen sVE-Cadherin^{EC1-5} Konzentrationen 50 ng/ml, 100 ng/ml und 130 ng/ml. B: Fläche unter der Kurve (AUC) der TER nach sVE-Cadherin^{EC1-5} Applikation von drei unterschiedlichen Konzentrationen 50 ng/ml, 100 ng/ml und 130 ng/ml. Daten werden als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Statistische Signifikanzen werden anhand des Friedman-Test mit Dunn´s-Post-hoc-Test (TER) oder der einfaktoriellem Varianzanalyse mit Sidak Post-hoc-Test (AUC) ermittelt. $n \geq 6$. *zeigt $p < 0,05$ an; **** zeigt $p < 0,0001$ an.

Ebenso wird der Permeabilitätskoeffizient (P_E) bestimmt, um damit ein direktes Maß für die Integrität der Barriere der Endothelkulturen zu erhalten. Hierfür werden HDMEC Zel-

len auf Transwell Filter ausgesät und der Fluss von FITC-Dextran (70 kDa) über die Zellschicht von apikal nach basolateral gemessen. Sowohl die Behandlung mit LPS [100 ng/ml], als Positivkontrolle, als auch sVE-Cadherin^{EC1-5} [130 ng/ml] hat zur Folge, dass der FITC-Dextran Flux erhöht ist (Abbildung 5-4). Der Wert der Kontrollgruppe liegt bei $1,08 \pm 0,014 \text{ cm/s} \cdot 10^{-6}$. Nach sVE-Cadherin^{EC1-5} [130 ng/ml] Behandlung liegt dieser bei $1,27 \pm 0,010$ und nach LPS [100 ng/ml] Behandlung bei $1,43 \pm 0,018$. Der *p*-Wert für die Kontrollgruppe vs. sVE-Cadherin^{EC1-5} liegt nach 60 Minuten bei 0,0713, nach 90 Minuten bei 0,0280 und nach 120 Minuten bei 0,0404. Der *p*-Wert für die Kontrollgruppe vs. LPS liegt nach 60 Minuten bei 0,0002, nach 90 Minuten bei $< 0,0001$ und nach 120 Minuten bei 0,0001.

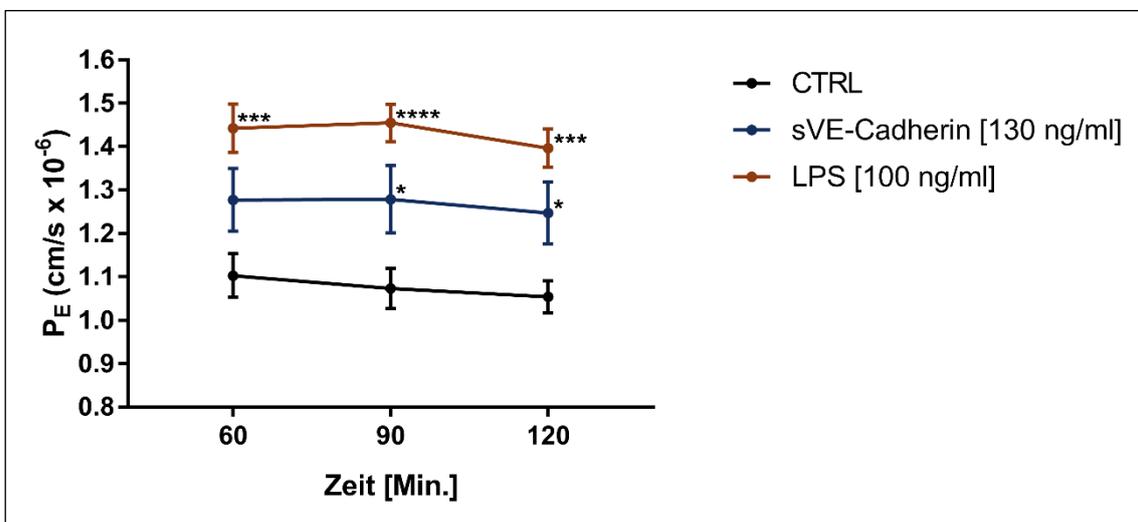


Abbildung 5-4: Permeabilitätsmessung über einen HDMEC Zellrasen via FITC-Dextran (70 kDa) Flux. Behandlung mit 100 ng/ml LPS oder 130 ng/ml sVE-Cadherin^{EC1-5}. Daten werden als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Statistische Signifikanzen werden anhand der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Sidak Post-hoc-Test ermittelt. $n \geq 11$. * zeigt $p < 0,05$ an; *** zeigt $p < 0,001$; ***** zeigt $p < 0,0001$ an.

Zusätzlich werden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt, um Unterschiede in der Morphologie und Verteilung von VE-Cadherin an den Zellgrenzen zu untersuchen. VE-Cadherin (rot) zeigt unter Kontrollbedingungen ein lineares Muster an den Zellgrenzen (Abbildung 5-5). Nach 24 Stunden Behandlung der Zellen mit insgesamt drei unterschiedlichen Konzentrationen von sVE-Cadherin^{EC1-5} (50 ng/ml, 100 ng/ml und 130 ng/ml) zeigt VE-Cadherin ein dosisabhängiges fragmentiertes Muster an den Zellgrenzen. Außerdem bilden sich nach der Applikation von 100 ng/ml und 130 ng/ml sVE-Cadherin^{EC1-5} Lücken im HDMEC Zellrasen aus, erkennbar an der fehlenden VE-Cadherin-Fär-

bung. Unter Kontrollbedingungen ist das kortikale Aktin-Zytoskelett (grün) an den Zellgrenzen zu sehen. Mit zunehmender sVE-Cadherin^{EC1-5} Dosis nimmt die Stressfaserausbildung im Aktin-Zytoskelett zu.

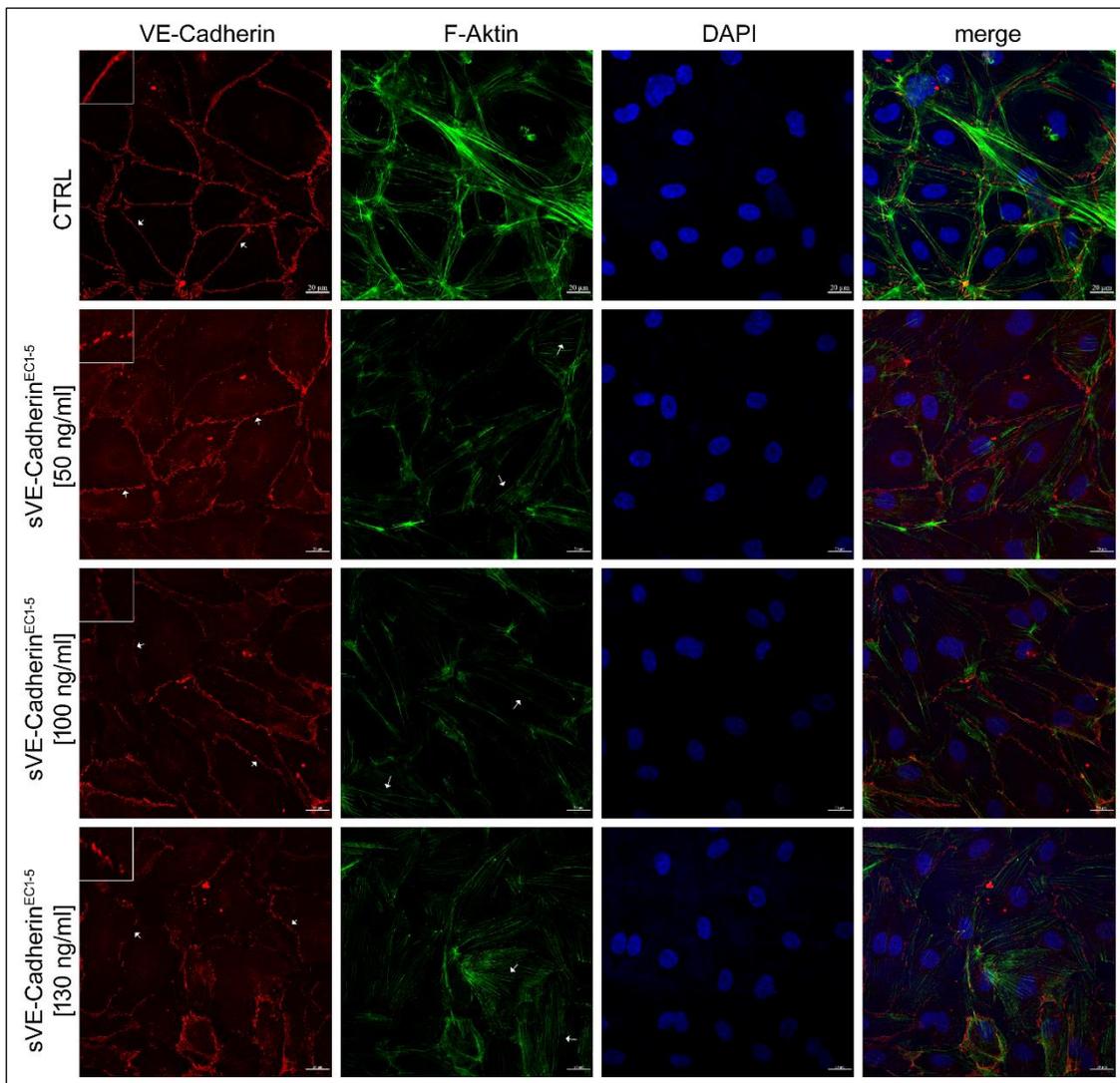


Abbildung 5-5: Immunfluoreszenzfärbung einer HDMEC Zellkultur.

Färbung von VE-Cadherin (rot), F-Aktin (grün), DAPI (blau), sowie Darstellung der Fusion (merge; rechts). Kontrollbedingungen (CTRL), Applikation von drei unterschiedlichen sVE-Cadherin^{EC1-5} Konzentrationen 50 ng/ml, 100 ng/ml und 130 ng/ml. Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Die Immunfluoreszenzfärbungen von VE-Cadherin unter Kontrollbedingung, sowie nach Zugabe von sVE-Cadherin^{EC1-5} in den Konzentrationen 50 ng/ml, 100 ng/ml und 130 ng/ml werden quantitativ ausgewertet (Abbildung 5-6). Diese Quantifizierung zeigt, dass nach der Gabe von 50 ng/ml sVE-Cadherin^{EC1-5} die Signalintensität von VE-Cadherin an den Zellgrenzen reduziert ist. Zusätzlich wird der AUC-Wert für die Distanz -0,5 bis 0,5 µm berechnet und auf Signifikanz getestet. Nach der Gabe von 100 ng/ml und 130 ng/ml

sVE-Cadherin^{EC1-5} zeigt sich die gleiche Veränderung in der Signalintensität, als auch in den AUC-Werten. Der AUC-Wert von der Kontrollgruppe beträgt $1,00 \pm 0,141$. Unter 50 ng/ml sVE-Cadherin^{EC1-5}-Behandlung zeigt VE-Cadherin eine Reduktion in der Signalintensität von $0,422 \pm 0,113$, verglichen mit der Kontrollgruppe ($p = 0,0141$). Für sVE-Cadherin^{EC1-5} [100 ng/ml] betragen die AUC-Werte $0,418 \pm 0,082$ ($p = 0,0070$) und für sVE-Cadherin^{EC1-5} [130 ng/ml] $0,366 \pm 0,051$ ($p = 0,0286$).

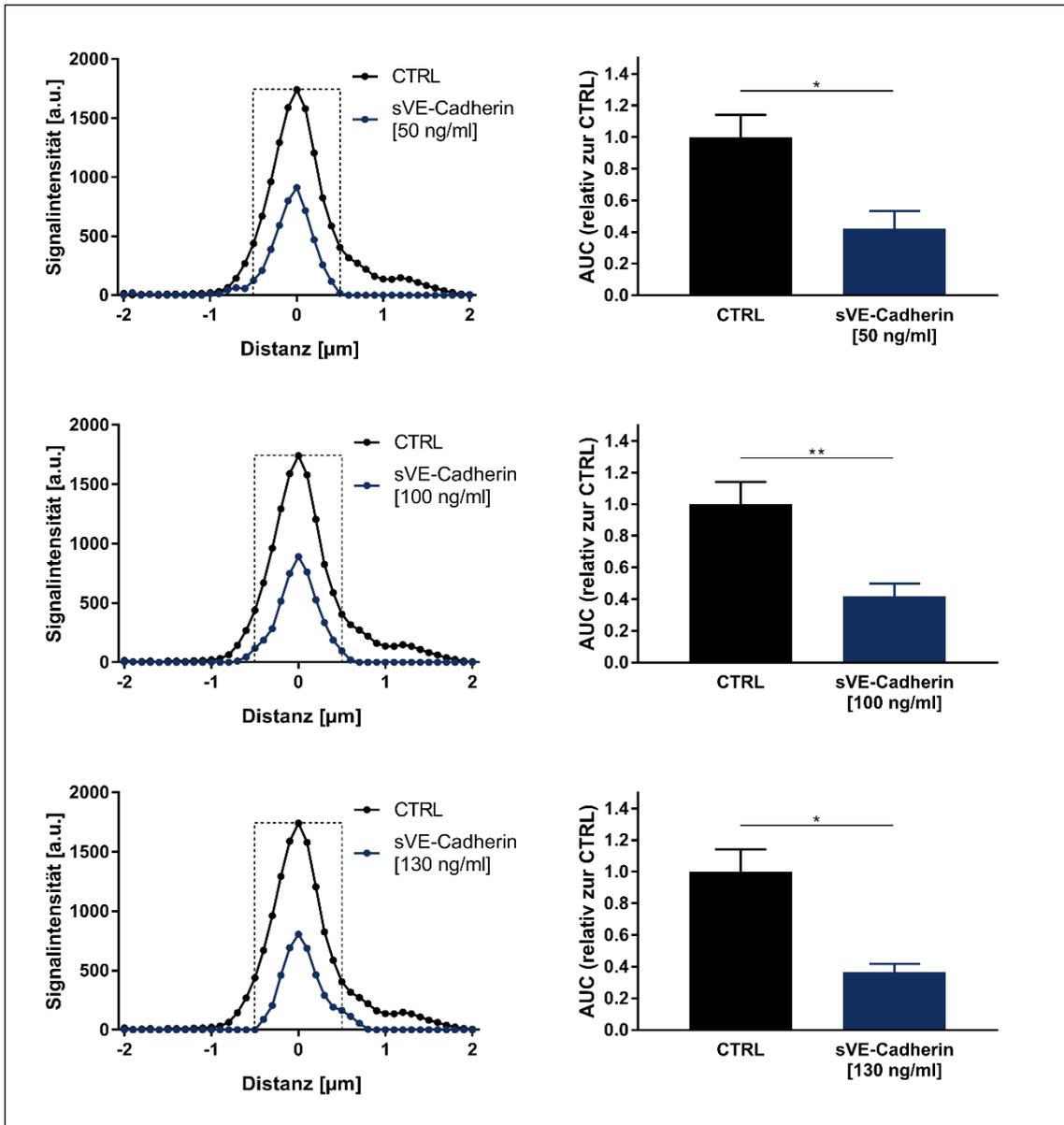


Abbildung 5-6: Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung aus Abbildung 5-5.

AUC-Berechnung des Kurven-Bereiches der Signalintensität zwischen den Distanzen $-0,5$ und $0,5 \mu\text{m}$. Daten werden als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Statistische Signifikanzen werden anhand des ungepaarten parametrischen Zweistichproben-t-Test (50 & 100 ng/ml) oder nicht-parametrischen Zweistichproben Mann-Whitney-U-Test jeweils mit Dunn's-Post-hoc-Test (130 ng/ml) ermittelt. $n \geq 4$. * zeigt $p < 0,05$ an; ** zeigt $p < 0,01$ an.

Um zu prüfen, ob sich die Proteinmenge von VE-Cadherin nach der Behandlung mit sVE-Cadherin^{EC1-5} ändert, werden Western Blot Analysen gegen die extrazelluläre und intrazelluläre Domäne von VE-Cadherin durchgeführt. Insgesamt zeigt sich eine Reduktion der Proteinmenge sowohl der extra- als auch der intrazellulären Domäne von VE-Cadherin nach der Behandlung mit sVE-Cadherin^{EC1-5} [130 ng/ml] verglichen mit der Kontrollgruppe (Abbildung 5-7).

Bei der Analyse der extrazellulären Domäne von VE-Cadherin hat die Kontrollgruppe einen Wert von $100 \pm 14,0 \%$ und die sVE-Cadherin^{EC1-5} behandelte Gruppe von $49,4 \pm 10,6 \%$. ($p = 0,021$; Abbildung 5-7 A). Die Analyse der intrazellulären Domäne von VE-Cadherin zeigt für die Kontrollgruppe einen Wert von $100 \pm 7,3 \%$ und für die behandelte Gruppe von $64,4 \pm 10,3 \%$. ($p = 0,022$; Abbildung 5-7 B).

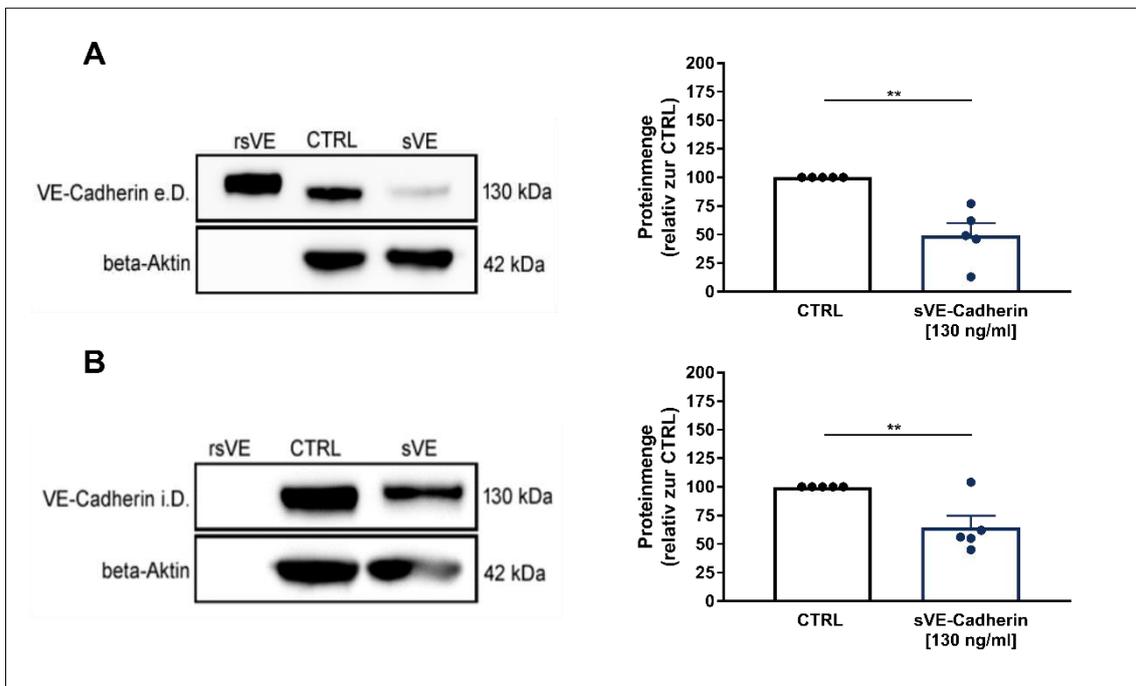


Abbildung 5-7: Western Blot Analyse der extra- und intrazellulären Domäne von VE-Cadherin nach der Behandlung mit sVE-Cadherin^{EC1-5} [130 ng/ml].

A: Western Blot Analyse von der extrazellulären Domäne von VE-Cadherin (links) und Quantitative Auswertung der Proteinmenge (rechts). B: Western Blot Analyse von der intrazellulären Domäne von VE-Cadherin (links) und Quantitative Auswertung der Proteinmenge (rechts). Daten werden als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Statistische Signifikanzen werden anhand des ungepaarten parametrischen Zweistichproben-t-Test mit Sidak-Post-hoc-Test ermittelt. $n = 5$. * zeigt $p < 0,05$ an.

5.2.2 Effekt von sVE-Cadherin^{EC1-5} auf den VE-Cadherin-Multiprotein-Komplex

Als nächstes wurde der Effekt von sVE-Cadherin^{EC1-5} auf Proteine untersucht, die bekannt dafür sind mit VE-Cadherin eine Interaktion beziehungsweise eine Bindung einzugehen.

5.2.2.1 alpha-(α -)Catenin

Das erste Protein, welches untersucht wird, ist α -Catenin. In Immunfluoreszenzfärbungen von konfluenten HDMEC-Monolayern bildet dieses Protein unter Kontrollbedingungen an den Zellgrenzen ein lineares Muster aus (Abbildung 5-8 A).

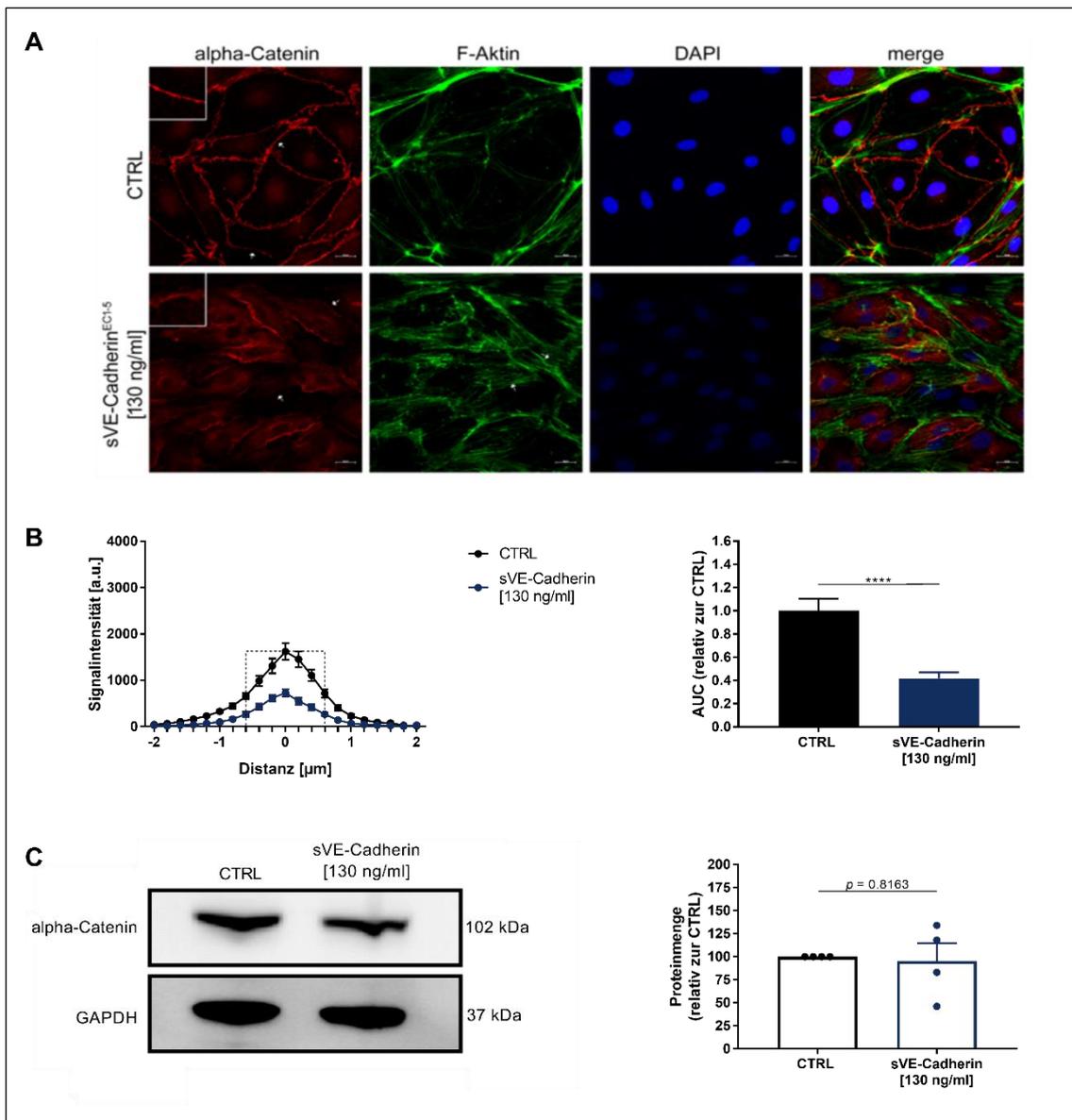


Abbildung 5-8: Analyse der sVE-Cadherin^{EC1-5} Effekte auf α -Catenin.

A: Immunfluoreszenzfärbung eines HDMEC Zellrasens. Färbung von α -Catenin (rot), F-Aktin (grün), DAPI (blau), sowie Darstellung der Fusion (merge; rechts). Kontrollbedingungen, sVE-Cadherin^{EC1-5} [130

ng/ml]. B: Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung. AUC-Berechnung des Kurvenbereiches der Signalintensität zwischen den Distanzen -0,6 und 0,6 μm . C: Western Blot Analyse von α -Catenin unter Kontrollbedingungen und nach sVE-Cadherin^{EC1-5}-Behandlung (links). Quantifizierung der Western Blot Analyse. Darstellung der Proteinmengen relativ zur Kontrolle. Maßstabsbalken entspricht 20 μm . Daten werden als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Statistische Signifikanzen werden anhand des ungepaarten parametrischen Zweistichproben-t-Test mit Sidak-Post-hoc-Test ermittelt. $n \geq 4$. **** zeigt $p < 0,0001$ an.

Durch die Applikation von 130 ng/ml sVE-Cadherin^{EC1-5} wird α -Catenin (rot) an den Zellgrenzen reduziert und das kortikale Aktin-Zytoskelett (grün) bildet Stressfasern aus. Die quantitative Auswertung ergibt, dass die Signalintensität an den Zellgrenzen nach der Behandlung mit sVE-Cadherin^{EC1-5} verglichen mit der Kontrollgruppe reduziert ist (Abbildung 5-8 B). Der AUC-Wert, der von der Distanz -0,6 bis 0,6 μm errechnet wird, zeigt einen Unterschied. Der Wert der Kontrollgruppe liegt bei $1,00 \pm 0,105$, der Wert der sVE-Cadherin^{EC1-5}-Gruppe beträgt $0,420 \pm 0,0507$ ($p < 0,0001$). Die Quantifizierung der Proteinmenge von α -Catenin nach der sVE-Cadherin^{EC1-5}-Stimulation mittels Western Blot Analyse ergibt keinen Unterschied zwischen der Kontroll- und sVE-Cadherin^{EC1-5}-Gruppe ($95,25 \pm 19,57$ % relativ zur Kontrollgruppe; $p = 0,8163$; Abbildung 5-8 C).

5.2.2.2 beta-(β -)Catenin

Als nächstes wird β -Catenin, welches eine wichtige Rolle in der Regulation der vaskulären Zell-Zell-Kontakte spielt, untersucht. In Immunfluoreszenzfärbungen zeigt dieses Protein unter Kontrollbedingungen ein lineares Färbemuster (Abbildung 5-9).

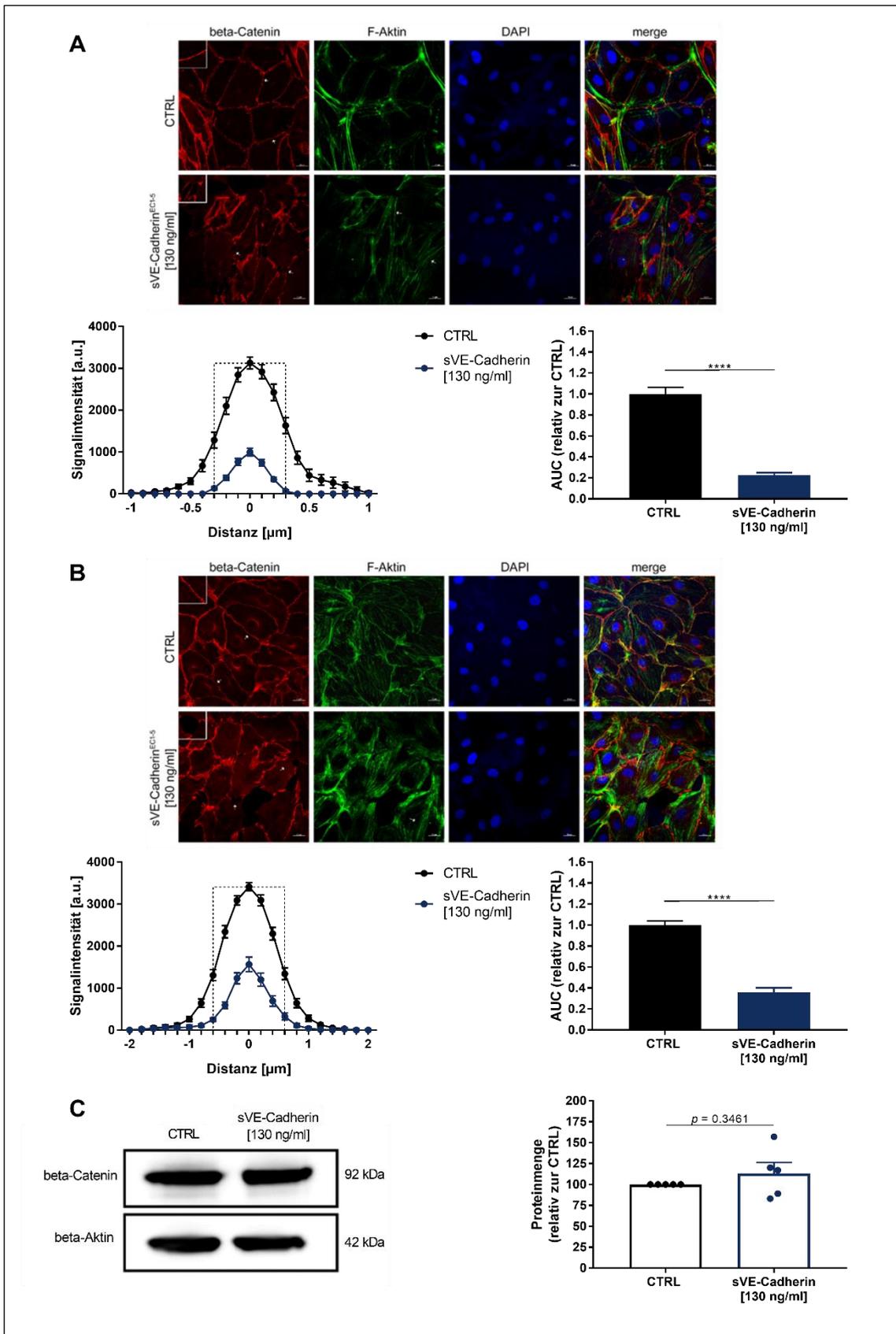


Abbildung 5-9: Analyse des Effekts von sVE-Cadherin^{EC1-5} auf β -Catenin.

Immunfluoreszenzfärbung eines HDMEC Zellrasens. Färbung von β -Catenin (rot), F-Aktin (grün), DAPI (blau), sowie Darstellung der Fusion (merge; rechts). Kontrollbedingungen, sVE-Cadherin^{EC1-5} [130

ng/ml]. Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung. AUC-Berechnung des Kurvenbereiches der Signalintensität zwischen den Distanzen -0,6 und 0,6 μm . A: Färbung nach 6 h Behandlung B: Färbung nach 24 h Behandlung. C: Western Blot Analyse von β -Catenin unter Kontrollbedingungen und nach 24 h sVE-Cadherin^{EC1-5}-Behandlung (links). Quantifizierung der Western Blot Analyse. Darstellung der Proteinmenge relativ zur Kontrolle. Maßstabsbalken entspricht 20 μm . Daten werden als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Statistische Signifikanzen werden anhand des ungepaarten parametrischen Zweistichproben-t-Test mit Sidak-Post-hoc-Test ermittelt. $n \geq 5$.**** zeigt $p < 0,0001$ an.

Es wird nach sechs Stunden und nach 24 Stunden sVE-Cadherin^{EC1-5}-Behandlung die Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Sowohl nach sechs als auch nach 24 Stunden zeigt die Immunfluoreszenzfärbung von β -Catenin (rot) ein fragmentiertes Muster (Abbildung 5-9). Zusätzlich bildet sich in dem konfluenten HDMEC Zellrasen bei beiden Zeitpunkten Lücken aus, wo kein Färbemuster zu erkennen ist. In der Kontrollgruppe ist das kortikale Aktin-Zytoskelett (grün) an den Zellgrenzen zu erkennen. Nach der Applikation von sVE-Cadherin^{EC1-5} bildet das Aktin-Zytoskelett Stressfasern aus. Die Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbungen ergibt, dass die Signalintensität von β -Catenin an den Zellgrenzen nach der sVE-Cadherin^{EC1-5}-Behandlung bei beiden Behandlungszeitpunkten reduziert ist.

Die AUC-Werte werden jeweils von -0,6 bis 0,6 μm errechnet. Für die Kontrollgruppe ergibt sich ein AUC-Wert bei der sechs Stunden Behandlung von $1,00 \pm 0,063$ und bei der 24 Stunden-Behandlung von $1,00 \pm 0,039$ und für die behandelte Gruppe bei der sechs Stunden Behandlung $0,227 \pm 0,225$ und bei der 24 Stunden Behandlung $0,359 \pm 0,0432$. Der p -Wert beträgt bei beiden Behandlungszeitpunkten $p < 0,0001$. In Western Blot Analysen zeigt sich, dass sich das Proteinlevel nach 24 Stunden nicht verändert (Abbildung 5-9 C). Dabei beträgt der Wert für die sVE-Cadherin^{EC1-5}-Gruppe $113,20 \pm 13,18$ % (relativ zur Kontrolle; $p = 0,346$).

Da bekannt ist, dass VE-Cadherin und β -Catenin interagieren, wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung die Interaktion nach der Behandlung mit sVE-Cadherin^{EC1-5} untersucht. Wie vorab gezeigt, hat sowohl β -Catenin (grün) als auch VE-Cadherin (rot) unter Kontrollbedingungen ein lineares (vgl. Abbildung 5-5) und nach der Behandlung mit sVE-Cadherin^{EC1-5} ein fragmentiertes Färbemuster (Abbildung 5-10).

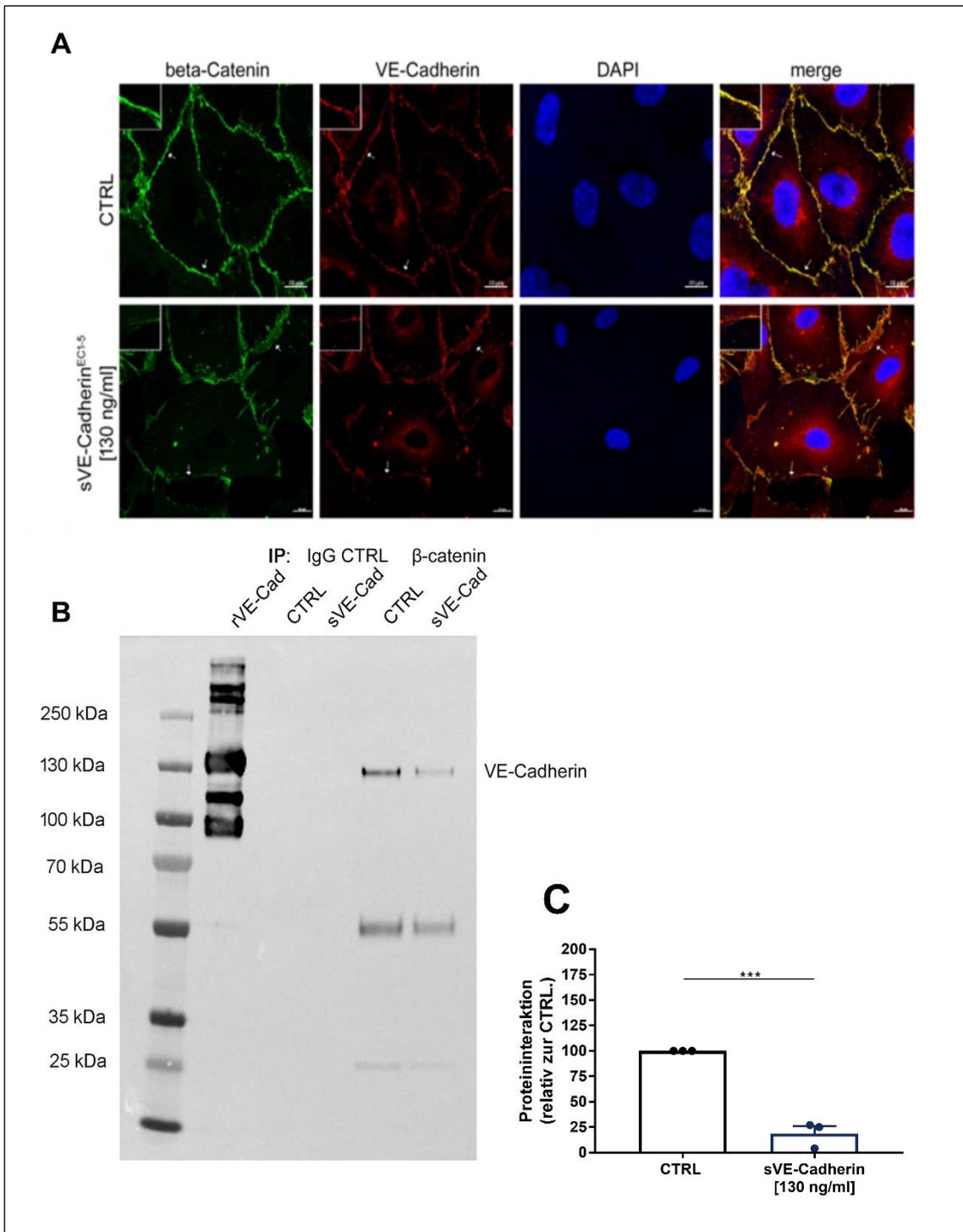


Abbildung 5-10: Analyse des Effekts von sVE-Cadherin^{EC1-5} auf die Interaktion zwischen β -Catenin und VE-Cadherin.

A: Immunfluoreszenzfärbung eines HDMEC Zellrasens. Färbung von β -Catenin (grün), VE-Cadherin (rot), DAPI (blau), sowie Darstellung der Fusion (merge; rechts). Kontrollbedingungen, sVE-Cadherin^{EC1-5} [130 ng/ml]. B: Western Blot Analyse der Immunpräzipitation. Blot gegen VE-Cadherin. C: Darstellung der Proteinmenge der Immunpräzipitation. Maßstabsbalken entspricht 10 μ m für Kontrolle und 20 μ m für sVE-Cadherin^{EC1-5}. Daten werden als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Statistische Signifikanzen werden anhand des

ungepaarten parametrischen Zweistichproben-t-Test mit Sidak-Post-hoc-Test ermittelt. $n \geq 3$. *** zeigt $p < 0,001$ an.

Die Fusionsbilder lassen durch die Co-Lokalisation eine Interaktion zwischen β -Catenin und VE-Cadherin vermuten (gelb), welche unter sVE-Cadherin^{EC1-5}-Behandlung reduziert ist. Mittels Immunpräzipitationsexperimenten kann die vermutete Interaktion und der sVE-Cadherin^{EC1-5}-Effekt bestätigt werden (Abbildung 5-10 B). Es zeigt sich, dass die Interaktion zwischen VE-Cadherin und β -Catenin nach der Behandlung mit sVE-Cadherin^{EC1-5} reduziert ist. Der Wert liegt bei $18,67 \pm 7,356 \%$ ($p = 0,0004$).

5.2.2.3 gamma-(γ -)Catenin

Ein weiteres Protein, welches untersucht wird, ist γ -Catenin. Dieses verknüpft Cadherine an das Zytoskelett. In Immunfluoreszenzfärbungen zeigt γ -Catenin (rot) ein lineares Muster an den Zellgrenzen unter Kontrollbedingung (Abbildung 5-11).

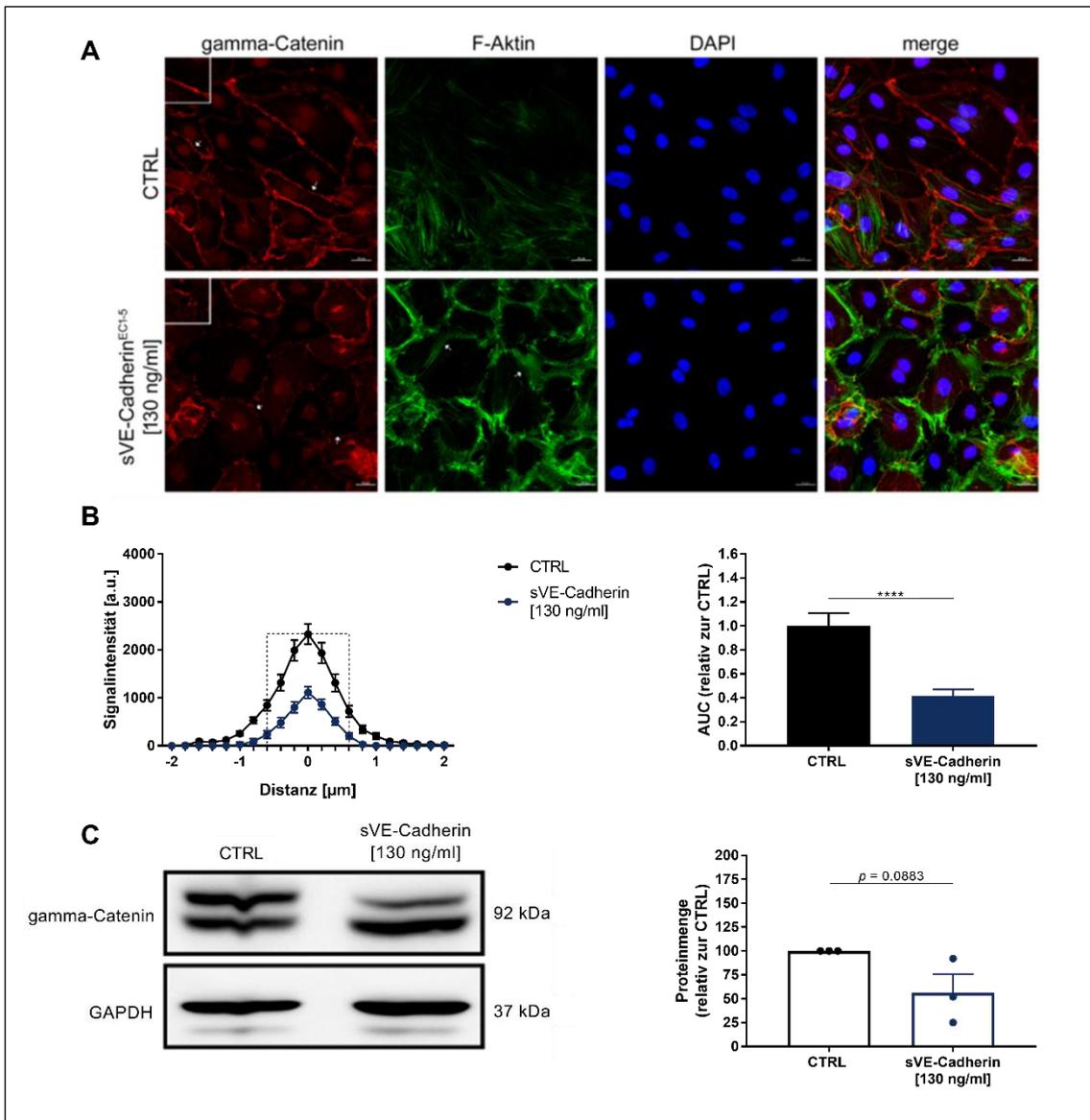


Abbildung 5-11: Analyse des Effekts von sVE-Cadherin^{EC1-5} auf γ -Catenin.

A: Immunfluoreszenzfärbung eines HDMEC Zellrasens. Färbung von γ -Catenin (rot), F-Aktin (grün), DAPI (blau), sowie Darstellung der Fusion (merge; rechts). Kontrollbedingungen, sVE-Cadherin^{EC1-5} [130 ng/ml]. B: Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung. AUC-Berechnung des Kurvenbereiches der Signalintensität zwischen den Distanzen -0,6 und 0,6 μ m. C: Western Blot Analyse von γ -Catenin unter Kontrollbedingungen und nach sVE-Cadherin^{EC1-5}-Behandlung (links). Quantifizierung der Western Blot Analyse. Darstellung der Proteinmenge relativ zur Kontrolle. Maßstabsbalken entspricht 20 μ m. Daten werden als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Statistische Signifikanzen werden anhand des ungepaarten parametrischen Zweistichproben-t-Test mit Sidak-Post-hoc-Test ermittelt. $n \geq 3$. **** zeigt $p < 0,0001$ an.

Nach der sVE-Cadherin^{EC1-5}-Behandlung zeigt γ -Catenin ein fragmentiertes Färbemuster. Außerdem werden Stressfasern von dem Aktin-Zytoskelett (grün) ausgebildet. Die quantitative Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen ergibt eine Reduktion von γ -

Catenin durch die Behandlung mit sVE-Cadherin^{EC1-5} (Abbildung 5-11 B). Die AUC-Werte, die von -0,6 bis 0,6 μm berechnet werden, betragen $1,00 \pm 0,104$ für die Kontrollgruppe, sowie $0,414 \pm 0,056$ für die sVE-Cadherin^{EC1-5}-behandelte Gruppe ($p = 0,001$). Western Blot Analysen zeigen, dass die Proteinmenge durch die Behandlung mit sVE-Cadherin^{EC1-5} von dem 92 kDa großen γ -Catenin nicht verändert wird (Abbildung 5-11C). Dabei liegt die Proteinmenge bei $56,33 \pm 19,46$ % relativ zur Kontrolle ($p = 0,088$).

5.2.2.4 delta-(δ -)Catenin

Ein weiteres Protein, welches untersucht wird, ist das multifunktionale δ -Catenin. Immunfluoreszenzfärbungen zeigen, dass δ -Catenin (rot) unter Kontrollbedingungen ein lineares Färbemuster an den Zellgrenzen ausbildet, sowie um den Zellkern lokalisiert ist (Abbildung 5-12 A).

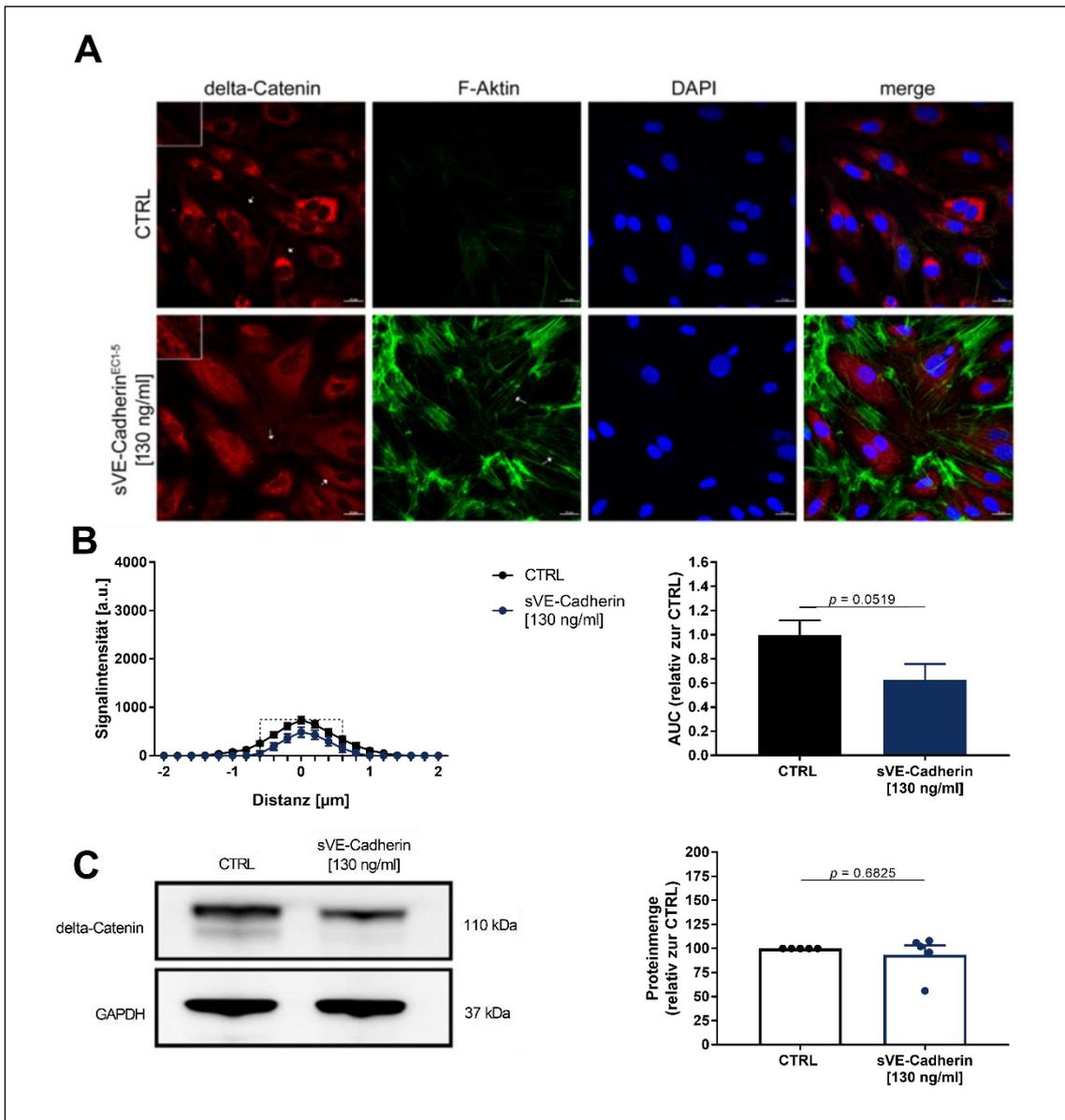


Abbildung 5-12: Analyse des Effekts von sVE-Cadherin^{EC1-5} auf δ -Catenin.

A: Immunfluoreszenzfärbung eines HDMEC Zellrasens. Färbung von δ -Catenin (rot), F-Aktin (grün), DAPI (blau), sowie Darstellung der Fusion (merge; rechts). Kontrollbedingungen, sVE-Cadherin^{EC1-5} [130 ng/ml]. B: Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung. AUC-Berechnung des Kurvenbereiches der Signalintensität zwischen den Distanzen -0,6 und 0,6 μ m. C: Western Blot Analyse von δ -Catenin unter Kontrollbedingungen und nach sVE-Cadherin^{EC1-5}-Behandlung (links). Quantifizierung der Western Blot Analyse. Darstellung der Proteinmenge relativ zur Kontrolle. Maßstabsbalken entspricht 20 μ m. Daten werden als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Statistische Signifikanzen werden anhand des ungepaarten parametrischen Zweistichproben-t-Test mit Sidak-Post-hoc-Test (AUC) oder nicht-parametrische Zweistichproben Mann-Whitney-U-Test mit Dunn's-Post-hoc-Test (WB) ermittelt. $n \geq 5$.

Nach der Behandlung mit sVE-Cadherin^{EC1-5} zeigt sich eine Reduktion des linearen Färbemusters, sowie eine diffuse Verteilung im Zytoplasma. Außerdem bildet das Aktin-Zytoskelett (grün) Stressfasern aus. Die Signalintensität zeigt eine Reduktion von δ -Catenin (Abbildung 5-12 B), die jedoch nicht signifikant ist. Die AUC-Werte, die von -0,6 bis 0,6 μm berechnet werden, betragen für die Kontrollgruppe $1,00 \pm 0,118$, sowie $0,625 \pm 0,133$ für die behandelte Gruppe ($p = 0,052$). Western Blot Analysen zeigen eine unveränderte Proteinmenge nach der Behandlung mit δ -Catenin (Abbildung 5-12 C). Der Wert liegt bei $93,60 \pm 9,621$ relativ zur Kontrolle ($p = 0,683$).

5.2.2.5 ZO-1

ZO-1 ist ein Occludenskontakt Protein, welches die endothelialen Adhäsionskontakte kontrolliert. ZO-1 (rot) zeigt in Immunfluoreszenzfärbungen ein lineares und nach der Behandlung mit sVE-Cadherin^{EC1-5} ein fragmentiertes Muster an den Zellgrenzen (Abbildung 5-13 A).

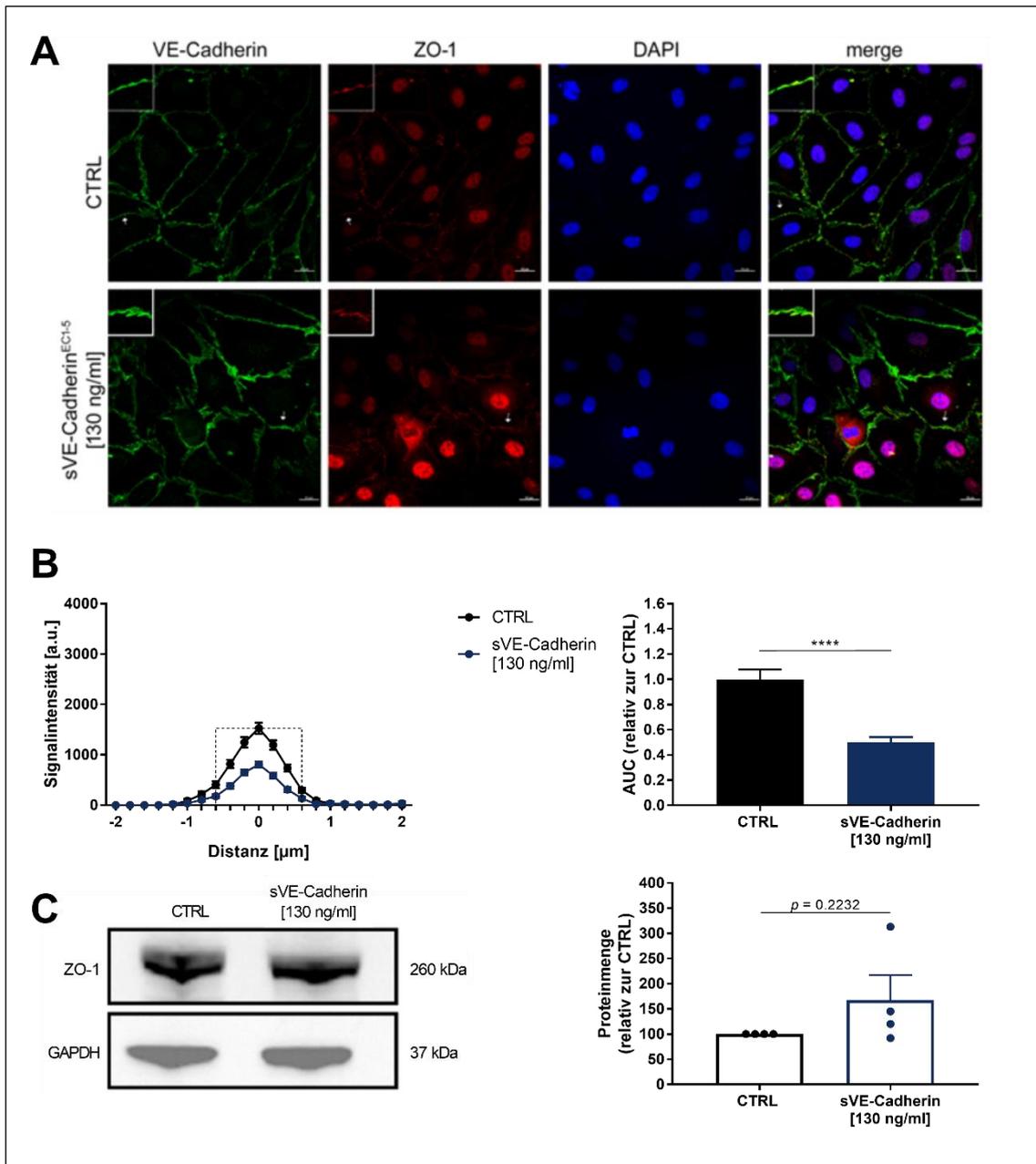


Abbildung 5-13: Analyse des Effekts von sVE-Cadherin auf ZO-1.

A: Immunfluoreszenzfärbung eines HDMEC Zellrasens. Färbung von VE-Cadherin (grün), ZO-1 (rot), DAPI (blau), sowie Darstellung der Fusion (merge; rechts). Kontrollbedingungen, sVE-Cadherin^{EC1-5} [130 ng/ml]. B: Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung. AUC-Berechnung des Kurvenbereiches der Signalintensität zwischen den Distanzen -0,6 und 0,6 μm . C: Western Blot Analyse von ZO-1 unter Kontrollbedingungen und nach sVE-Cadherin^{EC1-5}-Behandlung (links). Quantifizierung der Western Blot Analyse. Darstellung der Proteinmenge relativ zur Kontrolle. Maßstabsbalken entspricht 20 μm . Daten werden als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Statistische Signifikanzen werden anhand des ungepaarten parametrischen Zweistichproben-t-Test mit Sidak-Post-hoc-Test ermittelt. $n \geq 4$. **** zeigt $p < 0,0001$ an.

Gleiches gilt für VE-Cadherin (grün). In dem Fusionsbild (rechts) erkennt man, dass unter Kontrollbedingungen ZO-1 und VE-Cadherin co-lokalisiert sind (gelb), was jedoch unter

sVE-Cadherin^{EC1-5} Behandlung verloren geht. Die Signalintensität zeigt eine Reduktion von ZO-1 nach der Behandlung mit sVE-Cadherin^{EC1-5} (Abbildung 5-13 B). Die AUC-Werte, die von -0,6 bis 0,6 μm berechnet werden, zeigen, dass sich die Kontrollgruppe mit $1,00 \pm 0,0788$ von der sVE-Cadherin^{EC1-5}-Gruppe mit $0,498 \pm 0,0442$ unterscheidet ($p < 0,0001$). Western Blot Analysen zeigen keine Veränderung in der Proteinmenge nach sVE-Cadherin^{EC1-5}-Behandlung ($167,50 \pm 49,69$ relativ zur Kontrolle; $p = 0,223$; Abbildung 5-13 C).

5.2.2.6 N-Cadherin

Um zu untersuchen, ob der Verlust von VE-Cadherin nach der Behandlung mit sVE-Cadherin^{EC1-5} durch N-Cadherin kompensiert wird, wird eine Western Blot Analyse durchgeführt. Diese zeigt keine Veränderung der Proteinmenge von N-Cadherin ($121,7 \pm 16,23$ relativ zur Kontrolle; $p = 0,253$) nach der Behandlung mit sVE-Cadherin^{EC1-5} (Abbildung 5-14).

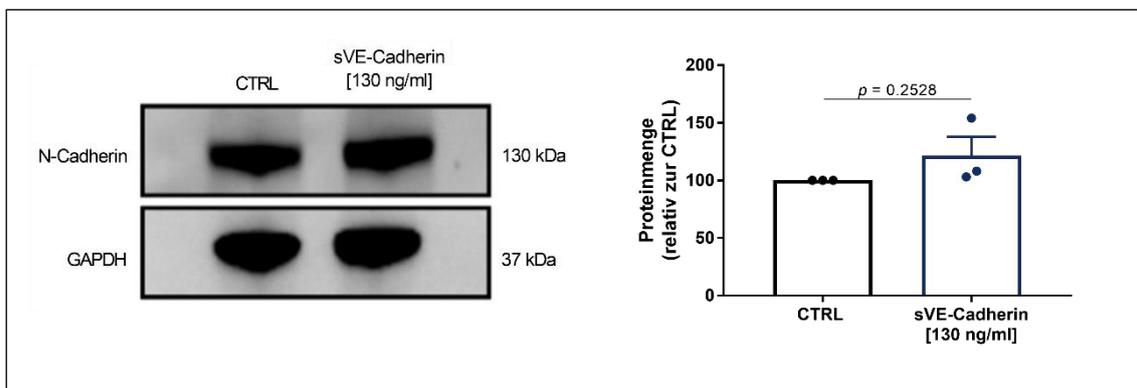


Abbildung 5-14: Analyse des Effekts von sVE-Cadherin^{EC1-5} auf N-Cadherin.

Western Blot Analyse von N-Cadherin unter Kontrollbedingungen und nach sVE-Cadherin^{EC1-5}-Behandlung (links). Quantifizierung der Western Blot Analyse. Darstellung der Proteinmenge relativ zur Kontrolle. Daten werden als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Statistische Signifikanzen werden anhand des ungepaarten parametrischen Zweistichproben-t-Test mit Sidak-Post-hoc-Test ermittelt. $n \geq 3$.

5.2.3 Auswirkungen von sVE-Cadherin^{EC1-5} auf den VE-PTP-Signalweg

VE-PTP ist ein bekannter Regulator der vaskulären Permeabilität und Interaktionspartner von VE-Cadherin (Frye et al., 2015; Nawroth et al., 2002; Nottebaum et al., 2008; Shen et al., 2014). Um zu prüfen, ob die Anwesenheit von sVE-Cadherin^{EC1-5} die Interaktion zwischen VE-Cadherin und VE-PTP stört, wird eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. VE-PTP (rot) zeigt unter Kontrollbedingungen ein lineares Färbemuster an den Zellgrenzen (Abbildung 5-15 A). Nach der Behandlung zeigt dieses ein fragmentiertes

Muster, sowie eine Lückenbildung. In den Fusionsbildern ist die Co-Lokalisation (gelb) von VE-Cadherin (grün) und VE-PTP (rot) zuerkennen. Nach der Behandlung mit sVE-Cadherin^{EC1-5} ist dieses nicht mehr zu erkennen (unten rechts). In Western Blot Analysen zeigt sich eine Reduktion des VE-PTP-Proteinlevels nach der Behandlung mit sVE-Cadherin^{EC1-5} verglichen mit der Kontrollbedingung (Abbildung 5-15 B). Die Werte der Proteinmenge liegen bei $35,5 \pm 7,33$ % relativ zur Kontrolle ($p = 0,0001$).

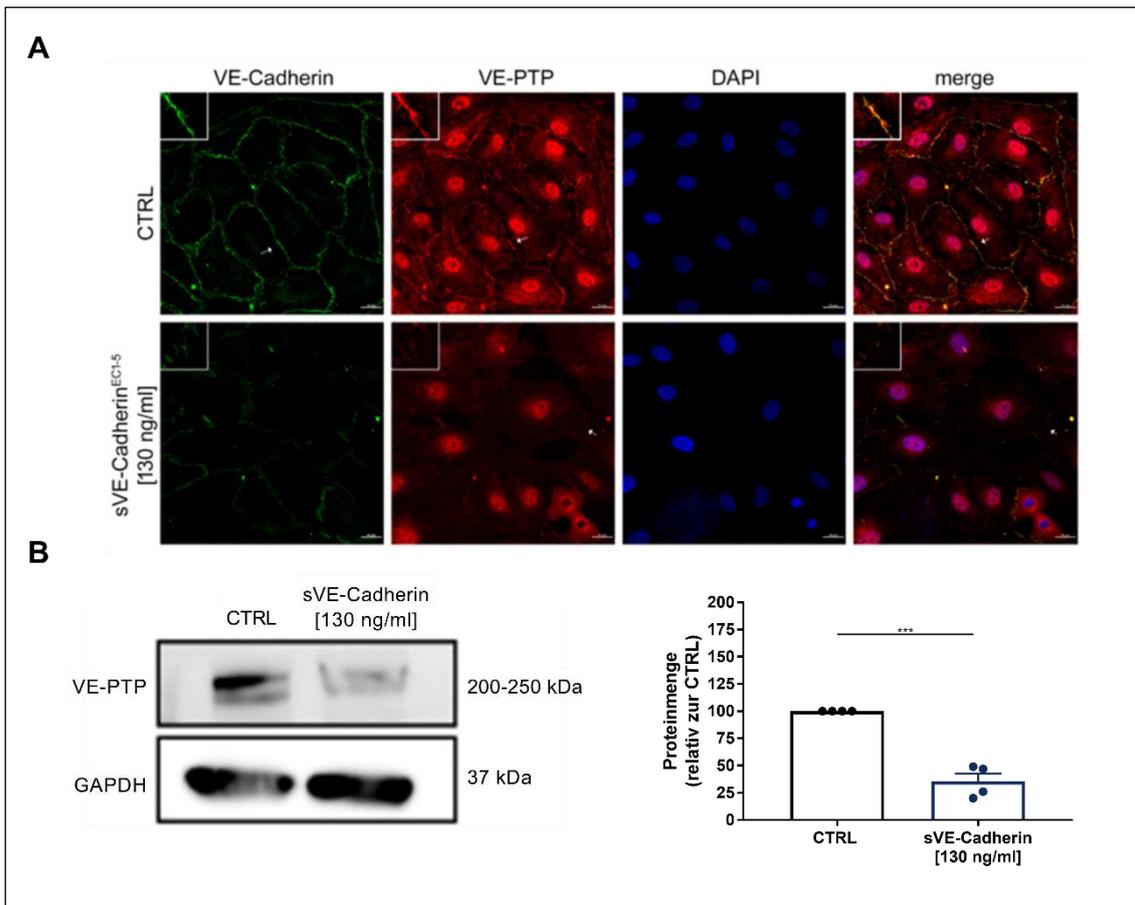


Abbildung 5-15: Analyse des Effekts von sVE-Cadherin^{EC1-5} auf VE-PTP und dessen Interaktion mit VE-Cadherin.

A: Immunfluoreszenzfärbung eines HDMEC Zellrasens. Färbung von VE-Cadherin (grün), VE-PTP (rot), DAPI (blau), sowie Darstellung der Fusion (merge; rechts). Kontrollbedingungen, sVE-Cadherin^{EC1-5} [130 ng/ml]. B: Western Blot Analyse von VE-PTP unter Kontrollbedingungen und nach sVE-Cadherin^{EC1-5}-Behandlung (links). Quantifizierung der Western Blot Analyse. Darstellung der Proteinmenge relativ zur Kontrolle. Maßstabsbalken entspricht 20 μ m. Daten werden als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Statistische Signifikanzen werden anhand des ungepaarten parametrischen Zweistichproben-t-Test mit Sidak-Post-hoc-Test ermittelt. $n \geq 4$. *** zeigt $p < 0,001$ an.

Der Verlust der Interaktion zwischen VE-Cadherin und VE-PTP lässt vermuten, dass die Phosphataseaktivität von VE-PTP im Signalweg involviert ist. Die Benutzung von

AKB9778 (Razuprotafib), welches die katalytische Domäne von VE-PTP pharmakologisch inhibiert, soll helfen, diese Hypothese zu untersuchen. In TER-Messungen werden konfluente HDMEC Monolayer mit sVE-Cadherin^{EC1-5}, AKB9778 oder beiden zusammen behandelt. Durch die Applikation des Inhibitors AKB8778 ist der elektrische Widerstand erhöht verglichen mit der Kontrollgruppe (Abbildung 5-16 A).

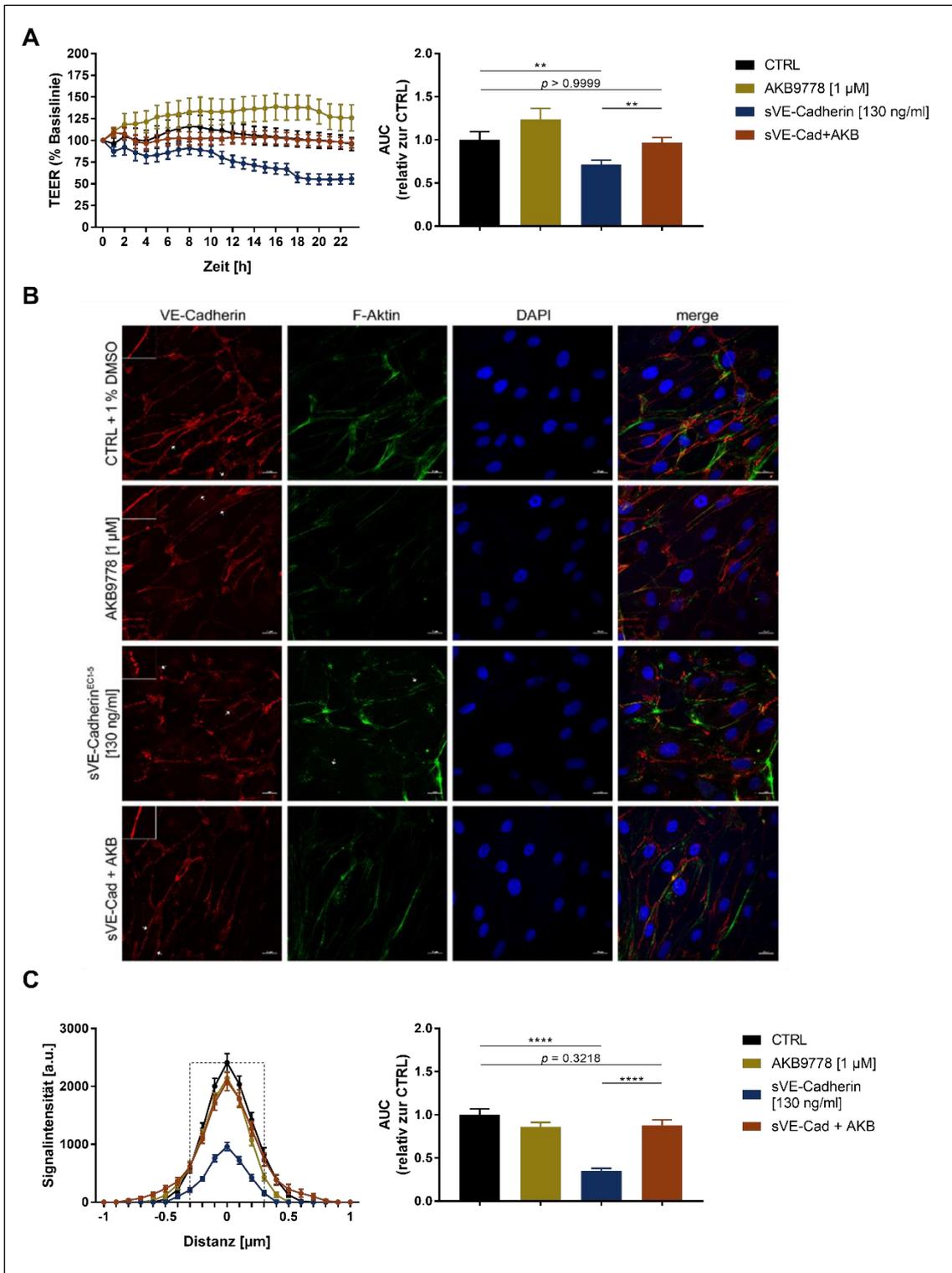


Abbildung 5-16: Analyse des Effekts von sVE-Cadherin^{EC1-5} und AKB9778 auf VE-Cadherin.

A: Transendotheliale Widerstandsmessung über 24 Stunden. Applikation von sVE-Cadherin^{EC1-5} [130 ng/ml], AKB9778 [1 μ M] oder Co-Inkubation (links). AUC der transendothelialen Widerstandsmessung (rechts). B: Immunfluoreszenzfärbung eines HDMEC Zellrasens. Färbung von VE-Cadherin (rot), F-Aktin (grün), DAPI (blau), sowie Darstellung der Fusion (merge; rechts) nach Applikation von sVE-Cadherin^{EC1-5} [130 ng/ml], AKB9778 oder Co-Inkubation. C: Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung. AUC-Berechnung des Kurvenbereiches der Signalintensität zwischen den Distanzen -0,6 und 0,6 μ m. Maßstabsbalken entspricht 20 μ m. Daten werden als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Statistische Signifikanzen werden anhand der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Sidak Post-hoc-Test (IF) oder des Friedman-Test mit Dunn's-Post-hoc-Test (TER) ermittelt. $n \geq 16$. ** zeigt $p < 0,01$ an; **** zeigt $p < 0,0001$ an.

Die AUC-Werte liegen bei der Kontrolle bei $1,00 \pm 0,09527$ und nach AKB9778-Behandlung bei $1,235 \pm 0,130$. Nach der Applikation von sVE-Cadherin^{EC1-5} sinkt der elektrische Widerstand. Der AUC-Wert liegt hier bei $0,718 \pm 0,0477$ ($p = 0,0019$ verglichen mit der Kontrolle). Nach der Co-Inkubation von sVE-Cadherin^{EC1-5} zusammen mit AKB9778 ist der elektrische Widerstand auf dem gleichen Niveau, wie die Kontrollgruppe. Der AUC-Wert beträgt hier $0,968 \pm 0,0594$ ($p > 0,9999$). Bei sVE-Cadherin^{EC1-5} versus sVE-Cadherin^{EC1-5} und AKB9778 liegt der p -Wert bei $p = 0,0049$. Diese funktionellen Messungen zeigen zusammenfassend, dass die Hemmung von VE-PTP durch AKB9778 die Effekte von sVE-Cadherin^{EC1-5} vollständig hemmt.

In Immunfluoreszenzfärbungen von HDMEC Monolayern zeigt VE-Cadherin (rot) unter Kontrollbedingungen (Medium mit 1 % Dimethylsulfoxid (DMSO)) ein lineares Färbemuster und nach der Behandlung mit sVE-Cadherin^{EC1-5} mit 1 % DMSO ein fragmentiertes Färbemuster an den Zellgrenzen (Abbildung 5-16 B). Sowohl nach der Behandlung mit AKB9778 als auch nach der Co-Inkubation von AKB9778 mit sVE-Cadherin^{EC1-5} erkennt man ebenfalls ein lineares Färbemuster. Unter Kontrollbedingungen (Medium mit 1 % DMSO) ist das kortikale Aktin-Zytoskelett (grün) an den Zellgrenzen zu erkennen. Nach der Behandlung mit sVE-Cadherin^{EC1-5} bildet das Aktin-Zytoskelett Stressfasern aus. Diese sind nicht nach der Co-Inkubation von AKB9778 und sVE-Cadherin^{EC1-5} zuerkennen, sowie nach Behandlung mit dem Inhibitor allein. Die Signalintensität zeigt keinen Unterschied zwischen der Kontroll-, der AKB9778- und der Co-Inkubationsgruppe (Abbildung 5-16 C). Jedoch ist die Signalintensität der sVE-Cadherin^{EC1-5}-Gruppe verglichen zu den anderen drei Gruppen reduziert. Die AUC-Werte der Signalintensität betragen für die Kontrollgruppe $1,00 \pm 0,069$, die AKB9778-Gruppe $0,862 \pm 0,0507$, die sVE-Cadherin^{EC1-5}-Gruppe $0,353 \pm 0,0275$ ($p < 0,0001$ verglichen mit der Kontrolle) und

die Co-Inkubationsgruppe $0,879 \pm 0,0630$ ($p = 0,322$ verglichen mit der Kontrolle; $p < 0,0001$ verglichen mit sVE-Cadherin^{EC1-5}).

Als nächstes wird untersucht, ob der Effekt von sVE-Cadherin^{EC1-5} auf α - und β -Catenin ebenfalls durch den VE-PTP Inhibitor AKB9778 aufgehoben wird. Immunfluoreszenzfärbungen von α -Catenin (rot; Abbildung 5-17 A), als auch β -Catenin (rot; Abbildung 5-17 B), zeigen unter Kontrollbedingungen (Medium mit 1 % DMSO) ein lineares Färbemuster an den Zellgrenzen.

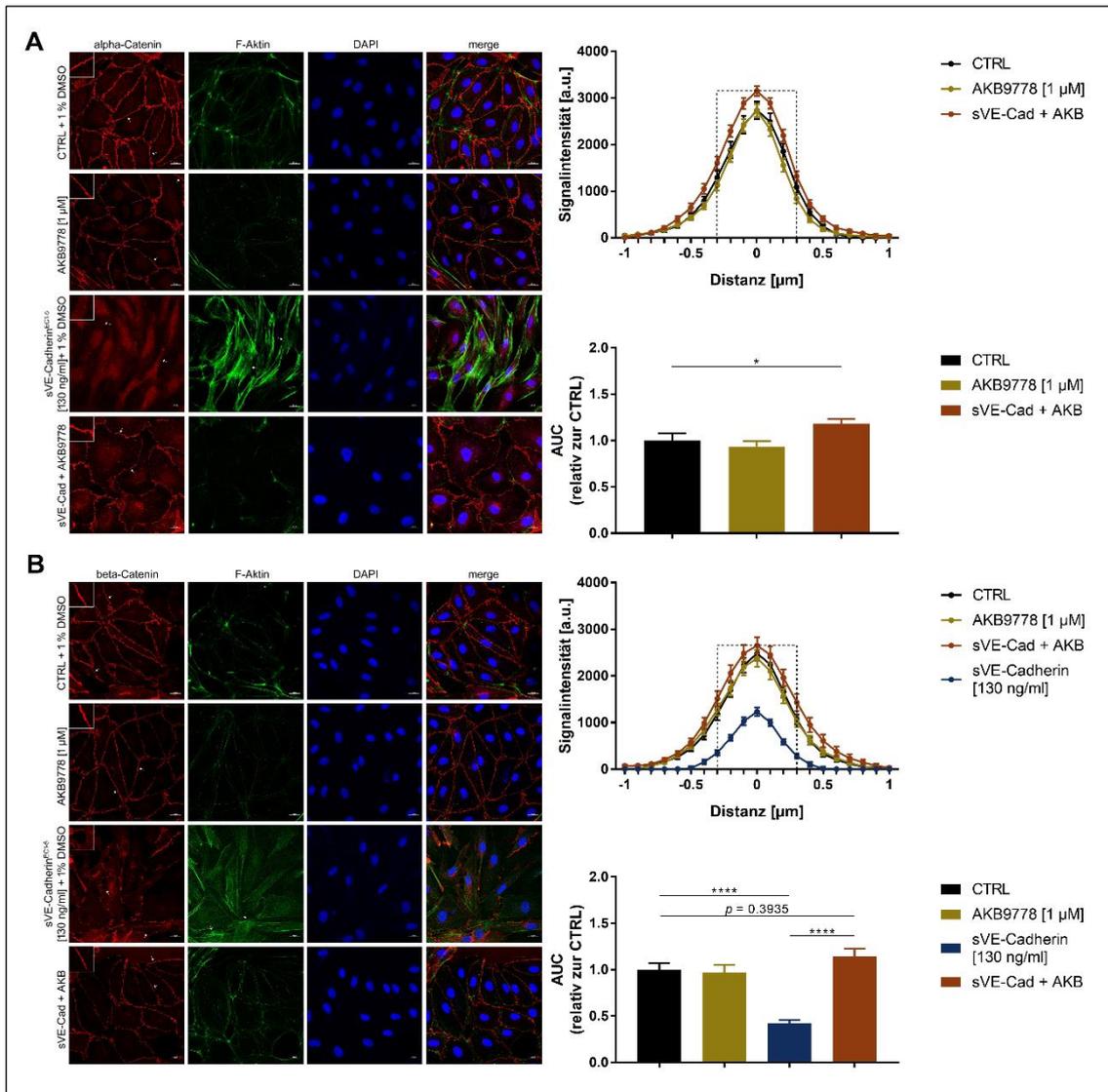


Abbildung 5-17: Analyse des Effekts von sVE-Cadherin^{EC1-5} und AKB9778 auf α - und β -Catenin.

A: Immunfluoreszenzfärbung eines HDMEC Zellrasens. Färbung von α -Catenin (rot), F-Aktin (grün), DAPI (blau), sowie Darstellung der Fusion (merge; rechts) nach Applikation von sVE-Cadherin^{EC1-5} [130 ng/ml], AKB9778 oder Co-Inkubation. Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung. AUC-Berechnung des Kurvenbereiches der Signalintensität zwischen den Distanzen -0,6 und 0,6 μ m. B: Immunfluoreszenzfärbung eines HDMEC Zellrasens. Färbung von β -Catenin (rot), F-Aktin (grün), DAPI (blau), sowie Darstellung der Fusion (merge; rechts) nach Applikation von sVE-Cadherin^{EC1-5} [130 ng/ml], AKB9778 oder

Co-Inkubation. Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung. AUC-Berechnung des Kurvenbereiches der Signalintensität zwischen den Distanzen -0,6 und 0,6 μm . Maßstabsbalken entspricht 20 μm . Daten werden als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Statistische Signifikanzen werden anhand der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Sidak Post-hoc-Test ermittelt. $n \geq 29$. * zeigt $p < 0,05$ an; **** zeigt $p < 0,0001$ an.

Unter dieser Bedingung ist das kortikale Aktin-Zytoskelett (grün) zu erkennen. Nach der Behandlung mit AKB9778 ist ebenfalls bei beiden Proteinen ein lineares Färbemuster an den Zellgrenzen zuerkennen, sowie das kortikale Aktin-Zytoskelett. Nach der Behandlung mit sVE-Cadherin^{EC1-5} und 1 % DMSO ist kein lineares Muster von α -Catenin an den Zellgrenzen erkennbar. Die Färbung des Proteins ist diffus im Zytoplasma verteilt. Bei den Immunfluoreszenzfärbungen von β -Catenin unter dieser Bedingung ist ein fragmentiertes Muster an den Zellgrenzen zu erkennen, sowie eine Lückenbildung im HDMEC Monolayer. Ebenfalls bildet das Aktin-Zytoskelett bei beiden Experimenten Stressfasern aus. Nach der Co-Inkubation von AKB9778 und sVE-Cadherin^{EC1-5} zeigen beide Protein-Anfärbungen ein lineares Muster an den Zellgrenzen und das kortikale Aktin-Zytoskelett ist zu erkennen. Der AUC-Wert der Signalintensität von α -Catenin beträgt in der Kontrollgruppe $1,00 \pm 0,0765$, der AKB9778-Gruppe $0,936 \pm 0,0572$ und für die Co-Inkubationsgruppe $1,182 \pm 0,0487$ ($p = 0,0169$ verglichen mit der Kontrolle). Der AUC-Wert der Signalintensität für β -Catenin beträgt in der Kontrollgruppe $1,00 \pm 0,690$, der AKB9778-Gruppe $0,973 \pm 0,0815$, der sVE-Cadherin^{EC1-5}-Gruppe $0,425 \pm 0,0341$ ($p < 0,0001$) und für die Co-Inkubationsgruppe $1,143 \pm 0,0848$ ($p = 0,394$ verglichen mit der Kontrolle; $p < 0,0001$ verglichen mit sVE-Cadherin^{EC1-5}).

5.2.4 Signalweg der sVE-Cadherin^{EC1-5}-Effekte

In der Literatur wird gezeigt, dass über die Tie-2-Aktivierung der Barriere-stabilisierende Effekt von AKB9778 vermittelt wird. Deshalb wird untersucht, ob die direkte Tie-2-Aktivierung, die durch Angiopoetin-1 (Ang-1) vermittelt wird, den sVE-Cadherin^{EC1-5}-Effekt aufhebt. Die TER-Messungen eines HDMEC-Monolayers ergeben, dass nach der Gabe von Ang-1 der elektrische Widerstand auf dem Niveau der Kontrollgruppe bleibt (Abbildung 5-18 A). In zuvor durchgeführten Dosis-Wirkungsanalysen führten auch höhere Dosen nicht zu einer Erhöhung der TER, sodass davon ausgegangen werden muss, dass die Kontrollen eine dichte Barriere aufweisen, die unter diesen experimentellen Bedingungen durch Ang-1 nicht weiter stabilisierbar ist.

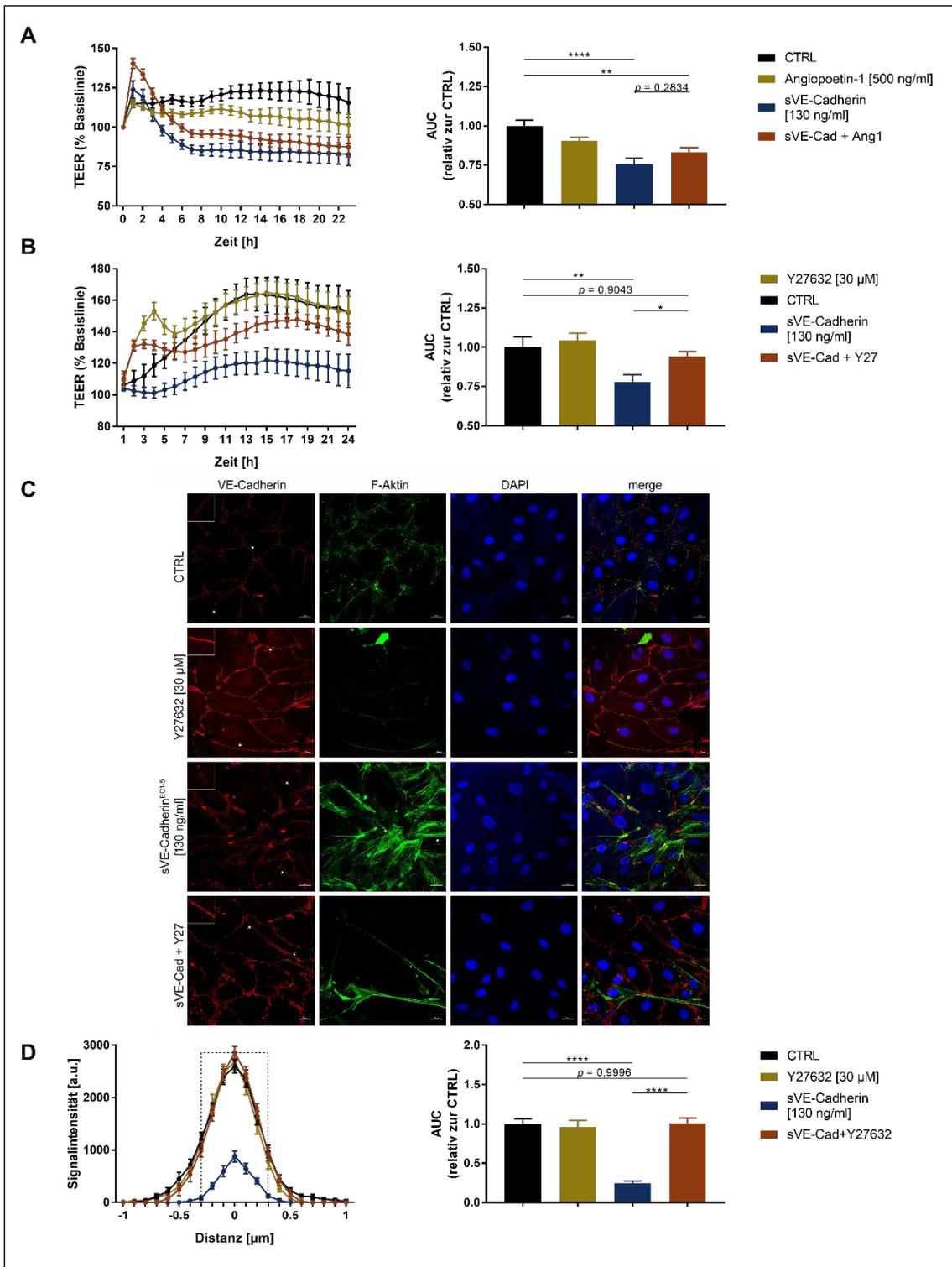


Abbildung 5-18: Analyse des Effekts von sVE-Cadherin^{EC1-5} und Ang-1 sowie Y27632 auf VE-Cadherin. A: Transendotheliale Widerstandsmessung über 24 Stunden. Applikation von sVE-Cadherin^{EC1-5} [130 ng/ml], Ang-1 [500 ng/ml], Co-Inkubation (links). AUC der transendotheliale Widerstandsmessung (rechts). B: Transendotheliale Widerstandsmessung über 24 Stunden. Applikation von sVE-Cadherin^{EC1-5} [130 ng/ml], Y27632 [30 μ M], Co-Inkubation (links). AUC der transendotheliale Widerstandsmessung (rechts). C: Immunfluoreszenzfärbung eines HDMEC Zellrasens. Färbung von VE-Cadherin (rot), F-Aktin

(grün), DAPI (blau), sowie Darstellung der Fusion (merge; rechts). Kontrollbedingungen, sVE-Cadherin^{EC1-5} [130 ng/ml], Y27632 [30 µM], Co-Inkubationsgruppe. C: Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung. AUC-Berechnung des Kurvenbereiches der Signalintensität zwischen den Distanzen -0,3 und 0,3 µm. Maßstabsbalken entspricht 20 µm. Daten werden als Mittelwert ± SEM gezeigt. Statistische Signifikanzen werden anhand der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Sidak Post-hoc-Test ermittelt. n ≥ 12. * zeigt $p < 0,05$ an; ** zeigt $p < 0,001$ an; **** zeigt $p < 0,0001$ an.

Die Applikation von sVE-Cadherin^{EC1-5} ergibt eine Reduktion des elektrischen Widerstandes und die Co-Applikation von sVE-Cadherin^{EC1-5} und Ang-1 ergibt ebenfalls eine Reduktion des elektrischen Widerstandes zu der Kontrollgruppe. Der AUC-Wert für die Kontrollgruppe beträgt $1,00 \pm 0,0368$ und für die Ang-1-Gruppe $0,905 \pm 0,02414$, für die sVE-Cadherin^{EC1-5}-Gruppe $0,757 \pm 0,0378$ ($p < 0,0001$) und für die sVE-Cadherin^{EC1-5} und Ang-1-Gruppe $0,833 \pm 0,0286$ ($p = 0,0018$ verglichen mit der Kontrolle; $p = 0,2834$ verglichen mit sVE-Cadherin^{EC1-5}). Daraus ergibt sich, dass die direkte Tie-2-Aktivierung nicht den Zusammenbruch der Endothelbarriere zu stabilisieren vermag, der durch sVE-Cadherin^{EC1-5} verursacht wird und andere Mechanismen im Vordergrund stehen.

Die Stressfaserbildung im Aktin-Zytoskelett nach der Behandlung mit sVE-Cadherin^{EC1-5} führt zu der Hypothese, dass RhoA und somit nachgeschaltet der Rho-Kinase-Signalweg eine wichtige Rolle in dem sVE-Cadherin^{EC1-5}-Signalweg spielen könnte. Zur Testung dieser Annahme wird der Rho-Kinase Inhibitor Y27632 verwendet. Es werden TER-Messungen über einen konfluenten HDMEC-Monolayer durchgeführt. Nach der Applikation von Y27632 ist der elektrische Widerstand auf dem gleichen Niveau wie unter Kontrollbedingungen (Abbildung 5-18 B). Nach der Behandlung mit sVE-Cadherin^{EC1-5} ist eine Reduktion des elektrischen Widerstandes verglichen zur Kontrollgruppe zu erkennen, jedoch nicht nach der Co-Inkubation mit Y27632. Die AUC-Werte liegen bei der Kontrolle bei $1,00 \pm 0,0654$, bei Y27632 bei $1,043 \pm 0,0459$ ($p = 0,904$), bei sVE-Cadherin^{EC1-5} bei $0,781 \pm 0,0436$ ($p = 0,0071$) und bei Y27632 und sVE-Cadherin^{EC1-5} bei $0,939 \pm 0,0333$ ($p = 0,0362$ verglichen mit sVE-Cadherin^{EC1-5}).

In Immunfluoreszenzfärbungen von konfluenten HDMEC-Monolayern sieht man, dass VE-Cadherin (rot) unter Kontrollbedingungen an den Zellgrenzen ein lineares Färbemuster zeigt (Abbildung 5-18 C), sowie ein intaktes kortikales Aktin-Zytoskelett (grün) erkennbar ist. Die Applikation des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632 zeigt mikroskopisch keine Veränderungen verglichen zur Kontrollgruppe, anders jedoch nach der Applikation von sVE-Cadherin^{EC1-5}, welches ein fragmentiertes Färbemuster VE-Cadherins (rot), sowie die Stressfasernausbildung (grün) zeigt. Die Co-Inkubation von Y27632 und sVE-

Cadherin^{EC1-5} verhindert die mikroskopischen Veränderungen von VE-Cadherin, zu sehen am intakten linearen Färbemuster der Zellgrenzen, sowie den fehlenden Stressfasern des Aktin-Zytoskeletts. Die AUC-Werte der Signalintensität von VE-Cadherin an den Zellgrenzen, die von -0,3 bis 0,3 μm gemessen werden, betragen für die Kontrollgruppe $1,00 \pm 0,0659$, für die AKB9778-Gruppe $0,961 \pm 0,0811$, für sVE-Cadherin^{EC1-5} $0,246 \pm 0,0295$ und für die Co-Inkubation $1,009 \pm 0,0664$ (Abbildung 5-18 D). Zwischen der Kontrolle und sVE-Cadherin^{EC1-5}-Gruppe besteht ein Unterschied von $p < 0,0001$ und zwischen sVE-Cadherin^{EC1-5} und der Co-Inkubation ebenfalls ein Unterschied mit einem Wert von $p < 0,0001$. Die Co-Inkubation versus Kontrolle hat keinen Unterschied. Der p -Wert beträgt hier $p = 0,9996$.

Ein Regulator des RhoA-Proteins und des damit verbundenen ROCK-Signalweges ist GEF-H1. Mittels Western Blot Analyse wird untersucht, ob GEF-H1 und somit auch RhoA im sVE-Cadherin^{EC1-5}-Signalweg involviert sind. Abbildung 5-19 zeigt unter sVE-Cadherin^{EC1-5}-Behandlung eine Erhöhung der GEF-H1-Proteinmenge um $43,33 \pm 6,69 \%$ verglichen mit der Kontrollgruppe ($p = 0,0029$; Abbildung 5-19).

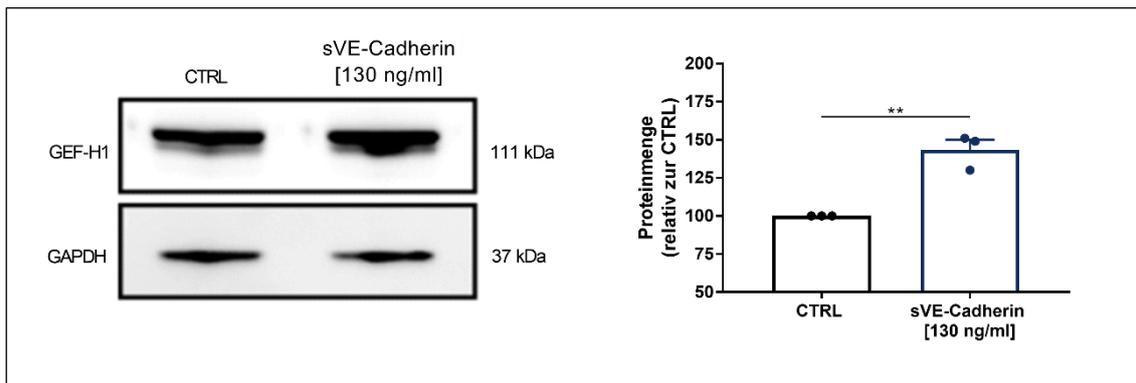


Abbildung 5-19: Analyse des Effekts von sVE-Cadherin^{EC1-5} auf GEF-H1.

Western Blot Analyse von GEF-H1 unter Kontrollbedingungen und nach sVE-Cadherin^{EC1-5}-Behandlung (links). Quantifizierung der Western Blot Analyse. Darstellung der Proteinmenge relativ zur Kontrolle. Daten werden als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Statistische Signifikanzen werden anhand des ungepaarten parametrischen Zweistichproben-t-Test ermittelt. $n \geq 3$. ** zeigt $p < 0,01$ an.

5.3 Klonierung von EC1-4 und EC3-5 in den Vektor pcDNA-pDEST47

5.3.1 EC1-4

Um die Hypothese zu testen, ob der Effekt von sVE-Cadherin^{EC1-5} durch die extrazelluläre Domäne 5 vermittelt wird, werden zwei zusätzliche Konstrukte hergestellt. Eines enthält die extrazelluläre Domäne 5 (EC3-5), das andere enthält diese nicht (EC1-4). Als erstes wird die Kodier-Sequenz von den beiden Konstrukten amplifiziert.

Für das Konstrukt, welches nur die EC1-4 Domänen enthält, wird das bereits existierende Konstrukt pcDNA-pDEST47_EC1-5 als Template, sowie die Primer EC1-4_attB1_F1 und EC1-4_attB2_AgeI_R1 verwendet. Die Annealing-Temperatur beträgt 63,3°C und die Extensionszeit beträgt 45 Sekunden. Das erwartete aufgereinigte Produkt hat eine Größe von 1131 bp (Abbildung 5-20).



Abbildung 5-20: Amplifikation der kodierenden Sequenz von sVE-Cadherin^{EC1-4}.

Der kodierende Bereich wird mit den Primern EC1-4_attB1_F1 und EC1-4_attB2_AgeI_R1 aus pcDNA-pDEST47_EC1-5 unter Verwendung der Phusion-Polymerase in einer PCR mit 30 Zyklen amplifiziert. Die Annealing-Temperatur beträgt 63,3°C und die Extensionszeit 45 Sekunden. Die Auftrennung des aufgereinigten PCR-Produktes auf einem 1,5 % Agarosegel zeigt die spezifische Bande der erwarteten Länge von 1131 bp in Spur 1. Spur M ist die 1 kb DNA-Leiter.

Anschließend wird die BP-Rekombinationsreaktion durchgeführt. Diese Reaktion rekombiniert das EC1-4 Insert in den pDONR-Vektor. Man erhält den Entry Clone. DH5 α -Zellen werden mit dem Produkt der BP-Rekombinationsreaktion transformiert. Die Bakterienkolonien werden auf eine LB-Agarplatte mit 20 μ g/ml Kanamycin überführt und zeitgleich eine Verifizierungs-PCR durchgeführt, um zu überprüfen, ob das gewünschte Insert vorhanden und sich in der richtigen Orientierung im pDONR-Vektor befindet.

Hierfür werden die M13 Primer des pDONR-Vektors verwendet. Die PCR wird bei einer Annealing-Temperatur von 55°C und einer Extensionszeit von 150 Sekunden durchgeführt. Die erwartete Bande hat eine Größe von 1686 bp. Diese sind bei Kolonie #3 und #5 erkennbar (Abbildung 5-21).

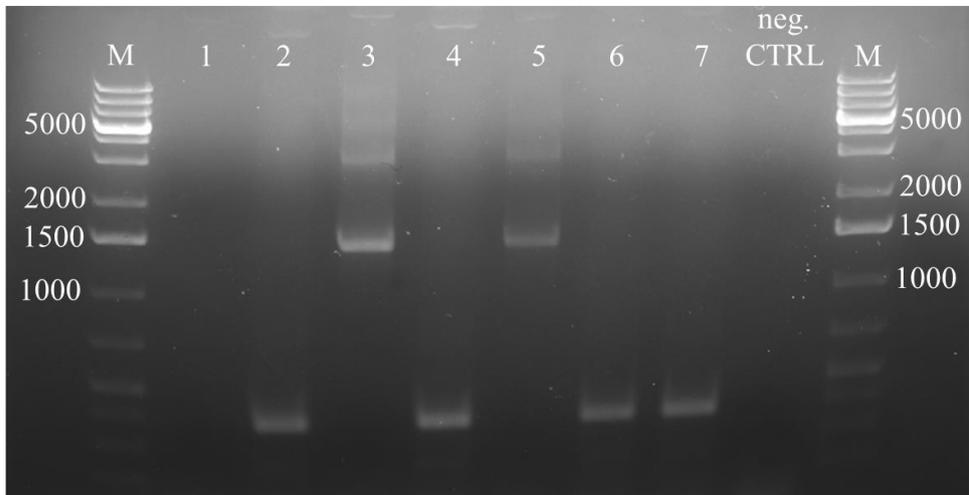
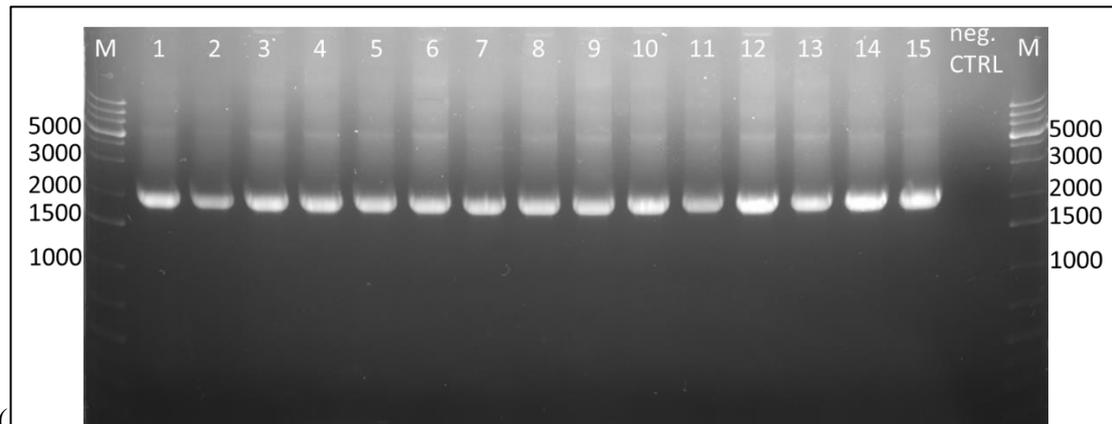


Abbildung 5-21: Nachweis der Integration von sVE-Cadherin^{EC1-4} in den pDONR-Vektor.

Verifizierungs-PCR zur Überprüfung des hergestellten Konstrukts unter Verwendung der Taq-Polymerase. Die PCR wird mit den Primern pDONR-M13_fw und pDONR-M13_rev in 30 Zyklen durchgeführt. Die Annealing-Temperatur beträgt 55°C und die Extensionszeit 150 Sekunden. Die Auftrennung des PCR-Produktes auf einem 1,5 % Agarosegel zeigt die spezifische Bande der erwarteten Länge von 1686 bp in Spur 3 und 5. Spur M ist die 1 kb DNA-Leiter.

Nach der Plasmid-Isolierung der beiden Klone #3 und #5 wird die LR-Rekombinationsreaktion durchgeführt. Diese Reaktion rekombiniert das Insert von dem pDONR_EC1-4 Konstrukt in den pcDNA-pDEST-47-Vektor. Es entsteht der Expression Clone. DH5 α -Zellen werden mit dem LR-Rekombinationsreaktionsprodukt transformiert. Zur Kontrolle der Insertorientierung im Vektor wird erneut die Verifizierungs-PCR durchgeführt hierfür werden die M13 Primer und als Template die gewachsenen Bakterien Kolonien verwendet. Die Extensionszeit beträgt 135 Sekunden und die Annealing-Temperatur

55,8°C. Die erwartete Bande hat eine Größe von 2017 bp und ist bei allen Kolonien erkennbar



(Abbildung 5-22).

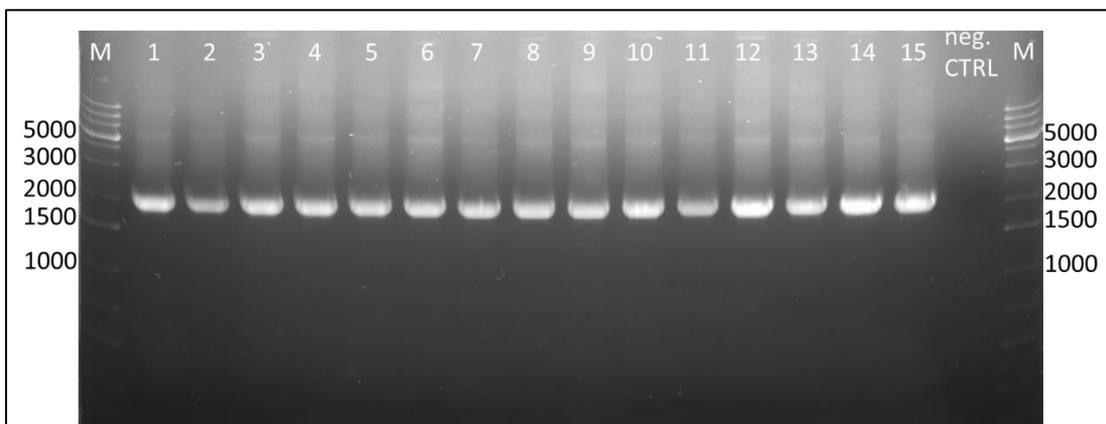


Abbildung 5-22: Nachweis der Integration von sVE-Cadherin^{EC1-4} in den pcDNA-pDEST-47 Vektor. Verifizierungs-PCR zur Überprüfung des hergestellten Konstrukts unter Verwendung der Taq-Polymerase. Die PCR wurde mit den Primern pcDNA-pDEST-47-M13_fw und pcDNA-pDEST-47-M13_rev in 30 Zyklen durchgeführt. Die Annealing-Temperatur beträgt 55,8°C und die Extensionszeit 135 Sekunden. Die Auftrennung des PCR-Produktes auf einem 1,5 % Agarosegel zeigt die spezifische Bande der erwarteten Länge von 2017 bp in den Spuren 1-15. Spur M ist die 1 kb DNA-Leiter.

Anschließend wird das isolierte Plasmid der Klone #3 und #5 sequenziert (Eurofins Genomics). Es werden die M13 Primer des pcDNA-pDEST-47-Vektors verwendet. Die Sequenzierung zeigt, dass sowohl EC1-4 als auch EC3-5 in der richtigen Orientierung in den pcDNA-pDEST-47-Vektor kloniert sind. Die vier obigen Pfeile in Abbildung 5-23 zeigen die übereinstimmenden Sequenzen (rot), sowie die fehlenden Domänen (durchsichtig). Die ersten beiden Pfeile beziehen sich auf EC1-4. Pfeil 3 und 4 beziehen sich auf EC3-5. Man erkennt, dass, wie gewünscht, in dem Konstrukt pcDNA-pDEST-47_EC1-4

die Domäne 5 fehlt und in Konstrukt pcDNA-pDEST-47_EC3-5 die Domänen 1 und 2 (Abbildung 5-23).

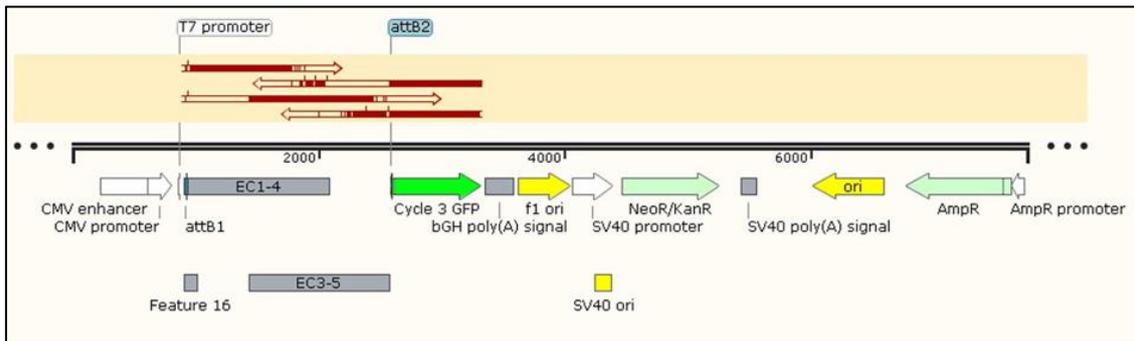


Abbildung 5-23: Sequenzier Ergebnisse von pcDNA-pDEST-47_EC1-4 und pcDNA-pDEST-47_EC3-5. Sequenzier Ergebnisse der Konstrukte von pcDNA-pDEST-47_EC1-4 und pcDNA-pDEST-47_EC3-5 von Eurofins Genomics. Es wurden jeweils die Primer M13_fw und M13_rev verwendet. Die oberen beiden Pfeile zeigen in rot die übereinstimmende Sequenz an, der durchsichtige Teil des Pfeils die fehlende EC5. Die unteren beiden Pfeile zeigen in rot die übereinstimmende Sequenz an, der durchsichtige Teil des Pfeiles die fehlenden EC1 und 2.

5.3.2 EC3-5

Zeitgleich wird das Konstrukt EC3-5 kloniert. Im ersten Schritt wird dieses amplifiziert. Hierfür wird das bereits existierende Konstrukt pcDNA-pDEST47_EC1-5 als Template, sowie die Primer EC3-5_attB1_K_F1 und EC3-5_attB2_AgeI_R3 verwendet. Die Anneling-Temperatur beträgt 64°C und die Extensionzeit beträgt 45 Sekunden. Das erwartete aufgereinigte Produkt hat eine Größe von 1230 bp (Abbildung 5-24).

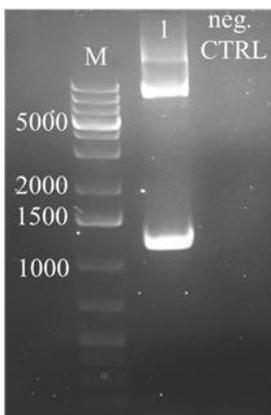


Abbildung 5-24: Amplifikation der kodierenden Sequenz von sVE-Cadherin^{EC3-5}.

Der kodierende Bereich wurde mit den Primern EC3-5_attB1_K_F1 und EC3-5_attB2_AgeI_R3 aus pcDNA-pDEST47_EC1-5 unter Verwendung der Phusion-Polymerase in einer PCR mit 30 Zyklen amplifiziert. Die Anneling-Temperatur beträgt 64°C und die Extensionszeit 45 Sekunden. Die Auftrennung des aufgereinigten PCR-Produktes auf einem 1,5 % Agarosegel zeigt die spezifische Bande der erwarteten Länge von 1230 bp in Spur 1. Spur M ist die 1 kb DNA-Leiter.

Das PCR-Amplifikat wird durch die BP-Rekombinationsreaktion in den pDONR-Vektor rekombiniert. DH5 α -Zellen werden mit dem Rekombinationsprodukt transformiert. Der Transformationsansatz wird auf LB-Platten mit 20 μ g/ml Kanamycin ausgestrichen. Die gewachsenen Bakterienkolonien werden auf eine LB-Agarplatte mit Kanamycin überführt und zeitgleich eine Verifizierungs-PCR durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich das gewünschte Insert in der richtigen Orientierung im pDONR-Vektor befindet. Hierfür werden die M13 Primer verwendet und die PCR bei einer Annealing-Temperatur von 49°C und einer Extensionszeit von 100 Sekunden durchgeführt. Die erwartete Bande hat eine Größe von 1465 bp. Diese sind bei allen Kolonien erkennbar (Abbildung 5-25).

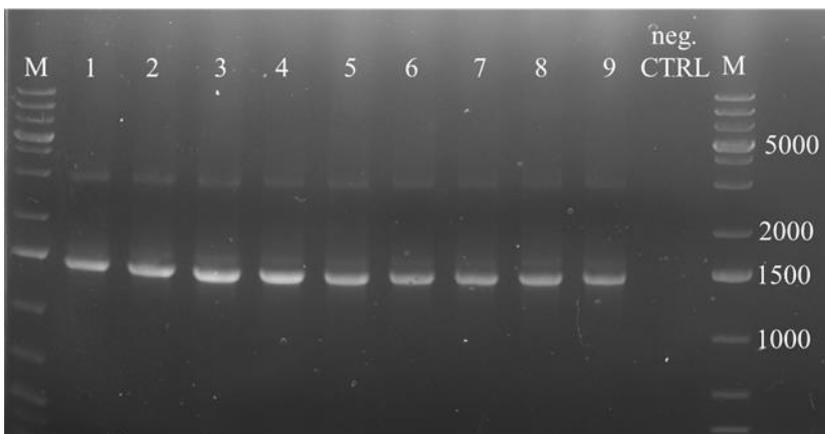


Abbildung 5-25: Nachweis der Integration von sVE-Cadherin^{EC3-5} in den pDONR Vektor.

Verifizierungs-PCR zur Überprüfung des hergestellten Konstrukts unter Verwendung der Taq-Polymerase. Die PCR wurde mit den Primern pDONR-M13_fw und pDONR-M13_rev in 30 Zyklen durchgeführt. Die Annealing-Temperatur beträgt 49°C und die Extensionszeit 100 Sekunden. Die Auftrennung des PCR-Produktes auf einem 1,5 % Agarosegel zeigt die spezifische Bande der erwarteten Länge von 1465 bp in Spur 1 bis 9. Spur M ist die 1 kb DNA-Leiter.

Anschließend wird eine Plasmidisolierung der Klone #2 und #8 durchgeführt. DH5 α -Zellen werden mit dem Produkt der LR-Rekombinationsreaktion, welche den pDONR-Vektor durch den pcDNA-pDEST-Vektor ersetzt, transformiert. Um die erfolgreiche Klonierung zu bestätigen, wird eine Verifizierungs-PCR durchgeführt. Die gewachsenen Kolonien werden als Template verwendet. Für die PCR werden die M13 Primer verwendet, sowie eine Annealing-Temperatur von 55,8°C und Extensionszeit von zwei Minuten. Die erwartete Bande hat eine Größe von 2046 bp (Abbildung 5-26). Diese war bei allen Kolonien vorhanden. Zusätzlich zur Überprüfung via PCR wurde der Klon #6 sequenziert (Abbildung 5-23).

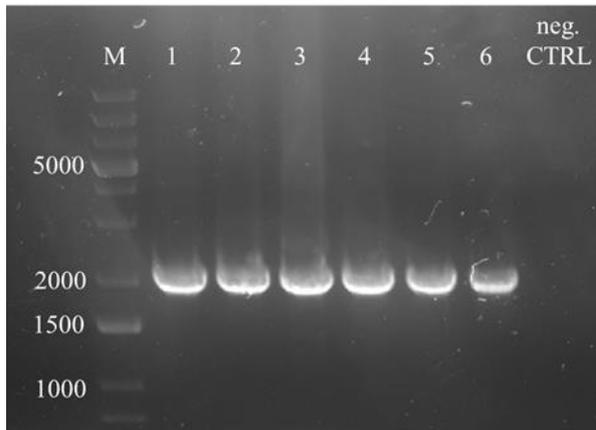


Abbildung 5-26: Nachweis der Integration von sVE-Cadherin^{EC3-5} in den pcDNA-pDEST-47-Vektor. Verifizierungs-PCR zur Überprüfung des hergestellten Konstrukts unter Verwendung der Taq-Polymerase. Die PCR wird mit den Primern pcDNA-pDEST-47-M13_fw und pcDNA-pDEST-47-M13_rev in 30 Zyklen durchgeführt. Die Annealing-Temperatur beträgt 55,8°C und die Extensionszeit 120 Sekunden. Die Auftrennung des PCR-Produktes auf einem 1,5 % Agarosegel zeigt die spezifische Bande der erwarteten Länge von 2046 bp in Spur 1 bis 6. Spur M ist die 1 kb DNA-Leiter

Da der VE-Cadherin ELISA die Konstrukte nicht detektieren kann, wird folgender Prozess zur Aufkonzentrierung und Aufreinigung der Proteine aus dem Überstand von CHO-Zellen durchgeführt. CHO-Zellen werden auf eine 6-Well Platte ausgesät und am nächsten Tag mit dem Plasmid der Konstrukte transfiziert. Diese werden kultiviert, bis ein konfluenter Monolayer gewachsen ist und anschließend in eine T75 Flasche überführt. Die Kultivierung findet ab diesem Zeitpunkt mit Antibiotika statt. Nachdem die Zellen in der Flasche konfluent sind, wird der Überstand verworfen und 10 ml Fetales Kälberserum (FCS) freies Medium hinzugegeben. Dies wird zehn Tage inkubiert und anschließend der Überstand abgenommen und mit Protease Inhibitor versetzt. Vier 10 ml Überstände werden mittels VivaSpin Turbo Säulen aufkonzentriert und via Ammoniumsulfat Präzipitation aufgereinigt, dies wird bei einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 60 % durchgeführt. Da die Konzentration des aufgereinigten und aufkonzentrierten Proteins weder mit dem VE-Cadherin ELISA noch BCA zuverlässig gemessen werden kann, werden die Konstrukte in einen neuen Vektor kloniert. Der pcDNATM 6/myc-His-B-Vektor hat die Vorteile, dass es eine Blastocidin Resistenz-Kassette enthält, die die Antibiotika Resistenz vermittelt, sowie einen His-Tag, der die Aufreinigung des Proteins erleichtert.

5.4 Klonierung von EC1-4 in den pcDNATM 6/myc-His-B-Vektor

Zuerst werden die Domänen EC1-4 aus dem pcDNA-pDEST47_EC1-5 amplifiziert. Hierfür werden die Primer EC1-4_C12_fw und EC1-4_C12_rev verwendet, mit diesen

werden die zwei Schnittstellen Xho1 und BamH1 hinzugefügt. Die Amplifikations-PCR wird bei einer Annealing-Temperatur von 56,7°C und einer Extensionszeit von 36 Sekunden durchgeführt. Das PCR-Produkt wird aufgereinigt und zur Auftrennung auf ein 1,5 %-Agarosegel aufgetragen. Das erwartete Produkt hat eine Länge von 1172 bp. In Spur 2 ist eine Bande zwischen 1000 und 1500 bp erkennbar. Spur M zeigt die 1 kb DNA-Leiter (Abbildung 5-27).

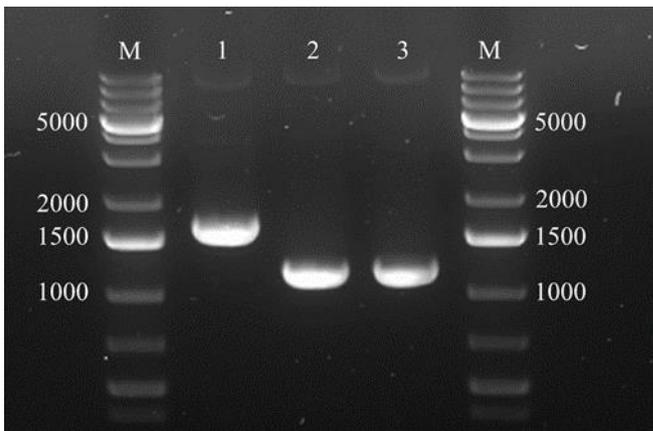


Abbildung 5-27: Amplifikation der kodierenden Sequenz von sVE-Cadherin^{EC1-4}.

Der kodierende Bereich wird mit den Primern EC1-4_C12_fw und EC1-4_C12_rev aus pcDNA-pDEST47_EC1-5 unter Verwendung der Phusion-Polymerase in einer PCR mit 30 Zyklen amplifiziert. Die Annealing-Temperatur beträgt 56,7°C und die Extensionszeit 36 Sekunden. Die Auftrennung des aufgereinigten PCR-Produktes auf einem 1,5 %-Agarosegel zeigt die spezifische Bande der erwarteten Länge von 1172 bp in Spur 2. Spur M ist die 1 kb DNA-Leiter. Spur 1 und 3 zeigen die aufgereinigten PCR-Produkte von EC1-5 und EC3-5, diese wurden jedoch nicht weiterverwendet.

Sowohl das PCR-Produkt als auch der Vektor wird mit den Restriktionsenzymen Xho1 und BamH1 geschnitten und danach aufgereinigt. Anschließend wird das Insert (EC1-4) und der Vektor (pcDNATM 6/myc-His B) in einer Ligation zusammengefügt und in DH5 α -Zellen transformiert. Mit den daraus resultierenden Bakterienkolonien wird eine Verifizierungs-PCR unter Verwendung der T7_fw und BGH_rev Primer durchgeführt. Diese PCR wird bei einer Annealing-Temperatur von 50,9°C und einer Extensionszeit von 82 Sekunden durchgeführt. Das erwartete Produkt hat eine Länge von 1357 bp, zu sehen in Spur 3 (Abbildung 5-28).

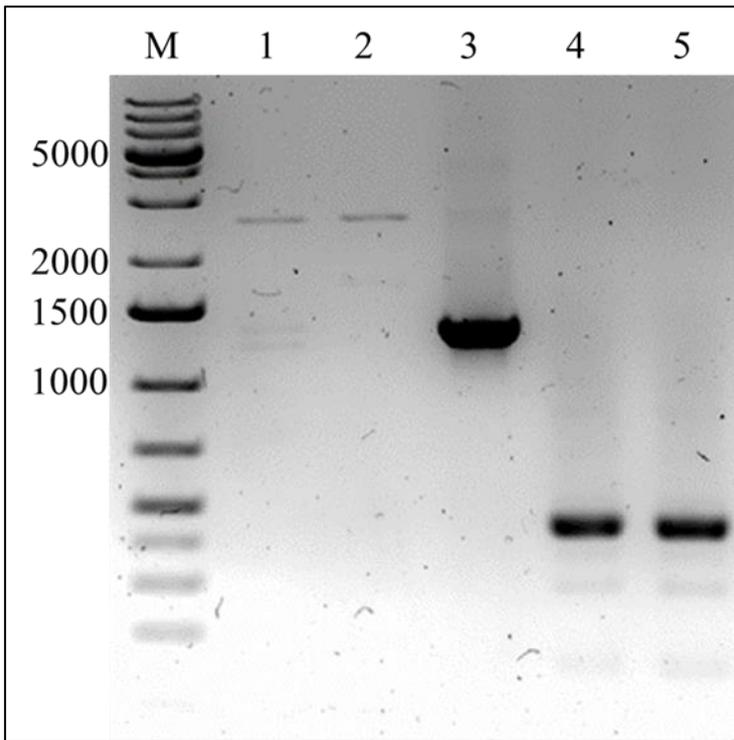


Abbildung 5-28: Nachweis der Integration von sVE-Cadherin^{EC1-4} in den pcDNATM 6/myc-His-B-Vektor. Verifizierungs-PCR zur Überprüfung des hergestellten Konstrukts unter Verwendung der Taq-Polymerase. Die PCR wird mit den Primern T7_fw und BGH_rev in 30 Zyklen durchgeführt. Die Annealing-Temperatur beträgt 50,9°C und die Extensionszeit 82 Sekunden. Die Auftrennung des PCR-Produktes auf einem 1,5 % Agarosegel zeigt die spezifische Bande der erwarteten Länge von 1357 bp in Spur 3. Spur M ist die 1 kb DNA-Leiter.

Zusätzlich zur Überprüfung via PCR wird der Klon aus Spur 3 nach Plasmidisolierung von Eurofins Genomics sequenziert. Es werden die Primer T7_fw und BGH_rev verwendet. Die roten Pfeile zeigen die aus der Sequenzierung resultierende Sequenz an, der graue Balken die Originalsequenz der extrazellulären Domäne von VE-Cadherin und der lila Balken die gewünschte Sequenz der Domänen EC1-4 an. Der durchsichtige Teil der Pfeile zeigt das Fehlen der extrazellulären Domäne 5 (Abbildung 5-29).

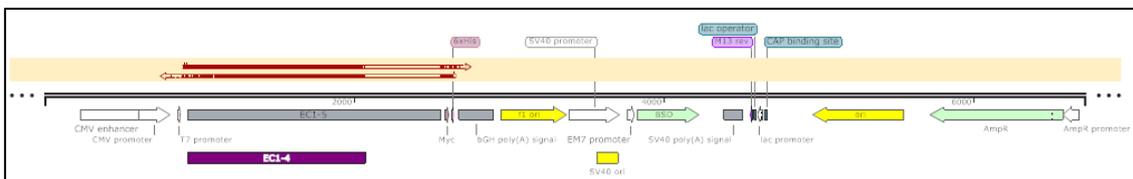


Abbildung 5-29: Sequenzier Ergebnisse von pcDNATM 6/myc-His B_EC1-4.

Sequenzier-Ergebnisse des Konstrukts pcDNATM 6/myc-His B_EC1-4 von Eurofins Genomics. Es werden jeweils die Primer T7_fw und BGH_rev verwendet. Die oberen beiden Pfeile zeigen in rot die übereinstimmende Sequenz und der durchsichtige Teil die fehlende EC5.

Zusammenfassend ist es damit gelungen das EC1-4 Fragment der extrazellulären Domänen von sVE-Cadherin^{EC1-5} zu klonieren. Ziel nachfolgender Experimente wird sein, diesen Vektor in CHO- oder HEK-Zellen zu transfizieren und das entstehende Proteinprodukt in höherer Konzentration aufzureinigen. Mit diesem soll in Endothelkulturen untersucht werden, ob es ebenfalls einen Einfluss auf die Integrität der Endothelbarriere hat. Die hier dargestellten Klonierungsarbeiten stellen eine wichtige Voraussetzung für diese nachfolgenden Experimente dar.

6 Diskussion

Eine große Herausforderung im klinischen Alltag ist die Therapie der schweren Sepsis und des septischen Schocks, da diese trotz aller therapeutischen Bemühungen der letzten Jahre weiterhin mit einer hohen Mortalität assoziiert sind (Flemming et al., 2015; Yu et al., 2019, 2021; Zhang et al., 2010). Der Zusammenbruch der Endothelbarriere und das damit verbundene Organversagen stellen wesentliche Prognoseparameter dar, die bei allen systemischen Entzündungsreaktionen stattfinden. Wesentliche Teile der Pathophysiologie sind dabei unzureichend verstanden, weshalb bisher keine spezifischen Therapieansätze zur Stabilisierung der Endothelbarriere entwickelt werden konnten. Vorarbeiten zeigten, dass es beim Zusammenbruch der Endothelbarriere durch die Entzündungsreaktion zur Bildung von VE-Cadherin Spaltprodukten kommt. Das hierbei dominierende Spaltprodukt besteht aus den extrazellulären Domänen (EC) 1-5, wobei auch kleinere Spaltprodukte nachgewiesen wurden (Schulz et al., 2008). Die Konzentration von sVE-Cadherin^{EC1-5} wurde in der Vergangenheit bei vielen unterschiedlichen Entzündungen im Blut von Patienten nachgewiesen und ist auch in der Sepsis/systemischen Entzündungsreaktion mit einer schlechten Prognose assoziiert (Flemming et al., 2015; Yu et al., 2019, 2021; Zhang et al., 2010). Es ist bisher nicht erforscht, ob sVE-Cadherin^{EC1-5} eine Folge einer Entzündung ist, oder sogar selbst zu jenem Teufelskreis aus endothelialer Dysfunktion, Verlust des mikrovaskulären Flusses und Organversagen beiträgt. Die hier vorliegende Arbeit ist die erste, die diese Frage spezifisch adressiert.

6.1 Generierung von sVE-Cadherin^{EC1-5} und anderer VE-Cadherin Spaltprodukte zur Untersuchung direkter Effekte auf die Endothelbarriere

Intaktes VE-Cadherin ist erforderlich, um die interzelluläre Adhäsion aufrechtzuerhalten. Es ist allgemein bekannt, dass diese eine Voraussetzung für die Stabilität der Occludenskontakt Integrität ist und so eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Endothelbarriere spielt (Gavard, 2009; Juettner et al., 2019; Nawroth et al., 2002). Proinflammatorische Auslöser führen in Endothelzellen zur Fragmentierung von VE-Cadherin, welches durch ein Spaltungsereignis über die Aktivierung von zum Beispiel ADAM-10 ausgelöst wird (Flemming et al., 2015; Schulz et al., 2008). Diese Fragmentierung von VE-Cadherin führt zum Verlust der interzellulären Adhäsion. Wie oben ausgeführt wurde, werden neben sVE-Cadherin^{EC1-5} auch kleinere Fragmente als Folge auf Entzündungsreize freigesetzt (Schulz et al., 2008). Um zu untersuchen, ob die Bildung von sVE-

Cadherin^{EC1-5} nur Ausdruck der vorhandenen Entzündungsreaktion und Endothel-Aktivierung ist, war es nötig die Spaltprodukte in relevanten Mengen herzustellen, um diese an nicht-entzündeten Endothelkulturen zu testen. Der erste Fokus dieser Arbeit war die Generierung von sVE-Cadherin^{EC1-5}, da diese gemäß der Literatur und Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe die Hauptfraktion der VE-Cadherin Fragmente ausmacht und nachweislich mit einem schlechten Ergebnis bei Patienten mit Entzündungen assoziiert sind (Flemming et al., 2015; Schulz et al., 2008). Hierbei lag die methodische Herausforderung darin, dass nach der erfolgreichen Klonierung von humanem sVE-Cadherin^{EC1-5} das Plasmid in eukaryotische Zellen transfiziert werden musste, um zu verhindern, dass bakterielle Zellwandbestandteile die zu untersuchenden Effekte am Endothel auslösen. Es wurde aus diesem Grund die Transfektion in CHO-Zellen so optimiert, dass das Proteinprodukt in den Zellkulturüberstand sezerniert wurde. Mittels Sequenzierung, Western Blot Analyse und einem ELISA, der spezifisch gegen die extrazelluläre Domäne von VE-Cadherin gerichtet ist, konnte bewiesen werden, dass das gewünschte Protein sVE-Cadherin^{EC1-5} auf diese Weise spezifisch und erfolgreich generiert wurde. Dies stellte die Voraussetzung für alle nachfolgenden Experimente und Überlegungen dar.

6.2 sVE-Cadherin^{EC1-5} führt dosisabhängig zum Zusammenbruch der Endothelbarriere

Gegenstand der weiteren Untersuchung ist den Effekt von sVE-Cadherin^{EC1-5} auf nicht-entzündlichen Endothelkulturen zu beschreiben und die proinflammatorische Unabhängigkeit zu beweisen. Anhand der Bestimmung des transendothelialen elektrischen Widerstandes konnte gezeigt werden, dass sVE-Cadherin^{EC1-5} einen dosisabhängigen negativen Effekt auf die Endothelbarriere hat. Außerdem zeigte sich bei der Bestimmung des Permeabilitätskoeffizienten, dass sVE-Cadherin^{EC1-5} den gleichen negativen Effekt wie der inflammatorische Auslöser LPS bei ähnlicher Konzentration (LPS 100 ng/ml, sVE-Cadherin 130 ng/ml) hat.

An diesem Punkt muss erwähnt werden, dass in den Experimenten die Effekte von sVE-Cadherin^{EC1-5} unterschiedlich stark ausgeprägt vorliegen. Zum Beispiel bei den Widerstandsmessungen ist bei Abbildung 5-3 der TER-Wert bei 50,0%, bei Abbildung 5-16 bei 71 % und bei Abbildung 5-18 bei 75,8 und 78,1 %. Grund hierfür könnte die unterschiedliche Konfluenz der HDMEC Monolayer oder auch die Schwankungen in der Konzentrationsbestimmung der Überstände mittels ELISA sein.

LPS reguliert die Barrierefunktion in einer konzentrationsabhängigen Weise. Kleine Dosen von 10 ng haben einen positiven Effekt auf die Barriere, wohingegen höhere Konzentrationen (bis zu 500 µg) einen negativen Effekt zeigen (Zheng et al., 2018). In den Experimenten von Zheng et al. (2018) zeigen die Konzentrationen von 0,01 bis 1 µg einen positiven, ab über 1 µg einen negativen Einfluss verglichen mit der Kontrollgruppe (Zheng et al., 2018). Grund hierfür kann die unterschiedliche Porengröße der Transwell Inserts (0,3 vs. 0,4 µm), die unterschiedlichen humanen Endothelzellen (HPMEC vs. HDMEC) und/oder das Transwell Assay (Transwell Evans Blue vs. Transwell mit FITC-Dextran) sein.

Anhand der Immunfluoreszenzaufnahmen konnte ebenfalls der dosisabhängige Effekt von sVE-Cadherin^{EC1-5} gezeigt werden. Das fragmentierte Muster an den Zellgrenzen nach sVE-Cadherin^{EC1-5}-Behandlung zeigt, dass VE-Cadherin an den Zell-Kontakten vermindert vorliegt. Dieses Ergebnis bestätigt die permeable Endothelbarriere. Die Stabilität der Zell-Kontakte wird durch VE-Cadherin vermittelt. Bei Verlust dieser Stabilität kann der Zell-Zell-Kontakt durch die Occludenskante nicht mehr zuverlässig abgedichtet werden und es kommt zur Durchlässigkeit der Endothelbarriere. Auch die Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte ist erschwert, welches durch die Stressfaserausbildung, also die Morphologieänderung der Zelle, und die Lückenbildung im Monolayer in den Immunfluoreszenzaufnahmen gezeigt wird.

Western Blot Analysen zeigen, dass keine Umverteilung, sondern ein Abbau der extra- und der intrazellulären Domäne von VE-Cadherin stattfindet. Die reduzierte Proteinmenge von der extra- und intrazellulären Domäne von VE-Cadherin nach sVE-Cadherin^{EC1-5} Applikation zeigt, dass die Quantität von VE-Cadherin an den Kontakten vermindert ist, VE-Cadherin demnach degradiert wird und dies die Stabilität der Zell-Kontakte beeinträchtigt.

Die Tatsache, dass sVE-Cadherin^{EC1-5} in Abwesenheit von bakteriellen Toxinen und/oder proinflammatorischen Auslösern appliziert wurde und trotzdem einen vergleichbaren Effekt auf die Endothelbarriere hat, zeigt die Spezifität von dessen Wirkung.

Unabhängig von dieser Arbeit wurden die Effekte von sVE-Cadherin^{EC1-5} *in vivo* untersucht. Diese Experimente an Ratten zeigten, dass sVE-Cadherin^{EC1-5} die vaskuläre Permeabilität erhöht und die Mikrozirkulation stört und zwar auf vergleichbarem Level wie LPS.

Zusammenhängend kann man sagen, dass sVE-Cadherin^{EC1-5} unabhängig von proinflammatorischen Auslösern sowohl *in vitro* als auch *in vivo* einen negativen Effekt auf die Endothelbarriere hat.

6.3 Der negative Effekt von sVE-Cadherin^{EC1-5} auf den VE-Cadherin Multiprotein-Komplex

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass sVE-Cadherin^{EC1-5} die endotheliale Barrierefunktion stört, indem es den Multiprotein-Komplex des VE-Cadherins beeinflusst. Die Applikation von sVE-Cadherin^{EC1-5} auf konfluente Monolayer von Endothelzellen führt nicht nur zum Verlust der extra- und intrazellulären Domäne von VE-Cadherin an den Zellgrenzen, sondern auch von den Interaktionspartnern α -, β -, γ - und δ -Catenin sowie dem Occludenskontaktprotein ZO-1. Das Proteinlevel von den Cateninen wird nicht beeinflusst. Dies zeigt, dass diese Proteine nicht degradiert, sondern umverteilt werden. Speziell bei den Immunfluoreszenzaufnahmen von δ -Catenin (Abbildung 5-12) sieht man die intrazelluläre diffuse Verteilung nach der Applikation von sVE-Cadherin^{EC1-5}. In der Literatur wurde gezeigt, dass δ -Catenin die seitliche Gruppierung der Cadherine vermittelt und damit einen Einfluss auf die Stabilität der Endothelbarriere hat (M. A. Davis et al., 2003; Ireton et al., 2002; Thoreson et al., 2000; Xiao et al., 2003; Yap et al., 1998).

In Immunpräzipitationen zeigt sich, dass die Interaktion zwischen β -Catenin und VE-Cadherin verloren geht. Dies bestätigt den Zusammenbruch des Multiprotein-Komplexes durch die Präsenz von sVE-Cadherin^{EC1-5}. In Immunfärbungen zeigt sich auch eine Umverteilung von ZO-1, welches einen zentralen Regulator der Zell-Zell-Kontakte darstellt. Nicht nur die Adhäsionskontakte inklusive VE-Cadherin, sondern auch die räumliche Aktomyosin-Organisation, die Zell-Zell-Spannung, die Migration, die Angiogenese und die Endothelbarriere Formation wird von ZO-1 beeinflusst. Dies betrifft vor allem auch die Regulation der Occludenskontakte (Tornavaca et al., 2015) Hierdurch wird strukturell belegt, dass nicht nur die Adhäsionskontakte, sondern auch die Integrität der Occludenskontakte, beeinträchtigt werden. Dies kann bereits aus den funktionellen TER und Permeabilitätsmessungen geschlossen werden. Sein Verlust, sowie der Verlust der Interaktion mit VE-Cadherin hat negative Auswirkungen auf die Endothelbarriere.

Die Arbeitsgruppe von Luo & Radice zeigt, dass bei Erhöhung von N-Cadherin auch VE-Cadherin erhöht und bei einem Knock-down von N-Cadherin auch VE-Cadherin reduziert ist (Luo & Radice, 2005). Dies zeigt, dass es einen Zusammenhang zwischen VE-

Cadherin und N-Cadherin Expression gibt. Der Hintergrund dies in der vorliegenden Arbeit zu untersuchen war die Hypothese, dass N-Cadherin den Verlust von VE-Cadherin bis zu einem gewissen Grad kompensieren kann, da es stromaufwärts im Signalweg agiert. Beides konnte nicht bestätigt werden, da sVE-Cadherin^{EC1-5} keinen Effekt auf die Proteinmenge von N-Cadherin hat.

6.4 Der VE-PTP-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei dem sVE-Cadherin^{EC1-5}-Effekt

Frühere Daten zeigen, dass die Interaktion von VE-PTP und VE-Cadherin eine entscheidende Rolle bei der Stabilität der Endothelbarriere spielt (Frye et al., 2015; Nawroth et al., 2002). Über die extrazelluläre Domäne 5 (EC5) von VE-Cadherin und die 17. Domäne des VE-PTP-Proteins findet die Interaktion statt (Nawroth et al., 2002). Hieraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass sVE-Cadherin möglicherweise genau diese Interaktion hemmt. Diese Annahme wurde durch mathematische molekulardynamische Simulationen durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dandekar getestet. Die Docking-Simulation ermittelte die Anzahl der Aminosäuren, die in der VE-PTP- und sVE-Cadherin^{EC1-5}-Interaktion involviert sind. Diese Simulation ergibt 10 beziehungsweise 11. Es werden zudem drei Salzbrücken, sechs Wasserstoffbindungen und 59 nicht-gebundene Kontakte zwischen den beiden Proteinen ermittelt. Die van-der Waals-Kräfte betragen -202,3 und die elektrostatische Energie -421 kg/mol.

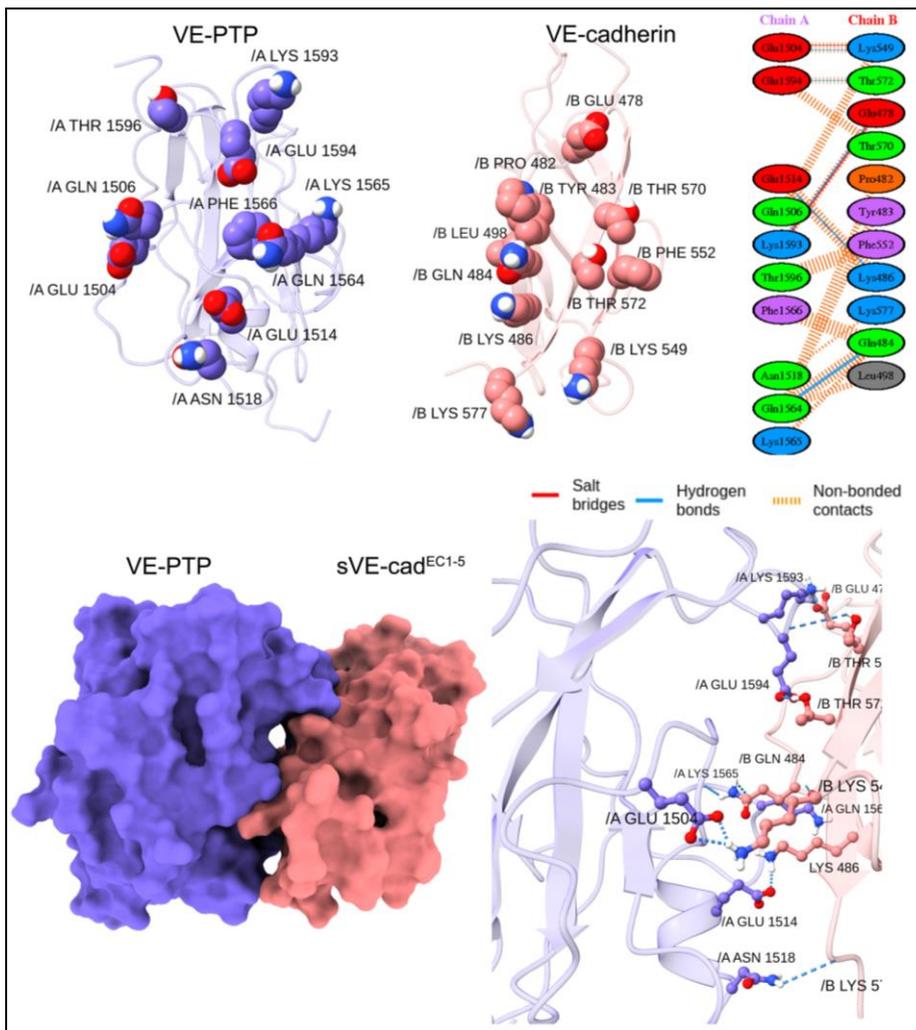


Abbildung 6.1.: Mathematische Modellierungen der Interaktion zwischen VE-Cadherin und VE-PTP. Abbildungen modifiziert aus Knop et. al (Manuskript eingereicht).

Die Modellierung wurde im Rahmen der experimentellen Arbeiten dieser Disseratation bestätigt: Zunächst zeigt sich, dass neben den oben genannten Interaktionspartnern ebenfalls das VE-PTP-Immunfärbemuster an den Zellgrenzen nach der Zugabe von sVE-Cadherin^{EC1-5} stark verändert ist. Die Immunfärbung zeigt, dass das Co-Lokalisierungs-Färbemuster von VE-Cadherin und VE-PTP nach Anwendung von sVE-Cadherin^{EC1-5} auf die Monoschicht der Endothelzellen verloren geht. Auch das Proteinlevel von VE-PTP wird durch sVE-Cadherin^{EC1-5} reduziert. Dies zeigt, dass keine Umverteilung wie bei den anderen Interaktionspartnern von VE-Cadherin geschieht, sondern dass VE-PTP in der Zelle degradiert wird.

Die Interaktion von VE-Cadherin und VE-PTP wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt (Dejana & Vestweber, 2013; Juettner et al., 2019; Saharinen et al., 2017) und VE-PTP als ein wichtiger Regulator der vaskulären Permeabilität und Endothelkontakt

Integrität beschrieben (Frye et al., 2015; Nottebaum et al., 2008; Shen et al., 2014). Es wurde in diesem Zusammenhang gezeigt, dass bei Verlust von VE-PTP-VE-Cadherin-Interaktion eine Barrieredysfunktion vorliegt. Die Arbeitsgruppe von Prof. Vestweber zeigte auch, dass die Folge der Dissoziation des VE-Cadherin/VE-PTP-Komplexes die Aktivierung verschiedener Signalwege ist (Nottebaum et al., 2008). Übereinstimmend konnte in dieser Arbeit herausgearbeitet werden, dass das „*small molecule*“ AKB9778 diese VE-PTP-abhängigen Signalwege hemmen kann. AKB9778 ist ein selektiver Inhibitor und hemmt die katalytische Aktivität von VE-PTP (Shen et al., 2014). Dies wird durch die Konkurrenz zwischen Inhibitor und Substrat gewährleistet. Phosphotyrosin wird durch den Phenylsulfamidsäureanteil von AKB9778 imitiert, sodass dieser in Konkurrenz treten kann.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit getestet ob durch die Applikation von AKB9778 und die damit vermittelte Hemmung des nachfolgenden Signalweges die Effekte von sVE-Cadherin^{EC1-5} beeinflusst werden. Die Applikation von AKB9778 allein ergibt einen höheren TER-Wert als unbehandelte Kontrollen. Dies zeigt, dass AKB9778 die Barriere stabilisiert. Auch die Immunfärbungen legen die Hemmung der sVE-Cadherin^{EC1-5}-Effekte durch AKB9778 nach Co-Inkubation mit sVE-Cadherin^{EC1-5} nahe. Es wird gezeigt, dass kein fragmentiertes Muster vorhanden ist, die Stressfasern deutlich reduziert vorliegen und keine Lückenbildung erkennbar ist. Es ist allerdings keine vollständige Hemmung durch diesen Ansatz zu erreichen. Im Einklang mit diesen Experimenten, welche zeigen, dass der Effekt von sVE-Cadherin^{EC1-5} auf Endothelzellen durch den VE-PTP Inhibitor AKB9778 abgeschwächt werden, stehen die *in vivo* Experimente, die von Dr. rer. nat. Burkard und PD Dr. med. Flemming durchgeführt wurden. Jene Ergebnisse wurden anhand der Bestimmung der Alveolardicke und der Mikrozirkulationsströmung ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass sVE-Cadherin^{EC1-5} kapillares Austreten *in vivo* verursacht und der Effekt durch AKB9778 abgeschwächt wird (Knop et al, Manuskript eingereicht).

6.5 Der RhoA-ROCK-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei den sVE-Cadherin^{EC1-5}-vermittelten Effekten

Im nächsten Schritt wurde untersucht, welche Signalwege stromabwärts der VE-PTP-Aktivierung zu den in den Endothelzellen beobachteten Effekten führen.

In einer früheren Studie wird gezeigt, dass die Gendeletion von VE-Cadherin den Barriere-stabilisierenden Effekt von AKB9778 nicht entgegenwirkt, was zu dem Schluss führt, dass die Stabilisierung der Endothelbarriere durch VE-PTP auch durch VE-Cadherin-unabhängige Mechanismen geschieht, wie zum Beispiel der Modellierung des Tie-2-Signalweges (Frye et al., 2015). Da dies auch bei dem sVE-Cadherin^{EC1-5}-Signalweg denkbar ist, wurde die Tie-2 Signalübertragungsbeteiligung getestet. Ang-1, ein Tie-2 Aktivator, wird verwendet, um Endothelzellen zu stimulieren. Die sVE-Cadherin^{EC1-5}-induzierte Beeinträchtigung der Endothelbarriere wird nicht durch Ang-1 abgeschwächt, welches anhand der Barriermessungen mittels TER-Messungen gezeigt wird. Dies lässt den Schluss zu, dass der sVE-Cadherin^{EC1-5}-Effekt nicht über den Signalweg von Tie-2 vermittelt wird.

Da eine Beobachtung die Stressfaserausbildung als Reaktion auf die Applikation von sVE-Cadherin^{EC1-5} ist, war die zweite Vermutung, dass die Signalübertragung über RhoA geschieht (Radeva & Waschke, 2018; Spindler et al., 2010). Um dies funktionell zu testen, wurde der Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 verwendet.

Es wurde gezeigt, dass die Effekte von sVE-Cadherin^{EC1-5} auf den endothelialen elektrischen Widerstand durch Y27632 aufgehoben werden. In Immunfluoreszenzfärbungen ist der Effekt von sVE-Cadherin^{EC1-5} nach Co-Inkubation nicht erkennbar. Auch die Stressfaserausbildung und die Lückenbildung im HDMEC Monolayer liegen reduziert vor. Dies zeigt, dass der ROCK-Signalweg involviert ist. Im Weiteren war nun das Ziel zu testen, ob vorgeschaltet eine RhoA-Aktivierung vorliegt und ob diese abhängig von der Aktivierung des VE-PTP-Signalweges sein könnte.

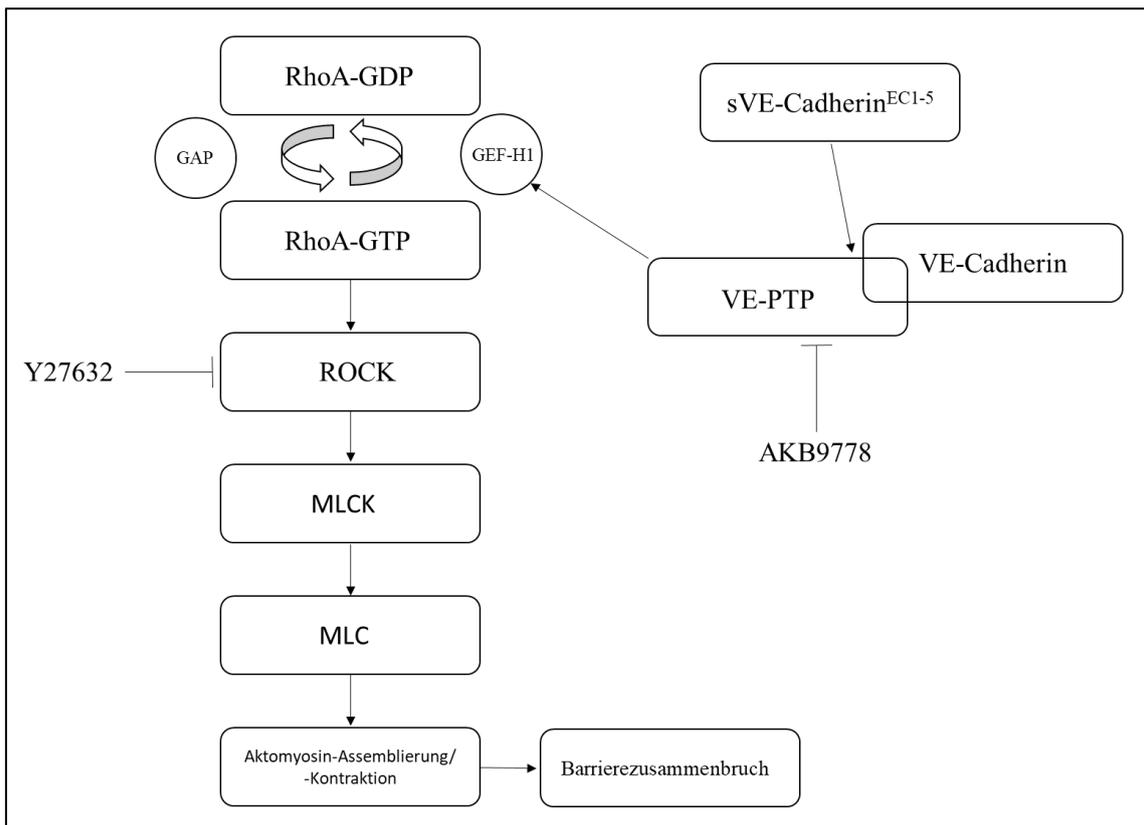


Abbildung 6.2.: Signalweg des sVE-Cadherin^{EC1-5} Effekts.

Western Blot Analysen zeigen, dass das Proteinlevel von GEF-H1 nach der Gabe von sVE-Cadherin^{EC1-5} erhöht vorliegt. Diese Tatsache bestätigt die Hypothese, dass RhoA beteiligt ist. Zusammenfassend zeigen die Daten, dass sVE-Cadherin^{EC1-5} die endotheliale Barrierefunktion über den VE-PTP/RhoA-Signalweg beeinflusst. Bewiesen wurde dies zwischenzeitlich durch Experimente aus der Arbeitsgruppe. In RhoA Aktivierungsmessungen wurde beobachtet, dass die RhoA-Aktivität durch die Applikation von sVE-Cadherin^{EC1-5} erhöht wird. Durch die gleichzeitige Gabe von AKB9778 wurde diese Aktivierung von RhoA gehemmt. Damit ist die VE-PTP-abhängige Aktivierung von RhoA durch sVE-Cadherin^{EC1-5} bestätigt (Knop et al., Manuskript eingereicht).

Zwei inflammatorische Auslöser sind LPS und TNF α , die ähnliche Effekte wie sVE-Cadherin^{EC1-5} auf die Endothelbarriere zeigen. Der LPS-Signalweg läuft über PI3K/Akt (Zheng et al., 2018). Der TNF- α -Effekt wird über den RhoA-ROCK-Signalweg vermittelt. TNF α steigert die RhoA-Aktivierung und aktiviert die MLC-Kinase-Kaskade. Es findet gesteigerte Kontraktilität und Stressfaserbildung statt (Kant et al., 2011; Lu et al., 2020). Lu et al (2020) zeigt, dass das Occludenskontaktprotein ZO-1 reduziert vorliegt

(Lu et al., 2020). In dieser Arbeit kann keine Reduktion von diesem Protein gezeigt werden. Außerdem zeigt Juettner et al, dass VE-PTP die GEF-H1 Bindung an RhoA verringert und die RhoA-Aktivität an VE-Cadherin-Verbindungen hemmt (Juettner et al., 2019). Dies passt zu den Ergebnissen, da durch die gestörte VE-Cadherin-VE-PTP-Interaktion die GEF-H1 Bindung vermutlich nicht verringert wird und so RhoA aktiviert vorliegt.

6.6 Herstellung des Konstrukts pcDNATM 6/myc-His B_EC1-4 für weiterführende mechanistische Untersuchungen

Wie oben beschrieben, findet die VE-Cadherin/VE-PTP-Interaktion über die EC5 und 17. Domäne statt. Dies war der Grund, weshalb zwei Konstrukte kloniert wurden. Das eine enthält die EC5 (EC3-5) und das andere nicht (EC1-4). Der Vektor pcDNA-pDEST47 wird als Rückgrat des Konstrukts verwendet. Dieser enthält ein *green-fluorescent protein* (GFP)-Tag. Dieser soll anzeigen, in welchem Kompartiment sich sVE-Cadherin^{EC1-5} *in vivo* anreichert beziehungsweise soll in der Immunfluoreszenzfärbung gezeigt werden, wie und wo sVE-Cadherin^{EC1-5} an die Zelle bindet. Beides konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Zudem wurde versucht mittels dieses Konstrukts eine stabile Zelllinie herzustellen, um eine kostengünstigere, ertragreichere und zeitsparende Alternative zu haben. Es wurden die Konstrukte pcDNA-pDEST_EC1-4 und pcDNA-pDEST_EC3-5 erfolgreich kloniert, jedoch können die Ziele mit diesen Konstrukten nicht erreicht werden, sowie insgesamt keine ausreichend hohe Konzentration erzielt werden, sodass eine andere Strategie anschließend erfolgte. Hierfür wurde der pcDNATM 6/myc-His-B-Vektor als Rückgrat der Klonierung verwendet. Dieser enthält neben der Ampicillin auch die Blasticidin Resistenzkassette, sodass sowohl in Prokaryonten als auch Eukaryonten eine Selektion stattfinden kann. Eine weitere Eigenschaft des Vektors ist der *myc*-Tag. Dieser erlaubt die Detektion des Konstrukts im Überstand. Der 6x His-Tag ermöglicht die Aufreinigung des Konstrukts aus dem Überstand der exprimierenden Zellen. Das Konstrukt pcDNATM 6/myc-His B_EC1-4 konnte erfolgreich hergestellt werden.

Zukünftig kann man nach erfolgreicher Klonierung von pcDNATM 6/myc-His B_EC1-4 und pcDNATM 6/myc-His B_EC1-5 die Effekte dieser untersuchen und vergleichen. Hierfür kann der Effekt auf den transendothelialen Widerstand, die Permeabilität und in Immunfluoreszenzfärbungen untersucht werden. Vermutet wird, dass das Konstrukt, dem

die fünfte Domäne fehlt, keinen negativen Effekt auf die Endothelbarriere hat, wohingegen das Konstrukt welches die EC3-5 enthält den gleichen Effekt wie sVE-Cadherin^{EC1-5} zeigt.

6.7 Schlussfolgerung und mögliche klinische Relevanz der Beobachtungen

Klinische Studien haben erhöhte systemische sVE-Cadherin^{EC1-5}-Spiegel mit pathologischen Zuständen in Verbindung gebracht. Diese reichen von akuter Nierenschädigung (Yu et al., 2019), systemischer Vaskulitis (Chen et al., 2014), chronischer spontaner Urtikaria (Tao Chen et al., 2017) bis hin zu systemischer Sepsis (Flemming et al., 2015). Eine therapeutische Senkung des sVE-Cadherin^{EC1-5}-Spiegels könnte die Schwere des mikrovaskulären Lecks und des Organversagens verringern. Durch die Verhinderung der Spaltung von VE-Cadherin oder durch die Entfernung von sVE-Cadherin^{EC1-5} mittels Dialyse aus dem Blut septischer Patienten könnte zur Reduzierung der Symptome führen. Darüber hinaus rechtfertigen die Beobachtungen, dass die VE-PTP und RhoA-Inhibitoren die Effekte von sVE-Cadherin^{EC1-5} wirksam verhindern und dass AKB9778 und Y27632 potenzielle therapeutische Medikationen sind, um Sepsis und andere Erkrankungen, bei denen eine Dysfunktion der Endothelbarriere vorliegt, zu behandeln und sollten weiter untersucht werden.

7 Literaturverzeichnis

- Adamson, R. H., Curry, F. E., Adamson, G., Liu, B., Jiang, Y., Aktories, K., Barth, H., Daigeler, A., Golenhofen, N., Ness, W., & Drenckhahn, D. (2002). Rho and rho kinase modulation of barrier properties: cultured endothelial cells and intact microvessels of rats and mice. *J Physiol*, 539(Pt 1), 295-308. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.013117>
- Alawo, D. O. A., Tahir, T. A., Fischer, M., Bates, D. G., Amirova, S. R., & Brindle, N. P. J. (2017). Regulation of Angiopoietin Signalling by Soluble Tie2 Ectodomain and Engineered Ligand Trap. *Scientific Reports*, 7(1), 3658. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03981-6>
- Amano, M., Fukata, Y., & Kaibuchi, K. (2000). Regulation and Functions of Rho-Associated Kinase. *Experimental cell research*, 261(1), 44-51. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/excr.2000.5046>
- Amasheh, S., Meiri, N., Gitter, A. H., Schöneberg, T., Mankertz, J., Schulzke, J. D., & Fromm, M. (2002). Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci*, 115(Pt 24), 4969-4976. <https://doi.org/10.1242/jcs.00165>
- Anastasiadis, P. Z., Moon, S. Y., Thoreson, M. A., Mariner, D. J., Crawford, H. C., Zheng, Y., & Reynolds, A. B. (2000). Inhibition of RhoA by p120 catenin. *Nat Cell Biol*, 2(9), 637-644. <https://doi.org/10.1038/35023588>
- Anastasiadis, T., Deacon, S. W., Devarajan, K., Ma, H., & Peterson, J. R. (2011). Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. *Nature Biotechnology*, 29(11), 1039-1045. <https://doi.org/10.1038/nbt.2017>
- Angst, B. D., Marcozzi, C., & Magee, A. I. (2001). The cadherin superfamily. *J Cell Sci*, 114(Pt 4), 625-626. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.4.625>
- Augustin, H. G., Koh, G. Y., Thurston, G., & Alitalo, K. (2009). Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(3), 165-177. <https://doi.org/10.1038/nrm2639>
- Barton, W. A., Tzvetkova, D., & Nikolov, D. B. (2005). Structure of the angiopoietin-2 receptor binding domain and identification of surfaces involved in Tie2 recognition. *Structure*, 13(5), 825-832. <https://doi.org/10.1016/j.str.2005.03.009>
- Bauer, M., Gerlach, H., Vogelmann, T., Preissing, F., Stiefel, J., & Adam, D. (2020). Mortality in sepsis and septic shock in Europe, North America and Australia between 2009 and 2019- results from a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*, 24(1), 239. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-02950-2>
- Baumgartner, W., Hinterdorfer, P., Ness, W., Raab, A., Vestweber, D., Schindler, H., & Drenckhahn, D. (2000). Cadherin interaction probed by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(8), 4005-4010. <https://doi.org/10.1073/pnas.070052697>
- Benninghoff, A. D., D. (2008). *Anatomie* (Vol. 1. Auflage). Urban & Fischer Verlag.
- Birukova, A. A., Birukov, K. G., Adyshev, D., Usatyuk, P., Natarajan, V., Garcia, J. G., & Verin, A. D. (2005). Involvement of microtubules and Rho pathway in TGF-beta1-induced lung vascular barrier dysfunction. *J Cell Physiol*, 204(3), 934-947. <https://doi.org/10.1002/jcp.20359>
- Birukova, A. A., Birukov, K. G., Gorshkov, B., Liu, F., Garcia, J. G., & Verin, A. D. (2005). MAP kinases in lung endothelial permeability induced by microtubule

- disassembly. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289(1), L75-84. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00447.2004>
- Birukova, A. A., Smurova, K., Birukov, K. G., Kaibuchi, K., Garcia, J. G., & Verin, A. D. (2004). Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction. *Microvasc Res*, 67(1), 64-77. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2003.09.007>
- Birukova, A. A., Smurova, K., Birukov, K. G., Usatyuk, P., Liu, F., Kaibuchi, K., Ricks-Cord, A., Natarajan, V., Alieva, I., Garcia, J. G., & Verin, A. D. (2004). Microtubule disassembly induces cytoskeletal remodeling and lung vascular barrier dysfunction: role of Rho-dependent mechanisms. *J Cell Physiol*, 201(1), 55-70. <https://doi.org/10.1002/jcp.20055>
- Blum, M. S., Toninelli, E., Anderson, J. M., Balda, M. S., Zhou, J., O'Donnell, L., Pardi, R., & Bender, J. R. (1997). Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines. *Am J Physiol*, 273(1 Pt 2), H286-294. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.273.1.H286>
- Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M., & Sibbald, W. J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 101(6), 1644-1655. <https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1644>
- Braun, L. J., Stegmeyer, R. I., Schäfer, K., Volkery, S., Currie, S. M., Kempe, B., Nottebaum, A. F., & Vestweber, D. (2020). Platelets docking to VWF prevent leaks during leukocyte extravasation by stimulating Tie-2. *Blood*, 136(5), 627-639. <https://doi.org/10.1182/blood.2019003442>
- Braun, L. J., Zinnhardt, M., Vockel, M., Drexler, H. C., Peters, K., & Vestweber, D. (2019). VE-PTP inhibition stabilizes endothelial junctions by activating FGD5. *EMBO Rep*, 20(7), e47046. <https://doi.org/10.15252/embr.201847046>
- Carey, D. J. (1997). Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J*, 327 (Pt 1)(Pt 1), 1-16. <https://doi.org/10.1042/bj3270001>
- Carmeliet, P., Lampugnani, M. G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oosthuysse, B., Dewerchin, M., Zanetti, A., Angellilo, A., Mattot, V., Nuyens, D., Lutgens, E., Clotman, F., de Ruiter, M. C., Gittenberger-de Groot, A., Poelmann, R., . . . Dejana, E. (1999). Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*, 98(2), 147-157. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81010-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81010-7)
- Cascone, I., Audero, E., Giraudo, E., Napione, L., Maniero, F., Philips, M. R., Collard, J. G., Serini, G., & Bussolino, F. (2003). Tie-2-dependent activation of RhoA and Rac1 participates in endothelial cell motility triggered by angiopoietin-1. *Blood*, 102(7), 2482-2490. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-03-0670>
- Chen-Konak, L., Guetta-Shubin, Y., Yahav, H., Shay-Salit, A., Zilberman, M., Binah, O., & Resnick, N. (2003). Transcriptional and post-translation regulation of the Tie1 receptor by fluid shear stress changes in vascular endothelial cells. *Faseb j*, 17(14), 2121-2123. <https://doi.org/10.1096/fj.02-1151fje>
- Chen, T., Guo, Z.-p., Wang, W.-j., Fu, L.-x., Sun, Q.-m., & Zhou, P.-m. (2017). Increased serum soluble vascular endothelial cadherin levels in patients with chronic spontaneous urticaria. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 118(6), 704-709. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anai.2017.04.013>

- Chen, T., Guo, Z. P., Cao, N., Qin, S., Li, M. M., & Jia, R. Z. (2014). Increased serum levels of soluble vascular endothelial-cadherin in patients with systemic vasculitis. *Rheumatol Int*, *34*(8), 1139-1143. <https://doi.org/10.1007/s00296-014-2949-7>
- Chen, T., Guo, Z. P., Wang, W. J., Fu, L. X., Sun, Q. M., & Zhou, P. M. (2017). Increased serum soluble vascular endothelial cadherin levels in patients with chronic spontaneous urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol*, *118*(6), 704-709. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2017.04.013>
- Chen, X., Kojima, S.-i., Borisy, G., & Green, K. (2003). p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *The Journal of cell biology*, *163*, 547-557. <https://doi.org/10.1083/jcb.200305137>
- Choi, H. R., Kim, W. K., Park, A., Jung, H., Han, B. S., Lee, S. C., & Bae, K. H. (2013). Protein tyrosine phosphatase profiling studies during brown adipogenic differentiation of mouse primary brown preadipocytes. *BMB Rep*, *46*(11), 539-543. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2013.46.11.058>
- Daly, C., Eichten, A., Castanaro, C., Pasnikowski, E., Adler, A., Lalani, A. S., Papadopoulos, N., Kyle, A. H., Minchinton, A. I., Yancopoulos, G. D., & Thurston, G. (2013). Angiopoietin-2 functions as a Tie2 agonist in tumor models, where it limits the effects of VEGF inhibition. *Cancer Res*, *73*(1), 108-118. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-12-2064>
- Davis, M. A., Ireton, R. C., & Reynolds, A. B. (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol*, *163*(3), 525-534. <https://doi.org/10.1083/jcb.200307111>
- Davis, S., Papadopoulos, N., Aldrich, T. H., Maisonpierre, P. C., Huang, T., Kovac, L., Xu, A., Leidich, R., Radziejewska, E., Rafique, A., Goldberg, J., Jain, V., Bailey, K., Karow, M., Fandl, J., Samuelsson, S. J., Ioffe, E., Rudge, J. S., Daly, T. J., . . . Yancopoulos, G. D. (2003). Angiopoietins have distinct modular domains essential for receptor binding, dimerization and superclustering. *Nat Struct Biol*, *10*(1), 38-44. <https://doi.org/10.1038/nsb880>
- DeBusk, L. M., Hallahan, D. E., & Lin, P. C. (2004). Akt is a major angiogenic mediator downstream of the Ang1/Tie2 signaling pathway. *Experimental cell research*, *298*(1), 167-177. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.04.013>
- Dejana, E., Orsenigo, F., & Lampugnani, M. G. (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci*, *121*(Pt 13), 2115-2122. <https://doi.org/10.1242/jcs.017897>
- Dejana, E., & Vestweber, D. (2013). The role of VE-cadherin in vascular morphogenesis and permeability control. *Prog Mol Biol Transl Sci*, *116*, 119-144. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394311-8.00006-6>
- Deng, Y., Zhang, X., & Simons, M. (2015). Molecular controls of lymphatic VEGFR3 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *35*(2), 421-429. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.114.304881>
- Dumont, D. J., Yamaguchi, T. P., Conlon, R. A., Rossant, J., & Breitman, M. L. (1992). tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene*, *7*(8), 1471-1480.
- Eklund, L., & Saharinen, P. (2013). Angiopoietin signaling in the vasculature. *Experimental cell research*, *319* 9, 1271-1280.
- Essler, M., Amano, M., Kruse, H. J., Kaibuchi, K., Weber, P. C., & Aepfelbacher, M. (1998). Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its

- target Rho kinase in human endothelial cells. *J Biol Chem*, 273(34), 21867-21874. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.34.21867>
- Essler, M., Retzer, M., Bauer, M., Heemskerk, J. W., Aepfelbacher, M., & Siess, W. (1999). Mildly oxidized low density lipoprotein induces contraction of human endothelial cells through activation of Rho/Rho kinase and inhibition of myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem*, 274(43), 30361-30364. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.43.30361>
- Fachinger, G., Deutsch, U., & Risau, W. (1999). Functional interaction of vascular endothelial-protein-tyrosine phosphatase with the angiopoietin receptor Tie-2. *Oncogene*, 18(43), 5948-5953. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202992>
- Fagiani, E., & Christofori, G. (2013). Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Lett*, 328(1), 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.08.018>
- Faller, A., & Schünke, M. (2008). *Der Körper des Menschen* (Vol. 15). Thieme.
- Findley, C. M., Cudmore, M. J., Ahmed, A., & Kontos, C. D. (2007). VEGF induces Tie2 shedding via a phosphoinositide 3-kinase/Akt dependent pathway to modulate Tie2 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(12), 2619-2626. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.107.150482>
- Flemming, S., Burkard, N., Renschler, M., Vielmuth, F., Meir, M., Schick, M. A., Wunder, C., Germer, C. T., Spindler, V., Waschke, J., & Schlegel, N. (2015). Soluble VE-cadherin is involved in endothelial barrier breakdown in systemic inflammation and sepsis. *Cardiovasc Res*, 107(1), 32-44. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv144>
- Franz, C. M., & Ridley, A. J. (2004). p120 catenin associates with microtubules: inverse relationship between microtubule binding and Rho GTPase regulation. *J Biol Chem*, 279(8), 6588-6594. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312812200>
- Frye, M., Dierkes, M., Küppers, V., Vockel, M., Tomm, J., Zeuschner, D., Rossaint, J., Zarbock, A., Koh, G. Y., Peters, K., Nottebaum, A. F., & Vestweber, D. (2015). Interfering with VE-PTP stabilizes endothelial junctions in vivo via Tie-2 in the absence of VE-cadherin. *J Exp Med*, 212(13), 2267-2287. <https://doi.org/10.1084/jem.20150718>
- Fukuhara, S., & Mochizuki, N. (2010). [Signaling mechanism involved in regulation of endothelial cell-cell junctions]. *Yakugaku Zasshi*, 130(11), 1413-1420. <https://doi.org/10.1248/yakushi.130.1413>
- Fukuhara, S., Sako, K., Minami, T., Noda, K., Kim, H. Z., Kodama, T., Shibuya, M., Takakura, N., Koh, G. Y., & Mochizuki, N. (2008). Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nature Cell Biology*, 10(5), 513-526. <https://doi.org/10.1038/ncb1714>
- Gaieski, D. F., Edwards, J. M., Kallan, M. J., & Carr, B. G. (2013). Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med*, 41(5), 1167-1174. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31827c09f8>
- Gale, N. W., & Yancopoulos, G. D. (1999). Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev*, 13(9), 1055-1066. <https://doi.org/10.1101/gad.13.9.1055>
- Garcia, J. G. N., Davis, H. W., & Patterson, C. E. (1995). Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: Role of myosin light chain phosphorylation. *Journal of Cellular Physiology*, 163(3), 510-522. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcp.1041630311>
- Gavard, J. (2009). Breaking the VE-cadherin bonds. *FEBS Lett*, 583(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.11.032>

- Gavard, J., Patel, V., & Gutkind, J. S. (2008). Angiopoietin-1 Prevents VEGF-Induced Endothelial Permeability by Sequestering Src through mDia. *Developmental Cell*, *14*(1), 25-36. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.10.019>
- Gerhardt, H., Wolburg, H., & Redies, C. (2000). N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken. *Dev Dyn*, *218*(3), 472-479. [https://doi.org/10.1002/1097-0177\(200007\)218:3<472::Aid-dvdy1008>3.0.Co;2-#](https://doi.org/10.1002/1097-0177(200007)218:3<472::Aid-dvdy1008>3.0.Co;2-#)
- Gerok, W. (2007). *Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt*. Schattauer Verlag.
- Goeckeler, Z. M., & Wysolmerski, R. B. (1995). Myosin light chain kinase-regulated endothelial cell contraction: the relationship between isometric tension, actin polymerization, and myosin phosphorylation. *J Cell Biol*, *130*(3), 613-627. <https://doi.org/10.1083/jcb.130.3.613>
- Griffin, M. E., Sorum, A. W., Miller, G. M., Goddard, W. A., 3rd, & Hsieh-Wilson, L. C. (2021). Sulfated glycans engage the Ang-Tie pathway to regulate vascular development. *Nat Chem Biol*, *17*(2), 178-186. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-00657-7>
- Gumbiner, B. M. (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *6*(8), 622-634. <https://doi.org/10.1038/nrm1699>
- Gurnik, S., Devraj, K., Macas, J., Yamaji, M., Starke, J., Scholz, A., Sommer, K., Di Tacchio, M., Vutukuri, R., Beck, H., Mittelbronn, M., Foerch, C., Pfeilschifter, W., Liebner, S., Peters, K. G., Plate, K. H., & Reiss, Y. (2016). Angiopoietin-2-induced blood-brain barrier compromise and increased stroke size are rescued by VE-PTP-dependent restoration of Tie2 signaling. *Acta Neuropathol*, *131*(5), 753-773. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1551-3>
- Haselton, F. R., Dworska, E., Evans, S. S., Hoffman, L. H., & Alexander, J. S. (1996). Modulation of retinal endothelial barrier in an in vitro model of the retinal microvasculature. *Exp Eye Res*, *63*(2), 211-222. <https://doi.org/10.1006/exer.1996.0110>
- Hayashi, M., Majumdar, A., Li, X., Adler, J., Sun, Z., Vertuani, S., Hellberg, C., Mellberg, S., Koch, S., Dimberg, A., Koh, G. Y., Dejana, E., Belting, H. G., Affolter, M., Thurston, G., Holmgren, L., Vestweber, D., & Claesson-Welsh, L. (2013). VE-PTP regulates VEGFR2 activity in stalk cells to establish endothelial cell polarity and lumen formation. *Nat Commun*, *4*, 1672. <https://doi.org/10.1038/ncomms2683>
- He, L., Vanlandewijck, M., Mäe, M. A., Andrae, J., Ando, K., Del Gaudio, F., Nahar, K., Lebouvier, T., Laviña, B., Gouveia, L., Sun, Y., Raschperger, E., Segerstolpe, Å., Liu, J., Gustafsson, S., Räsänen, M., Zarb, Y., Mochizuki, N., Keller, A., . . . Betsholtz, C. (2018). Single-cell RNA sequencing of mouse brain and lung vascular and vessel-associated cell types. *Scientific Data*, *5*(1), 180160. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.160>
- Hirano, S., Nose, A., Hatta, K., Kawakami, A., & Takeichi, M. (1987). Calcium-dependent cell-cell adhesion molecules (cadherins): subclass specificities and possible involvement of actin bundles. *J Cell Biol*, *105*(6 Pt 1), 2501-2510. <https://doi.org/10.1083/jcb.105.6.2501>
- Hixenbaugh, E. A., Goeckeler, Z. M., Papaiya, N. N., Wysolmerski, R. B., Silverstein, S. C., & Huang, A. J. (1997). Stimulated neutrophils induce myosin light chain phosphorylation and isometric tension in endothelial cells. *Am J Physiol*, *273*(2 Pt 2), H981-988. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.273.2.H981>

- Hubbard, S. R., & Till, J. H. (2000). Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem*, 69, 373-398. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.373>
- Ichii, T., & Takeichi, M. (2007). p120-catenin regulates microtubule dynamics and cell migration in a cadherin-independent manner. *Genes Cells*, 12(7), 827-839. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01095.x>
- Iretton, R. C., Davis, M. A., van Hengel, J., Mariner, D. J., Barnes, K., Thoreson, M. A., Anastasiadis, P. Z., Matrisian, L., Bundy, L. M., Sealy, L., Gilbert, B., van Roy, F., & Reynolds, A. B. (2002). A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol*, 159(3), 465-476. <https://doi.org/10.1083/jcb.200205115>
- Iwama, A., Hamaguchi, I., Hashiyama, M., Murayama, Y., Yasunaga, K., & Suda, T. (1993). Molecular cloning and characterization of mouse TIE and TEK receptor tyrosine kinase genes and their expression in hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 195(1), 301-309. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.2045>
- Juettner, V. V., Kruse, K., Dan, A., Vu, V. H., Khan, Y., Le, J., Leckband, D., Komarova, Y., & Malik, A. B. (2019). VE-PTP stabilizes VE-cadherin junctions and the endothelial barrier via a phosphatase-independent mechanism. *J Cell Biol*, 218(5), 1725-1742. <https://doi.org/10.1083/jcb.201807210>
- Kant, S., Swat, W., Zhang, S., Zhang, Z. Y., Neel, B. G., Flavell, R. A., & Davis, R. J. (2011). TNF-stimulated MAP kinase activation mediated by a Rho family GTPase signaling pathway. *Genes Dev*, 25(19), 2069-2078. <https://doi.org/10.1101/gad.17224711>
- Kim, I., Kim, J. H., Moon, S. O., Kwak, H. J., Kim, N. G., & Koh, G. Y. (2000). Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *Oncogene*, 19(39), 4549-4552. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203800>
- Kim, J. S., Kim, W. K., Oh, K. J., Lee, E. W., Han, B. S., Lee, S. C., & Bae, K. H. (2019). Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type B (PTPRB) Inhibits Brown Adipocyte Differentiation through Regulation of VEGFR2 Phosphorylation. *J Microbiol Biotechnol*, 29(4), 645-650. <https://doi.org/10.4014/jmb.1810.10033>
- Kim, K. T., Choi, H. H., Steinmetz, M. O., Maco, B., Kammerer, R. A., Ahn, S. Y., Kim, H. Z., Lee, G. M., & Koh, G. Y. (2005). Oligomerization and multimerization are critical for angiopoietin-1 to bind and phosphorylate Tie2. *J Biol Chem*, 280(20), 20126-20131. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500292200>
- Kiuchi-Saishin, Y., Gotoh, S., Furuse, M., Takasuga, A., Tano, Y., & Tsukita, S. (2002). Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol*, 13(4), 875-886. <https://doi.org/10.1681/asn.V134875>
- Korhonen, E. A., Lampinen, A., Giri, H., Anisimov, A., Kim, M., Allen, B., Fang, S., D'Amico, G., Sipilä, T. J., Lohela, M., Strandin, T., Vaheri, A., Ylä-Herttuala, S., Koh, G. Y., McDonald, D. M., Alitalo, K., & Saharinen, P. (2016). Tie1 controls angiopoietin function in vascular remodeling and inflammation. *J Clin Invest*, 126(9), 3495-3510. <https://doi.org/10.1172/jci84923>
- Korhonen, J., Polvi, A., Partanen, J., & Alitalo, K. (1994). The mouse tie receptor tyrosine kinase gene: expression during embryonic angiogenesis. *Oncogene*, 9(2), 395-403.
- Krueger, N. X., Streuli, M., & Saito, H. (1990). Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases. *Embo j*, 9(10), 3241-3252. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07523.x>
- Kruse, K., Lee, Q. S., Sun, Y., Klomp, J., Yang, X., Huang, F., Sun, M. Y., Zhao, S., Hong, Z., Vogel, S. M., Shin, J. W., Leckband, D. E., Tai, L. M., Malik, A. B., &

- Komarova, Y. A. (2019). N-cadherin signaling via Trio assembles adherens junctions to restrict endothelial permeability. *J Cell Biol*, 218(1), 299-316. <https://doi.org/10.1083/jcb.201802076>
- Lee, K. W., Lip, G. Y., & Blann, A. D. (2004). Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2, angiopoietin receptor tie-2, and vascular endothelial growth factor levels in acute coronary syndromes. *Circulation*, 110(16), 2355-2360. <https://doi.org/10.1161/01.Cir.0000138112.90641.7f>
- Leppänen, V.-M., Saharinen, P., & Alitalo, K. (2017). Structural basis of Tie2 activation and Tie2/Tie1 heterodimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(17), 4376-4381. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1616166114>
- Liang, T. W., DeMarco, R. A., Mrsny, R. J., Gurney, A., Gray, A., Hooley, J., Aaron, H. L., Huang, A., Klassen, T., Tumas, D. B., & Fong, S. (2000). Characterization of huJAM: evidence for involvement in cell-cell contact and tight junction regulation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279(6), C1733-1743. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.279.6.C1733>
- Lu, C., Dong, X., Yu, W. P., Ding, J. L., Yang, W., Gong, Y., Liu, J. C., Tang, Y. H., Xu, J. J., & Zhou, J. L. (2020). Inorganic phosphate-osteogenic induction medium promotes osteogenic differentiation of valvular interstitial cells via the BMP-2/Smad1/5/9 and RhoA/ROCK-1 signaling pathways. *Am J Transl Res*, 12(7), 3329-3345.
- Luo, Y., Liu, W., Tang, P., Jiang, D., Gu, C., Huang, Y., Gong, F., Rong, Y., Qian, D., Chen, J., Zhou, Z., Zhao, S., Wang, J., Xu, T., Wei, Y., Yin, G., Fan, J., & Cai, W. (2019). miR-624-5p promoted tumorigenesis and metastasis by suppressing hippo signaling through targeting PTPRB in osteosarcoma cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 488. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1491-6>
- Luo, Y., & Radice, G. L. (2005). N-cadherin acts upstream of VE-cadherin in controlling vascular morphogenesis. *The Journal of cell biology*, 169(1), 29-34. <https://doi.org/10.1083/jcb.200411127>
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., & Narumiya, S. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*, 285(5429), 895-898. <https://doi.org/10.1126/science.285.5429.895>
- Magie, C. R., Pinto-Santini, D., & Parkhurst, S. M. (2002). Rho1 interacts with p120ctn and alpha-catenin, and regulates cadherin-based adherens junction components in *Drosophila*. *Development*, 129(16), 3771-3782. <https://doi.org/10.1242/dev.129.16.3771>
- Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T. H., Papadopoulos, N., Daly, T. J., Davis, S., Sato, T. N., & Yancopoulos, G. D. (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 277(5322), 55-60. <https://doi.org/10.1126/science.277.5322.55>
- Marron, M. B., Hughes, D. P., Edge, M. D., Forder, C. L., & Brindle, N. P. (2000). Evidence for heterotypic interaction between the receptor tyrosine kinases TIE-1 and TIE-2. *J Biol Chem*, 275(50), 39741-39746. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007189200>
- Marron, M. B., Singh, H., Tahir, T. A., Kavumkal, J., Kim, H. Z., Koh, G. Y., & Brindle, N. P. (2007). Regulated proteolytic processing of Tie1 modulates ligand responsiveness of the receptor-tyrosine kinase Tie2. *J Biol Chem*, 282(42), 30509-30517. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702535200>

- McCarthy, M. J., Burrows, R., Bell, S. C., Christie, G., Bell, P. R., & Brindle, N. P. (1999). Potential roles of metalloprotease mediated ectodomain cleavage in signaling by the endothelial receptor tyrosine kinase Tie-1. *Lab Invest*, 79(7), 889-895.
- Mehta, D., & Malik, A. B. (2006). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev*, 86(1), 279-367. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2005>
- Mellberg, S., Dimberg, A., Bahram, F., Hayashi, M., Rennel, E., Ameer, A., Westholm, J. O., Larsson, E., Lindahl, P., Cross, M. J., & Claesson-Welsh, L. (2009). Transcriptional profiling reveals a critical role for tyrosine phosphatase VE-PTP in regulation of VEGFR2 activity and endothelial cell morphogenesis. *Faseb j*, 23(5), 1490-1502. <https://doi.org/10.1096/fj.08-123810>
- Mirando, A. C., Shen, J., Silva, R. L. E., Chu, Z., Sass, N. C., Lorenc, V. E., Green, J. J., Campochiaro, P. A., Popel, A. S., & Pandey, N. B. (2019). A collagen IV-derived peptide disrupts $\alpha 5\beta 1$ integrin and potentiates Ang2/Tie2 signaling. *JCI Insight*, 4(4). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.122043>
- Morita, K., Sasaki, H., Furuse, M., & Tsukita, S. (1999). Endothelial Claudin-5/Tmuvf Constitutes Tight Junction Strands in Endothelial Cells. *Journal of Cell Biology*, 147(1), 185-194. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.1.185>
- Navarro, P., Ruco, L., & Dejana, E. (1998). Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization. *J Cell Biol*, 140(6), 1475-1484. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.6.1475>
- Nawroth, R., Poell, G., Ranft, A., Kloep, S., Samulowitz, U., Fachinger, G., Golding, M., Shima, D. T., Deutsch, U., & Vestweber, D. (2002). VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. *Embo j*, 21(18), 4885-4895. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf497>
- Noren, N. K., Liu, B. P., Burrridge, K., & Kreft, B. (2000). p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol*, 150(3), 567-580. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.3.567>
- Nottebaum, A. F., Cagna, G., Winderlich, M., Gamp, A. C., Linnepe, R., Polaschegg, C., Filippova, K., Lyck, R., Engelhardt, B., Kamenyeva, O., Bixel, M. G., Butz, S., & Vestweber, D. (2008). VE-PTP maintains the endothelial barrier via plakoglobin and becomes dissociated from VE-cadherin by leukocytes and by VEGF. *J Exp Med*, 205(12), 2929-2945. <https://doi.org/10.1084/jem.20080406>
- Parikh, S. M. (2017). The Angiopoietin-Tie2 Signaling Axis in Systemic Inflammation. *J Am Soc Nephrol*, 28(7), 1973-1982. <https://doi.org/10.1681/asn.2017010069>
- Partanen, J., Armstrong, E., Mäkelä, T. P., Korhonen, J., Sandberg, M., Renkonen, R., Knuutila, S., Huebner, K., & Alitalo, K. (1992). A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains. *Mol Cell Biol*, 12(4), 1698-1707. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.4.1698-1707.1992>
- Pietilä, R., Nätyński, M., Tammela, T., Kangas, J., Pulkki, K. H., Limaye, N., Vikkula, M., Koh, G. Y., Saharinen, P., Alitalo, K., & Eklund, L. (2012). Ligand oligomerization state controls Tie2 receptor trafficking and angiopoietin-2-specific responses. *J Cell Sci*, 125(Pt 9), 2212-2223. <https://doi.org/10.1242/jcs.098020>
- Ponnuchamy, B., & Khalil, R. A. (2008). Role of ADAMs in endothelial cell permeability: cadherin shedding and leukocyte rolling. *Circ Res*, 102(10), 1139-1142. <https://doi.org/10.1161/circresaha.108.177394>

- Procopio, W. N., Pelavin, P. I., Lee, W. M., & Yeilding, N. M. (1999). Angiopoietin-1 and -2 coiled coil domains mediate distinct homo-oligomerization patterns, but fibrinogen-like domains mediate ligand activity. *J Biol Chem*, *274*(42), 30196-30201. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.42.30196>
- Radeva, M. Y., & Waschke, J. (2018). Mind the gap: mechanisms regulating the endothelial barrier. *Acta Physiol (Oxf)*, *222*(1). <https://doi.org/10.1111/apha.12860>
- Rath, N., & Olson, M. F. (2012). Rho-associated kinases in tumorigenesis: re-considering ROCK inhibition for cancer therapy. *EMBO Rep*, *13*(10), 900-908. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.127>
- Reitsma, S., Slaaf, D. W., Vink, H., van Zandvoort, M. A. M. J., & oude Egbrink, M. G. A. (2007). The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *454*(3), 345-359. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0212-8>
- Reusch, P., Barleon, B., Weindel, K., Martiny-Baron, G., Gödde, A., Siemeister, G., & Marmé, D. (2001). Identification of a soluble form of the angiopoietin receptor TIE-2 released from endothelial cells and present in human blood. *Angiogenesis*, *4*(2), 123-131. <https://doi.org/10.1023/a:1012226627813>
- Rocheffort, P., Chabaud, S., Pierga, J. Y., Tredan, O., Brain, E., Bidard, F. C., Schiffler, C., Polena, H., Khalil-Mgharbel, A., Vilgrain, I., & Bachelot, T. (2017). Soluble VE-cadherin in metastatic breast cancer: an independent prognostic factor for both progression-free survival and overall survival. *Br J Cancer*, *116*(3), 356-361. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.427>
- Saharinen, P., Eklund, L., & Alitalo, K. (2017). Therapeutic targeting of the angiopoietin-TIE pathway. *Nat Rev Drug Discov*, *16*(9), 635-661. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.278>
- Saharinen, P., Eklund, L., Miettinen, J., Wirkkala, R., Anisimov, A., Winderlich, M., Nottebaum, A., Vestweber, D., Deutsch, U., Koh, G. Y., Olsen, B. R., & Alitalo, K. (2008). Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts. *Nature Cell Biology*, *10*(5), 527-537. <https://doi.org/10.1038/ncb1715>
- Salomon, D., Ayalon, O., Patel-King, R., Hynes, R. O., & Geiger, B. (1992). Extrajunctional distribution of N-cadherin in cultured human endothelial cells. *J Cell Sci*, *102* (Pt 1), 7-17. <https://doi.org/10.1242/jcs.102.1.7>
- Sato, T. N., Qin, Y., Kozak, C. A., & Audus, K. L. (1993). Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(20), 9355-9358. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.20.9355>
- Schnürch, H., & Risau, W. (1993). Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. *Development*, *119*(3), 957-968. <https://doi.org/10.1242/dev.119.3.957>
- Schulz, B., Pruessmeyer, J., Maretzky, T., Ludwig, A., Blobel, C. P., Saftig, P., & Reiss, K. (2008). ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circ Res*, *102*(10), 1192-1201. <https://doi.org/10.1161/circresaha.107.169805>
- Shen, J., Frye, M., Lee, B. L., Reinardy, J. L., McClung, J. M., Ding, K., Kojima, M., Xia, H., Seidel, C., Lima e Silva, R., Dong, A., Hackett, S. F., Wang, J., Howard, B. W., Vestweber, D., Kontos, C. D., Peters, K. G., & Campochiaro, P. A. (2014). Targeting VE-PTP activates TIE2 and stabilizes the ocular vasculature. *J Clin Invest*, *124*(10), 4564-4576. <https://doi.org/10.1172/jci74527>

- Simon, D. B., Lu, Y., Choate, K. A., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., Casari, G., Bettinelli, A., Colussi, G., Rodriguez-Soriano, J., McCredie, D., Milford, D., Sanjad, S., & Lifton, R. P. (1999). Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science*, 285(5424), 103-106. <https://doi.org/10.1126/science.285.5424.103>
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Cooper-Smith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubenfeld, G. D., van der Poll, T., Vincent, J. L., & Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama*, 315(8), 801-810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>
- Soady, K. J., Tornillo, G., Kendrick, H., Meniel, V., Olijnyk-Dallis, D., Morris, J. S., Stein, T., Gusterson, B. A., Isacke, C. M., & Smalley, M. J. (2017). The receptor protein tyrosine phosphatase PTPRB negatively regulates FGF2-dependent branching morphogenesis. *Development*, 144(20), 3777-3788. <https://doi.org/10.1242/dev.149120>
- Souma, T., Thomson, B. R., Heinen, S., Carota, I. A., Yamaguchi, S., Onay, T., Liu, P., Ghosh, A. K., Li, C., Eremina, V., Hong, Y. K., Economides, A. N., Vestweber, D., Peters, K. G., Jin, J., & Quaggin, S. E. (2018). Context-dependent functions of angiopoietin 2 are determined by the endothelial phosphatase VEPTP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(6), 1298-1303. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714446115>
- Spindler, V., Schlegel, N., & Waschke, J. (2010). Role of GTPases in control of microvascular permeability. *Cardiovasc Res*, 87(2), 243-253. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq086>
- Takahashi, K., Kim, R., Lauhan, C., Park, Y., Nguyen, N. G., Vestweber, D., Dominguez, M. G., Valenzuela, D. M., Murphy, A. J., Yancopoulos, G. D., Gale, N. W., & Takahashi, T. (2017). Expression of receptor-type protein tyrosine phosphatase in developing and adult renal vasculature. *PLOS ONE*, 12(5), e0177192. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177192>
- Takakura, N., Huang, X. L., Naruse, T., Hamaguchi, I., Dumont, D. J., Yancopoulos, G. D., & Suda, T. (1998). Critical role of the TIE2 endothelial cell receptor in the development of definitive hematopoiesis. *Immunity*, 9(5), 677-686. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80665-2](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80665-2)
- Takase, H., Chou, S. H., Hamanaka, G., Ohtomo, R., Islam, M. R., Lee, J. W., Hsu, L., Mathew, J., Reyes-Bricio, E., Hayakawa, K., Xing, C., Ning, M. M., Wang, X., Arai, K., Lo, E. H., & Lok, J. (2020). Soluble vascular endothelial-cadherin in CSF after subarachnoid hemorrhage. *Neurology*, 94(12), e1281-e1293. <https://doi.org/10.1212/wnl.00000000000008868>
- Takeichi, M. (1988). The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*, 102(4), 639-655. <https://doi.org/10.1242/dev.102.4.639>
- Thoreson, M. A., Anastasiadis, P. Z., Daniel, J. M., Ireton, R. C., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., Hummingbird, D. K., & Reynolds, A. B. (2000). Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J Cell Biol*, 148(1), 189-202. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.1.189>
- Thurston, G., & Daly, C. (2012). The complex role of angiopoietin-2 in the angiopoietin signaling pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(9), a006550. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006550>

- Tillet, E., Vittet, D., Féraud, O., Moore, R., Kemler, R., & Huber, P. (2005). N-cadherin deficiency impairs pericyte recruitment, and not endothelial differentiation or sprouting, in embryonic stem cell-derived angiogenesis. *Exp Cell Res*, *310*(2), 392-400. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.08.021>
- Tornavaca, O., Chia, M., Dufton, N., Almagro, L. O., Conway, D. E., Randi, A. M., Schwartz, M. A., Matter, K., & Balda, M. S. (2015). ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. *J Cell Biol*, *208*(6), 821-838. <https://doi.org/10.1083/jcb.201404140>
- Totsukawa, G., Yamakita, Y., Yamashiro, S., Hartshorne, D. J., Sasaki, Y., & Matsumura, F. (2000). Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol*, *150*(4), 797-806. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.4.797>
- Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M., & Narumiya, S. (1997). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*, *389*(6654), 990-994. <https://doi.org/10.1038/40187>
- van Horck, F. P. G., Ahmadian, M. R., Haeusler, L. C., Moolenaar, W. H., & Kranenburg, O. W. (2001). Characterization of p190RhoGEF, A RhoA-specific Guanine Nucleotide Exchange Factor That Interacts with Microtubules*. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*, 4948 - 4956.
- Vandenbroucke, E., Mehta, D., Minshall, R., & Malik, A. B. (2008). Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann N Y Acad Sci*, *1123*, 134-145. <https://doi.org/10.1196/annals.1420.016>
- Vanlandewijck, M., He, L., Mäe, M. A., Andrae, J., Ando, K., Del Gaudio, F., Nahar, K., Lebouvier, T., Laviña, B., Gouveia, L., Sun, Y., Raschperger, E., Räsänen, M., Zarb, Y., Mochizuki, N., Keller, A., Lendahl, U., & Betsholtz, C. (2018). A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. *Nature*, *554*(7693), 475-480. <https://doi.org/10.1038/nature25739>
- Verin, A. D., Gilbert-McClain, L. I., Patterson, C. E., & Garcia, J. G. (1998). Biochemical regulation of the nonmuscle myosin light chain kinase isoform in bovine endothelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *19*(5), 767-776. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.19.5.3126>
- Verin, A. D., Patterson, C. E., Day, M. A., & Garcia, J. G. (1995). Regulation of endothelial cell gap formation and barrier function by myosin-associated phosphatase activities. *Am J Physiol*, *269*(1 Pt 1), L99-108. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1995.269.1.L99>
- Vigil, D., Kim, T. Y., Plachco, A., Garton, A. J., Castaldo, L., Pachter, J. A., Dong, H., Chen, X., Tokar, B., Campbell, S. L., & Der, C. J. (2012). ROCK1 and ROCK2 are required for non-small cell lung cancer anchorage-independent growth and invasion. *Cancer Res*, *72*(20), 5338-5347. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-11-2373>
- Waschke, J., Curry, F. E., Adamson, R. H., & Drenckhahn, D. (2005). Regulation of actin dynamics is critical for endothelial barrier functions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *288*(3), H1296-1305. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00687.2004>
- Weng, X., Chen, W., Hu, W., Xu, K., Qi, L., Chen, J., Lu, D., Shao, Y., Zheng, X., Ye, C., & Zheng, S. (2019). PTPRB promotes metastasis of colorectal carcinoma via inducing epithelial-mesenchymal transition. *Cell Death Dis*, *10*(5), 352. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1554-9>
- Winderlich, M., Keller, L., Cagna, G., Broermann, A., Kamenyeva, O., Kiefer, F., Deutsch, U., Nottebaum, A. F., & Vestweber, D. (2009). VE-PTP controls blood

- vessel development by balancing Tie-2 activity. *J Cell Biol*, 185(4), 657-671. <https://doi.org/10.1083/jcb.200811159>
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Kraus, J., Rascher-Eggstein, G., Liebner, S., Hamm, S., Duffner, F., Grote, E. H., Risau, W., & Engelhardt, B. (2003). Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol*, 105(6), 586-592. <https://doi.org/10.1007/s00401-003-0688-z>
- Wolinsky, H. (1980). A proposal linking clearance of circulating lipoproteins to tissue metabolic activity as a basis for understanding atherogenesis. *Circ Res*, 47(3), 301-311. <https://doi.org/10.1161/01.res.47.3.301>
- Wrobel, T., Mazur, G., Wolowiec, D., Jazwicz, B., Sowinska, E., & Kuliczowski, K. (2006). sVE-cadherin and sCD146 serum levels in patients with multiple myeloma. *Clin Lab Haematol*, 28(1), 36-39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2257.2006.00756.x>
- Xiao, K., Allison, D. F., Kottke, M. D., Summers, S., Sorescu, G. P., Faundez, V., & Kowalczyk, A. P. (2003). Mechanisms of VE-cadherin processing and degradation in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 278(21), 19199-19208. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211746200>
- Xu, H., Liu, P., Liang, L., Danesh, F. R., Yang, X., Ye, Y., Zhan, Z., Yu, X., Peng, H., & Sun, L. (2006). RhoA-mediated, tumor necrosis factor alpha-induced activation of NF-kappaB in rheumatoid synoviocytes: inhibitory effect of simvastatin. *Arthritis Rheum*, 54(11), 3441-3451. <https://doi.org/10.1002/art.22169>
- Xu, M., Xu, H. H., Lin, Y., Sun, X., Wang, L. J., Fang, Z. P., Su, X. H., Liang, X. J., Hu, Y., Liu, Z. M., Cheng, Y., Wei, Y., Li, J., Li, L., Liu, H. J., Cheng, Z., Tang, N., Peng, C., Li, T., . . . Zhou, W. J. (2019). LECT2, a Ligand for Tie1, Plays a Crucial Role in Liver Fibrogenesis. *Cell*, 178(6), 1478-1492.e1420. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.021>
- Yabkowitz, R., Meyer, S., Yanagihara, D., Brankow, D., Staley, T., Elliott, G., Hu, S., & Ratzkin, B. (1997). Regulation of tie receptor expression on human endothelial cells by protein kinase C-mediated release of soluble tie. *Blood*, 90(2), 706-715.
- Yanagisawa, M., Kaverina, I. N., Wang, A., Fujita, Y., Reynolds, A. B., & Anastasiadis, P. Z. (2004). A novel interaction between kinesin and p120 modulates p120 localization and function. *J Biol Chem*, 279(10), 9512-9521. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310895200>
- Yap, A. S., Niessen, C. M., & Gumbiner, B. M. (1998). The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol*, 141(3), 779-789. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.3.779>
- Yu, A. S., Enck, A. H., Lencer, W. I., & Schneeberger, E. E. (2003). Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation. *J Biol Chem*, 278(19), 17350-17359. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213286200>
- Yu, W. K., McNeil, J. B., Wickersham, N. E., Shaver, C. M., Bastarache, J. A., & Ware, L. B. (2019). Vascular endothelial cadherin shedding is more severe in sepsis patients with severe acute kidney injury. *Crit Care*, 23(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2315-y>
- Yu, W. K., McNeil, J. B., Wickersham, N. E., Shaver, C. M., Bastarache, J. A., & Ware, L. B. (2021). Angiopoietin-2 outperforms other endothelial biomarkers associated

- with severe acute kidney injury in patients with severe sepsis and respiratory failure. *Crit Care*, 25(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s13054-021-03474-z>
- Yuan, H. T., Khankin, E. V., Karumanchi, S. A., & Parikh, S. M. (2009). Angiopoietin 2 Is a Partial Agonist/Antagonist of Tie2 Signaling in the Endothelium. *Molecular and Cellular Biology*, 29(8), 2011-2022. <https://doi.org/doi:10.1128/MCB.01472-08>
- Zhang, R. Y., Liu, Y. Y., Li, L., Cui, W., Zhao, K. J., Huang, W. C., Gu, X. W., Liu, W., Wu, J., Min, D., Mao, E. Q., & Tang, Y. Q. (2010). Increased levels of soluble vascular endothelial cadherin are associated with poor outcome in severe sepsis. *J Int Med Res*, 38(4), 1497-1506. <https://doi.org/10.1177/147323001003800433>
- Zhang, Y., Kontos, C. D., Annex, B. H., & Popel, A. S. (2019). Angiopoietin-Tie Signaling Pathway in Endothelial Cells: A Computational Model. *iScience*, 20, 497-511. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.10.006>
- Zhang, Y., Kontos, C. D., Annex, B. H., & Popel, A. S. (2021). A systems biology model of junctional localization and downstream signaling of the Ang-Tie signaling pathway. *NPJ Syst Biol Appl*, 7(1), 34. <https://doi.org/10.1038/s41540-021-00194-6>
- Zheng, X., Zhang, W., & Hu, X. (2018). Different concentrations of lipopolysaccharide regulate barrier function through the PI3K/Akt signalling pathway in human pulmonary microvascular endothelial cells. *Scientific Reports*, 8(1), 9963. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28089-3>
- Zhurinsky, J., Shtutman, M., & Ben-Ze'ev, A. (2000). Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles. *J Cell Sci*, 113 (Pt 18), 3127-3139. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.18.3127>

8 **Abbildungsverzeichnis**

| | |
|--|----|
| Abbildung 1-1: Aufbau des Endothels: die Abbildung zeigt schematisch wie die einzelnen Endothelzellen benachbart aneinanderliegen. Die Barrierefunktion wird durch die Glykokalix und die Zell-Zellkontakte gebildet. In der Inflammation wird der parazelluläre Spalt geöffnet („inflammatorische Lücke“). Dieser wird genau wie der transzelluläre Transport unter physiologischen Bedingungen genutzt. | 10 |
| Abbildung 1-2: VE-Cadherin Komplex (mit freundlicher Genehmigung von Journal of Cell Science; Dejana et al., 2008)..... | 14 |
| Abbildung 1-3: Aufbau von VE-PTP. Links/extrazellulär befinden sich FNIII ähnliche Wiederholungen, gefolgt von der transmembranären Domäne (TM), sowie rechts die intrazelluläre katalytische Domäne..... | 17 |
| Abbildung 1-4: Aufbau von Angiopoetin (mit freundlicher Genehmigung von Elsevier; verändert nach Fagiani & Christofori, 2013)..... | 19 |
| Abbildung 1-5:Aufbau Tie-2-Rezeptor und Angiopoetin, sowie Darstellung der Ang/Tie-2 Bindung (mit freundlicher Genehmigung von Elsevier; Fagiani & Christofori, 2013). | 23 |
| Abbildung 1-6: Rho-ROCK-Signalweg | 25 |
| Abbildung 4-1: Klonierungsstrategie Nr.1. direktionale Klonierung von PCR-Produkten mit der Gateway Technologie (mit freundlicher Genehmigung von ThermoFisher). | 35 |
| Abbildung 5-1: Schematische Abbildung der Generierung von sVE-Cadherin ^{EC1-5} | 47 |
| Abbildung 5-2: Western Blot Analyse von Lysaten und Überstände von CHO-Zellen, die entweder nicht oder mit dem Konstrukt pcDNA-DEST47_EC1-5 transfiziert wurden. | 48 |
| Abbildung 5-3: Effekt von sVE-Cadherin ^{EC1-5} auf die Integrität der Endothelbarriere. | 49 |
| Abbildung 5-4: Permeabilitätsmessung über einen HDMEC Zellrasen via FITC-Dextran (70 kDa) Flux. | 50 |
| Abbildung 5-5: Immunfluoreszenzfärbung einer HDMEC Zellkultur..... | 51 |
| Abbildung 5-6: Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung aus Abbildung 5-5..... | 52 |
| Abbildung 5-7: Western Blot Analyse der extra- und intrazellulären Domäne von VE-Cadherin nach der Behandlung mit sVE-Cadherin ^{EC1-5} [130 ng/ml]. | 53 |
| Abbildung 5-8: Analyse der sVE-Cadherin ^{EC1-5} Effekte auf α -Catenin..... | 54 |
| Abbildung 5-9: Analyse des Effekts von sVE-Cadherin ^{EC1-5} auf β -Catenin..... | 56 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 5-10: Analyse des Effekts von sVE-Cadherin ^{EC1-5} auf die Interaktion zwischen β -Catenin und VE-Cadherin. | 58 |
| Abbildung 5-11: Analyse des Effekts von sVE-Cadherin ^{EC1-5} auf γ -Catenin. | 60 |
| Abbildung 5-12: Analyse des Effekts von sVE-Cadherin ^{EC1-5} auf δ -Catenin. | 62 |
| Abbildung 5-13: Analyse des Effekts von sVE-Cadherin auf ZO-1. | 64 |
| Abbildung 5-14: Analyse des Effekts von sVE-Cadherin ^{EC1-5} auf N-Cadherin. | 65 |
| Abbildung 5-15: Analyse des Effekts von sVE-Cadherin ^{EC1-5} auf VE-PTP und dessen Interaktion mit VE-Cadherin. | 66 |
| Abbildung 5-16: Analyse des Effekts von sVE-Cadherin ^{EC1-5} und AKB9778 auf VE- Cadherin. | 68 |
| Abbildung 5-17: Analyse des Effekts von sVE-Cadherin ^{EC1-5} und AKB9778 auf α - und β -Catenin. | 69 |
| Abbildung 5-18: Analyse des Effekts von sVE-Cadherin ^{EC1-5} und Ang-1 sowie Y27632 auf VE-Cadherin. | 71 |
| Abbildung 5-19: Analyse des Effekts von sVE-Cadherin ^{EC1-5} auf GEF-H1. | 73 |
| Abbildung 5-20: Amplifikation der kodierenden Sequenz von sVE-Cadherin ^{EC1-4} | 74 |
| Abbildung 5-21: Nachweis der Integration von sVE-Cadherin ^{EC1-4} in den pDONR- Vektor. | 75 |
| Abbildung 5-22: Nachweis der Integration von sVE-Cadherin ^{EC1-4} in den pcDNA- pDEST-47 Vektor. | 76 |
| Abbildung 5-23: Sequenzier Ergebnisse von pcDNA-pDEST-47_EC1-4 und pcDNA- pDEST-47_EC3-5. | 77 |
| Abbildung 5-24: Amplifikation der kodierenden Sequenz von sVE-Cadherin ^{EC3-5} | 77 |
| Abbildung 5-25: Nachweis der Integration von sVE-Cadherin ^{EC3-5} in den pDONR Vektor. | 78 |
| Abbildung 5-26: Nachweis der Integration von sVE-Cadherin ^{EC3-5} in den pcDNA- pDEST-47-Vektor. | 79 |
| Abbildung 5-27: Amplifikation der kodierenden Sequenz von sVE-Cadherin ^{EC1-4} | 80 |
| Abbildung 5-28: Nachweis der Integration von sVE-Cadherin ^{EC1-4} in den pcDNATM 6/myc-His-B-Vektor. | 81 |
| Abbildung 5-29: Sequenzier Ergebnisse von pcDNA TM 6/myc-His B_EC1-4. | 81 |

9 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Reagenzien | 28 |
| Tabelle 2: Kits | 29 |
| Tabelle 3: Geräte | 29 |
| Tabelle 4: Material..... | 30 |
| Tabelle 5: Zellkulturmedien | 30 |
| Tabelle 6: primäre Antikörper | 30 |
| Tabelle 7: sekundäre Antikörper | 31 |
| Tabelle 8: Primer | 31 |
| Tabelle 9: Enzyme | 32 |
| Tabelle 10: Lösungen | 32 |
| Tabelle 11: Reagenzien des Reaktionsansatzes für die Phusion-PCR | 33 |
| Tabelle 12: Phusion-PCR-Thermocycler Programm | 34 |
| Tabelle 13: Reagenzien des Reaktionsansatzes für die Verifizierungs-PCR | 34 |
| Tabelle 14: Verifizierungs-PCR-Thermocycler Programm. | 34 |
| Tabelle 15: Reagenzien der BP-Rekombinationsansätze. | 36 |
| Tabelle 16: Reagenzien der LR-Rekombinationsansätze..... | 36 |
| Tabelle 17: Konzentration der Behandlungsreagenzien..... | 41 |
| Tabelle 18: Verwendete Lysepuffer. | 43 |
| Tabelle 19: Pipettierschema der Albumin Standardreihe. | 44 |

10 Publikationslist

Juna-Lisa Knop, Natalie Burkard, Mahshid Danesh, Thomas Dandekar, Mugdha Srivastava, Matthias Hiermaier, Jens Waschke, Sven Flemming, Nicolas Schlegel (2023). Soluble VE-cadherin disrupts endothelial barrier function via VE-PTP/RhoA signalling. Submitted to iScience. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2022.10.17.512494>

Hankir, M. K., Rotzinger, L., Nordbeck, A., Corteville, C., Dischinger, U., Knop, J. L., Hoffmann, A., Otto, C., & Seyfried, F. (2021). Leptin Receptors Are Not Required for Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery to Normalize Energy and Glucose Homeostasis in Rats. *Nutrients*, 13(5), 1544. <https://doi.org/10.3390/nu13051544>

11 Curriculum Vitae

12 Appendix

12.1 Sequenzen

EC1-5

ORIGIN

1 mqrllmmlat sgaclgllav aavaaganp aqrdthslp thrrqkrdwi wnmhideek
61 ntslphhvgk ikssvsrkna kyllkgeyvg kvfrvdaetg dvfaierldr eniseyhlt
121 vivdkdtgen letpsstik vhdvndnwpv fthrlfnasv pessavgtsv isvtavdadd
181 ptvgdhasvm yqilkgkeyf aidnsgriit itksldrekq aryeivvear daqglrgdsg
241 tatvltlqd indnfpffftq tkytfvvped trvgtsvgsf fvedpdepqn rmtkysilrg
301 dyqdaftiet npahnegiik pmkpdyeyi qqysfiveat dptidlryms ppagnraqvi
361 initdvdepp ifqqpfyhfq lkenqkkpli gtvlamdpda arhsigysir rtsdkgqffr
421 vtckgdiyne keldrevypw ynlteakel dstgtptgke sivqvhievl dendnapefa
481 kpyqpkvcen avhgqlvlqi saidkditpr nvkfkftlnt ennfiltndh dntanitvky
541 gqfdrehtkv hflpvvisdn gmpsrstgtst ltavackene qgeftfcedm aaqvgvsiaq
601 vvaillcilt itvitlilf rrlrkqara hgksvpeihe qlvtydeegg gemdttsydv
661 svlnsvrrgg akpprpalda rpslyaqvqk pprhapgahg gpgemaamie vkkdeahdg
721 dgppydtlhi ygyegsesia eslsslgt dsdsvdydfl ndwgprfkml aelygsdpre
781 elly

EC1-4

1 mqrllmmlat sgaclgllav aavaaganp aqrdthslp thrrqkrdwi wnmhideek
61 ntslphhvgk ikssvsrkna kyllkgeyvg kvfrvdaetg dvfaierldr eniseyhlt
121 vivdkdtgen letpsstik vhdvndnwpv fthrlfnasv pessavgtsv isvtavdadd
181 ptvgdhasvm yqilkgkeyf aidnsgriit itksldrekq aryeivvear daqglrgdsg
241 tatvltlqd indnfpffftq tkytfvvped trvgtsvgsf fvedpdepqn rmtkysilrg
301 dyqdaftiet npahnegiik pmkpdyeyi qqysfiveat dptidlryms ppagnraqvi
361 initdvdepp ifqqpfyhfq lkenqkkpli gtvlamdpda arhsigysir rtsdkgqffr
421 vtckgdiyne keldrevypw ynlteakel dstgtptgke sivqvhievl dendnapefa
481 kpyqpkvcen avhgqlvlqi saidkditpr nvkfkftlnt ennfiltndh dntanitvky
541 gqfdrehtkv hflpvvisdn gmpsrstgtst ltavackene qgeftfcedm aaqvgvsiaq
601 vvaillcilt itvitlilf rrlrkqara hgksvpeihe qlvtydeegg gemdttsydv
661 svlnsvrrgg akpprpalda rpslyaqvqk pprhapgahg gpgemaamie vkkdeahdg
721 dgppydtlhi ygyegsesia eslsslgt dsdsvdydfl ndwgprfkml aelygsdpre
781 elly

EC3-5

1 mqrllmmlat sgaclgllav aavaaganp aqrdthslp thrrqkrdwi wnmhideek
61 ntslphhvgk ikssvsrkna kyllkgeyvg kvfrvdaetg dvfaierldr eniseyhlt
121 vivdkdtgen letpsstik vhdvndnwpv fthrlfnasv pessavgtsv isvtavdadd
181 ptvgdhasvm yqilkgkeyf aidnsgriit itksldrekq aryeivvear daqglrgdsg
241 tatvltlqd indnfpffftq tkytfvvped trvgtsvgsf fvedpdepqn rmtkysilrg
301 dyqdaftiet npahnegiik pmkpdyeyi qqysfiveat dptidlryms ppagnraqvi
361 initdvdepp ifqqpfyhfq lkenqkkpli gtvlamdpda arhsigysir rtsdkgqffr
421 vtckgdiyne keldrevypw ynlteakel dstgtptgke sivqvhievl dendnapefa
481 kpyqpkvcen avhgqlvlqi saidkditpr nvkfkftlnt ennfiltndh dntanitvky

541 gqfdrehtkv hflpvvisdn gmpsrtgtst ltvavckcne qgeftfcedm aaqvgvsiaq
601 vvaillcilt itvitllifl rrlrkqara hgksvpeihe qlvtydeegg gemdttsydv
661 svlnsvrrgg akpprpalda rpslyaqvqk pprhapgahg gpgemaamie vkkdeadhdg
721 dgppydtlhi ygyegesia eslsslgt dsdsvdydfl ndwgprfkml aelygsdpre
781 elly

FASTA

EC1-5

Mqrlmmlatsgaclglavaavaaganpaqrdthslpthrrqkrdwiwnqmhideek-
ntslphhvgkikssvsrknakyllkgeyvgkvfrvdaetgdvfaierldreniseyhltavivdkdtgenletpssftikvhd
vndnwpvfthrlfnasvpessavgtsvisvtavdaddptvgdhasvmyqilkgkeyfaids-
griititksldrekqaryeivveardaaglrqdsztatvltlqndnfpfftqkytfvvpedtrvgtsvgsfvedpdepqn
rmtkysilrgdyqdaftietnpahnegiikpmkpldyeyiqqysfi veatdptidlrymsp-
pagnraqviinitdvdeppifqqpfyhfqlkenqkkpligtvlampdaarhsigysirrtsdkgqffrvtkkgdiynekel
drevypwynltveakeldstgtpgkesivqvhievlendnapefakpyqpkvce-
navhgqlvlqisaidkditprnvkfkftlntennftltdnhdntanitvkygqfd

EC1-4

Mqrlmmlatsgaclglavaavaaganpaqrdthslpthrrqkrdwiwnqmhideek-
ntslphhvgkikssvsrknakyllkgeyvgkvfrvdaetgdvfaierldreniseyhltavivdkdtgenletpssftikvhd
vndnwpvfthrlfnasvpessavgtsvisvtavdaddptvgdhasvmyqilkgkeyfaids-
griititksldrekqaryeivveardaaglrqdsztatvltlqndnfpfftqkytfvvpedtrvgtsvgsfvedpdepqn
rmtkysilrgdyqdaftietnpahnegiikpmkpldyeyiqqysfi veatdptidlrymsp-
pagnraqviinitdvdeppifqqpfyhfqlkenqkkpligtvlampdaarhsigysirrtsdkgqffrvtkkgdiynekel
drevypwynltveakeldstgtpgkesivqvhievlendnapefakpyqpkvce-
navhgqlvlqisaidkditprnvkfkftlntennftltdnhdntanitvkygqfd

EC-3-5

Mqrlmmlatsgaclglavaavaaganpaqrdthslpthrrqkrdwiwnqmhideek-
ntslphhvgkikssvsrknakyllkgeyvgkvfrvdaetgdvfaierldreniseyhltavivdkdtgenletpssftikvhd
vndnwpvfthrlfnasvpessavgtsvisvtavdaddptvgdhasvmyqilkgkeyfaids-
griititksldrekqaryeivveardaaglrqdsztatvltlqndnfpfftqkytfvvpedtrvgtsvgsfvedpdepqn
rmtkysilrgdyqdaftietnpahnegiikpmkpldyeyiqqysfi veatdptidlrymsp-
pagnraqviinitdvdeppifqqpfyhfqlkenqkkpligtvlampdaarhsigysirrtsdkgqffrvtkkgdiynekel
drevypwynltveakeldstgtpgkesivqvhievlendnapefakpyqpkvce-
navhgqlvlqisaidkditprnvkfkftlntennftltdnhdntanitvkygqfd

EC3-5

>EMBOSS_001

ATGCAGAGGCTGATGATGCTGCTGGCCACAGCGGCGCCTGCCTGGGCCTGC
TGGCCGTGGCCGCCGTGGCCGCCGCCGGCGCCAACCCCGCCCAGAGGGACA
CCCACAGCCTGCTGCCACCCACAGGAGGCAGAAGAGGGACTGGATCTGGA
ACCAGATGCACATCGACGAGGAGAAGAACACCAGCCTGCCCCACCACGTGG
GCAAGATCAAGAGCAGCGTGAGCAGGAAGAACGCCAAGTACCTGCTGAAG
GGCGAGTACGTGGGCAAGGTGTTTCAGGGTGGACGCCGAGACCGGGCGACGT
GTTTCGCCATCGAGAGGCTGGACAGGGAGAACATCAGCGAGTACCACCTGAC
CGCCGTGATCGTGGACAAGGACACCGGGCGAGAACCTGGAGACCCCCAGCA
GCTTACCATCAAGGTGCACGACGTGAACGACAACCTGGCCCGTGTTACCCC
ACAGGCTGTTCAACGCCAGCGTGCCCGAGAGCAGCGCCGTGGGCACCAGC
GTGATCAGCGTGACCGCCGTGGACGCCGACGCCCCACCCTGGGGCGACCA
CGCCAGCGTGATGTACCAGATCCTGAAGGGCAAGGAGTACTTCGCCATCGA
CAACAGCGGCAGGATCATCACCATCACCAAGAGCCTGGACAGGGAGAAGC
AGGCCAGGTACGAGATCGTGGTGGAGGCCAGGGACGCCCCAGGGCCTGA
GGGGCGACAGCGGCACCGCCACCCTGCTGGTGACCCTGCAGGACATCAACG
ACAACCTCCCCTTCTTACCCAGACCAAGTACACCTTCGTGGTGCCCGAGGA
CACCAGGGTGGGCACCAGCGTGGGCAGCCTGTTTCGTGGAGGACCCCGACGA
GCCCCAGAACAGGATGACCAAGTACAGCATCCTGAGGGGGCGACTACCAGG
ACGCCTTACCATCGAGACCAACCCCGCCACAACGAGGGCATCATCAAGC
CCATGAACCCCTGGACTACGAGTACATCCAGCAGTACAGCTTCATCGTGGA
GGCCACCGACCCACCATCGACCTGAGGTACATGAGCCCCCCCCGCCGGCAA
CAGGGCCCAGGTGATCATCAACATCACCGACGTGGACGAGCCCCCATCTT
CCAGCAGCCCTTCTACCACTTCCAGCTGAAGGAGAACCAGAAGAAGCCCT
GATCGGCACCGTGCTGGCCATGGACCCCGACGCCGCCAGGCACAGCATCGG
CTACAGCATCAGGAGGACCAGCGACAAGGGCCAGTTCTTCAGGGTGACCAA
GAAGGGCGACATCTACAACGAGAAGGAGCTGGACAGGGAGGTGTACCCCT
GGTACAACCTGACCGTGGAGGCCAAGGAGCTGGACAGCACCGGCACCCCC
ACCGGCAAGGAGAGCATCGTGCAGGTGCACATCGAGGTGCTGGACGAGAA
CGACAACGCCCCGAGTTCGCCAAGCCCTACCAGCCCAAGGTGTGCGAGAA
CGCCGTGCACGGCCAGCTGGTGTGCTGACGATCAGCGCCATCGACAAGGACAT
CACCCCCAGGAACGTGAAGTTCAAGTTACCCTGAACACCGAGAACAACCTT
CACCTGACCGACAACCACGACAACACCGCCAACATCACCGTGAAGTACGG
CCAGTTCGAC

EC1-4

>EMBOSS_001

ATGCAGAGGCTGATGATGCTGCTGGCCACCAGCGGCGCCTGCCTGGGCCTG
CTGGCCGTGGCCGCCGTGGCCGCCGCCGGCGCCAACCCCGCCCAGAGGGGA C
ACCCACAGCCTGCTGCCACCCACAGGAGGCAGAAGAGGGACTGGATCTGG
AACCAGATGCACATCGACGAGGAGAAGAACACCAGCCTGCCCCACCACGTG
GGCAAGATCAAGAGCAGCGTGAGCAGGAAGAACGCCAAGTACCTGCTGAA
GGGCGAGTACGTGGGCAAGGTGTTTCAGGGTGGACGCCGAGACCGGGCGACG
TGTTTCGCCATCGAGAGGCTGGACAGGGAGAACATCAGCGAGTACCACCTG
ACCGCCGTGATCGTGGACAAGGACACCGGGCGAGAACCTGGAGACCCCCAG

CAGCTTCACCATCAAGGTGCACGACGTGAACGACAACCTGGCCCGTGTTAC
CCACAGGCTGTTCAACGCCAGCGTGCCCGAGAGCAGCGCCGTGGGCACCA
GCGTGATCAGCGTGACCGCCGTGGACGCCGACACCCACCGTGGGCGACC
ACGCCAGCGTGATGTACCAGATCCTGAAGGGCAAGGAGTACTTCGCCATCG
ACAACAGCGGCAGGATCATCACCATCACCAAGAGCCTGGACAGGGAGAAG
CAGGCCAGGTACGAGATCGTGGTGGAGGCCAGGGACGCCCAGGGCCTGAG
GGGCGACAGCGGCACCGCCACCGTGCTGGTGACCCTGCAGGACATCAACGA
CAACTTCCCCTTCTTCACCCAGACCAAGTACACCTTCGTGGTGCCCGAGGAC
ACCAGGGTGGGCACCAGCGTGGGCAGCCTGTTCGTGGAGGACCCCGACGAG
CCCCAGAACAGGATGACCAAGTACAGCATCCTGAGGGGGCGACTACCAGGAC
GCCTTCACCATCGAGACCAACCCCGCCACAACGAGGGCATCATCAAGCCC
ATGAAGCCCCTGGACTACGAGTACATCCAGCAGTACAGCTTCATCGTGGAG
GCCACCGACCCACCATCGACCTGAGGTACATGAGCCCCCCCCGCCGGAAC
AGGGCCCAGGTGATCATCAACATCACCGACGTGGACGAGCCCCCATCTTC
CAGCAGCCCCTTCTACCACTTCCAGCTGAAGGAGAACCAGAAGAAGCCCCTG
ATCGGCACCGTGCTGGCCATGGACCCCGACGCCGCCAGGCACAGCATCGGC
TACAGCATCAGGAGGACCAGCGACAAGGGCCAGTTCTTCAGGGTGACCAAG
AAGGGCGACATCTACAACGAGAAGGAGCTGGACAGGGAGGTGTACCCCTG
GTACAACCTGACCGTGGAGGCCAAGGAGCTGGACAGCACCGGCACCCCA
CCGGCAAGGAGAGCATCGTGCAGGTGCACATCGAG GTGCTGGACGAGAAC-
GACAACGCCCCCGAGTTCGCCAAGCCCTACCAGCCCAAGGTGTGCGAGAAC
GCCGTGCACGGCCAGCTGGTGTGCTGCAGATCAGCGCCATCGACAAGGACATC
ACCCCCAGGAACGTGAAGTTCAAGTTCACCCTGAACACCGAGAACAATTC
ACCCTGACCGACAACCACGACAACACCGCCAACATCACCGTGAAGTACGGC
CAGTTCGAC

pcDNA6-myc-His-B-EC1-4

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGC ACTCTCAGTACAATCT
GCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGA
GGTCGCTGAGTAGTGCGGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCT
TGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGC
TTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTT
ATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT
TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACG
ACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAAT
AGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCA
CTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTC
AATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGG
GACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGG
TGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCAGG

GGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCAC
CAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACG
CAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTC
TGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTC
ACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATC
CTAA TGC AGA GGC TCA TGA TGC TCC TCG CCA CAT CGG GCG CCT GCC
TGG GCC TGC TGG CAG TGG CAG CAG TGG CAG CAG CAG GTG CTA ACC
CTG CCC AAC GGG ACA CCC ACA GCC TGC TGC CCA CCC ACC GGC GCC
AAA AGA GAG ATT GGA TTT GGA ACC AGA TGC ACA TTG ATG AAG AGA
AAA ACA CCT CAC TTC CCC ATC ATG TAG GCA AGA TCA AGT CAA GCG
TGA GTC GCA AGA ATG CCA AGT ACC TGC TCA AAG GAG AAT ATG TGG
GCA AGG TCT TCC GGG TCG ATG CAG AGA CAG GAG ACG TGT TCG CCA
TTG AGA GGC TGG ACC GGG AGA ATA TCT CAG AGT ACC ACC TCA CTG
CTG TCA TTG TGG ACA AGG ACA CTG GTG AAA ACC TGG AGA CTC CTT
CCA GCT TCA CCA TCA AAG TTC ATG ACG TGA ACG ACA ACT GGC CTG
TGT TCA CGC ATC GGT TGT TCA ATG CGT CCG TGC CTG AGT CGT CGG CTG
TGG GGA CCT CAG TCA TCT CTG TGA CAG CAG TGG ATG CAG ACG ACC
CCA CTG TGG GAG ACC ACG CCT CTG TCA TGT ACC AAA TCC TGA AGG
GGA AAG AGT ATT TTG CCA TCG ATA ATT CTG GAC GTA TTA TCA CAA
TAA CGA AAA GCT TGG ACC GAG AGA AGC AGG CCA GGT ATG AGA TCG
TGG TGG AAG CGC GAG ATG CCC AGG GCC TCC GGG GGG ACT CGG GCA
CGG CCA CCG TGC TGG TCA CTC TGC AAG ACA TCA ATG ACA ACT TCC
CCT TCT TCA CCC AGA CCA AGT ACA CAT TTG TCG TGC CTG AAG ACA CCC
GTG TGG GCA CCT CTG TGG GCT CTC TGT TTG TTG AGG ACC CAG ATG AGC
CCC AGA ACC GGA TGA CCA AGT ACA GCA TCT TGC GGG GCG ACT ACC
AGG ACG CTT TCA CCA TTG AGA CAA ACC CCG CCC ACA ACG AGG GCA
TCA TCA AGC CCA TGA AGC CTC TGG ATT ATG AAT ACA TCC AGC AAT
ACA GCT TCA TCG TCG AGG CCA CAG ACC CCA CCA TCG ACC TCC GAT
ACA TGA GCC CTC CCG CGG GAA ACA GAG CCC AGG TCA TTA TCA ACA
TCA CAG ATG TGG ACG AGC CCC CCA TTT TCC AGC AGC CTT TCT ACC ACT
TCC AGC TGA AGC TCG AGT CTA GAG GGC CCG CGG TTC GAA CAA AAA
CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT ATG CAT ACC GGT CAT CAT CAC
CAT CAC CAT TGA GTT TAA ACC CGC TGA TCA GCC TCG ACT GTG CCT TCT

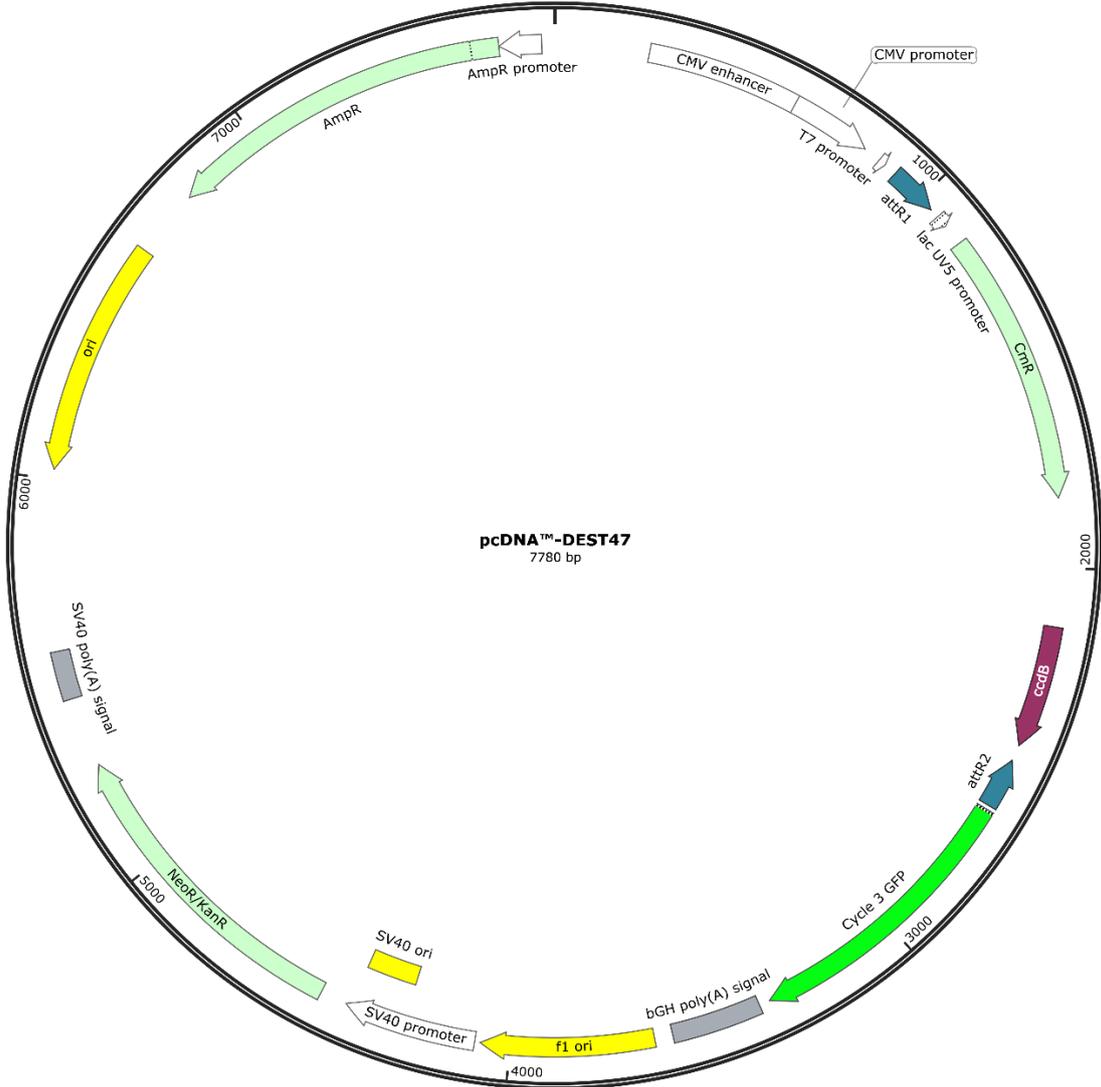
AGT TGC CAG CCA TCT GTT GTT TGC CCC TCC CCC GTG CCT TCC TTG ACC
CTG GAA GGT GCC ACT CCC ACT GTC CTT TCC TAA TAA AAT GAG GAA
ATT GCA TCG CAT TGT CTG AGT AGG TGT CAT TCT ATT CTG GGG GGT GGG
GTG GGG CAG GAC AGC AAG GGG GAG GAT TGG GAA GAC AAT AGC AGG
CAT GCT GGG GAT GCG GTG GGC TCT ATG GCT TCT GAG GCG GAA AGA
ACC AGC TGG GGC TCT AGG GGG TAT CCC CAC GCG CCC TGT AGC GGC
GCA TTA AGC GCG GCG GGT GTG GTG GTT ACG CGC AGC GTG ACC GCT
ACA CTT GCC AGC GCC CTA GCG CCC GCT CCT TTC GCT TTC TTC CCT TCC
TTT CTC GCC ACG TTC GCC GGC TTT CCC CGT CAA GCT CTA AAT CGG GGG
CTC CCT TTA GGG TTC CGA TTT AGT GCT TTA CGG CAC CTC GAC CCC AAA
AAA CTT GAT TAG GGT GAT GGT TCA CGT AGT GGG CCA TCG CCC TGA
TAG ACG GTT TTT CGC CCT TTG ACG TTG GAG TCC ACG TTC TTT AAT AGT
GGA CTC TTG TTC CAA ACT GGA ACA ACA CTC AAC CCT ATC TCG GTC TAT
TCT TTT GAT TTA TAA GGG ATT TTG CCG ATT TCG GCC TAT TGG TTA AAA
AAT GAG CTG ATT TAA CAA AAA TTT AAC GCG AAT TAA TTC TGT GGA
ATG TGT GTC AGT TAG GGT GTG GAA AGT CCC CAG GCT CCC CAG CAG
GCA GAA GTA TGC AAA GCA TGC ATC TCA ATT AGT CAG CAA CCA GGT
GTG GAA AGT CCC CAG GCT CCC CAG CAG GCA GAA GTA TGC AAA GCA
TGC ATC TCA ATT AGT CAG CAA CCA TAGTCC CGC CCC TAA CTC CGC CCA
TCC CGC CCC TAA CTC CGC CCA GTT CCG CCC ATT CTC CGC CCC ATG GCT
GAC TAA TTTT TTT TAT TTA TGC AGA GGC CGA GGC CGC CTC TGC CTC
TGA GCT ATT CCA GAA GTA GTG AGG AGG CTT TTT TGG AGG CCT AGG
CTTT TGC AAA AAG CTC CCG GGA GCT TGT ATA TCC ATT TTC GGA TCT
GAT CAG CAC GTG TTG ACA ATT AAT CAT CGGC ATA GTA TAT CGG CAT
AGT ATA ATA CGA CAA GGT GAG GAA CTA AAC CAT GGC CAA GCC TTT
GTC TCA AGA AGA ATC CAC CCT CAT TGA AAG AGC AAC GGC TAC AAT
CAA CAGC ATC CCC ATC TCT GAA GAC TAC AGC GTC GCC AGC GCA GCT
CTC TCT AGC GAC GGC CGC ATC TTC ACT GGT GTC AAT GTA TAT CAT TTT
ACT GGG GGA CCT TGT GCA GAA CTC GTG GTG CTG GGC ACT GCT GCT
GCT GCG GCA GCT GGC AAC CTG ACT TGT ATC GTC GCG ATC GGA AAT
GAG AAC AGG GGC ATC TTG AGC CCC TGC GGA CGG TGC CGA CAG GTG
CTT CTC GAT CTG CAT CCT GGG ATC AAA GCC ATA GTG AAG GAC AGT
GAT GGA CAG CCG ACG GCA GTT GGG ATT CGT GAA TTG CTG CCC TCT

GGT TAT GTG TGG GAG GGC TAA GCA CTT CGT GGC CGA GGA GCA GGA
CTG ACA CGT GCT ACG AGA TTT CGA TTC CAC CGC CGC CTT CTA TGA AAG
GTT GGG CTT CGG AAT CGT TTT CCG GGA CGC CGG CTG GAT GAT CCT
CCA GCG CGG GGA TCT CAT GCT GGA GTT CTT CGC CCA CCC CAA CTT GTT
TAT TGC AGC TTA TAA TGG TTA CAA ATA AAG CAA TAG CAT CAC AAA
TTT CAC AAA TAA AGC ATT TTT TTC ACT GCA TTC TAG TTG TGG TTT GTC
CAA ACT CAT CAA TGT ATC TTA TCA TGT CTG TAT ACC GTC GAC CTC TAG
CTA GAG CTT GGC GTA ATC ATG GTC ATA GCT GTT TCC TGT GTG AAA TTG
TTA TCC GCT CAC AAT TCC ACA CAA CAT ACG AGC CGG AAG CAT AAA
GTG TAA AGC CTG GGG TGC CTA ATG AGT GAG CTA ACT CAC ATT AAT
TGC GTT GCG CTC ACT GCC CGC TTT CCA GTC GGG AAA CCT GTC GTG CCA
GCT GCA TTA ATG AAT CGG CCA ACG CGC GGG GAG AGG CGG TTT GCG
TAT TGG GCG CTC TTC CGC TTC CTC GCT CAC TGA CTC GCT GCG CTC GGT
CGT TCG GCT GCG GCG AGC GGT ATC AGC TCA CTC AAA GGC GGT AAT
ACG GTT ATC CAC AGA ATC AGG GGA TAA CGC AGG AAA GAA CAT GTG
AGC AAA AGG CCA GCA AAA GGC CAG GAA CCG TAA AAA GGC CGC GTT
GCT GGC GTT TTT CCA TAG GCT CCG CCC CCC TGA CGA GCA TCA CAA
AAA TCG ACG CTC AAG TCA GAG GTG GCG AAA CCC GAC AGG ACT ATA
AAG ATA CCA GGC GTT TCC CCC TGG AAG CTC CCT CGT GCG CTC TCC TGT
TCC GAC CCT GCC GCT TAC CGG ATA CCT GTC CGC CTT TCT CCC TTC GGG
AAG CGT GGC GCT TTC TCA TAG CTC ACG CTG TAG GTA TCT CAG TTC GGT
GTA GGT CGT TCG CTC CAA GCT GGG CTG TGT GCA CGA ACC CCC CGT
TCA GCC CGA CCG CTG CGC CTT ATC CGG TAA CTA TCG TCT TGA GTC CAA
CCC GGT AAG ACA CGA CTT ATC GCC ACT GGC AGC AGC CAC TGG TAA
CAG GAT TAG CAG AGC GAG GTA TGT AGGCG GTG CTA CAG AGT TCT TGA
AGT GGT GGC CTA ACT ACG GCT ACA CTA GAA GAA CAG TAT TTG GTA
TCT GCG CTC TGC TGA AGC CAG TTA CCT TCG GAA AAA GAG TTG GTA
GCT CTT GAT CCG GCA AAC AAA CCA CCG CTG GTA GCG GTG GTT TTT TTG
TTT GCA AGC AGC AGA TTA CGC GCA GAA AAA AAG GAT CTC AAG AAG
ATC CTT TGA TCT TTT CTA CGG GGT CTG ACG CTC AGT GGA ACG AAA ACT
CAC GTT AAG GGA TTT TGG TCA TGA GAT TAT CAA AAA GGA TCT TCA
CCT AGA TCC TTTT AAA TTA AAA ATG AAG TTT TAA ATC AAT CTA AAG
TAT ATA TGA GTA AAC TTG GTC TGA CAG TTA CCA ATG CTT AAT CAG

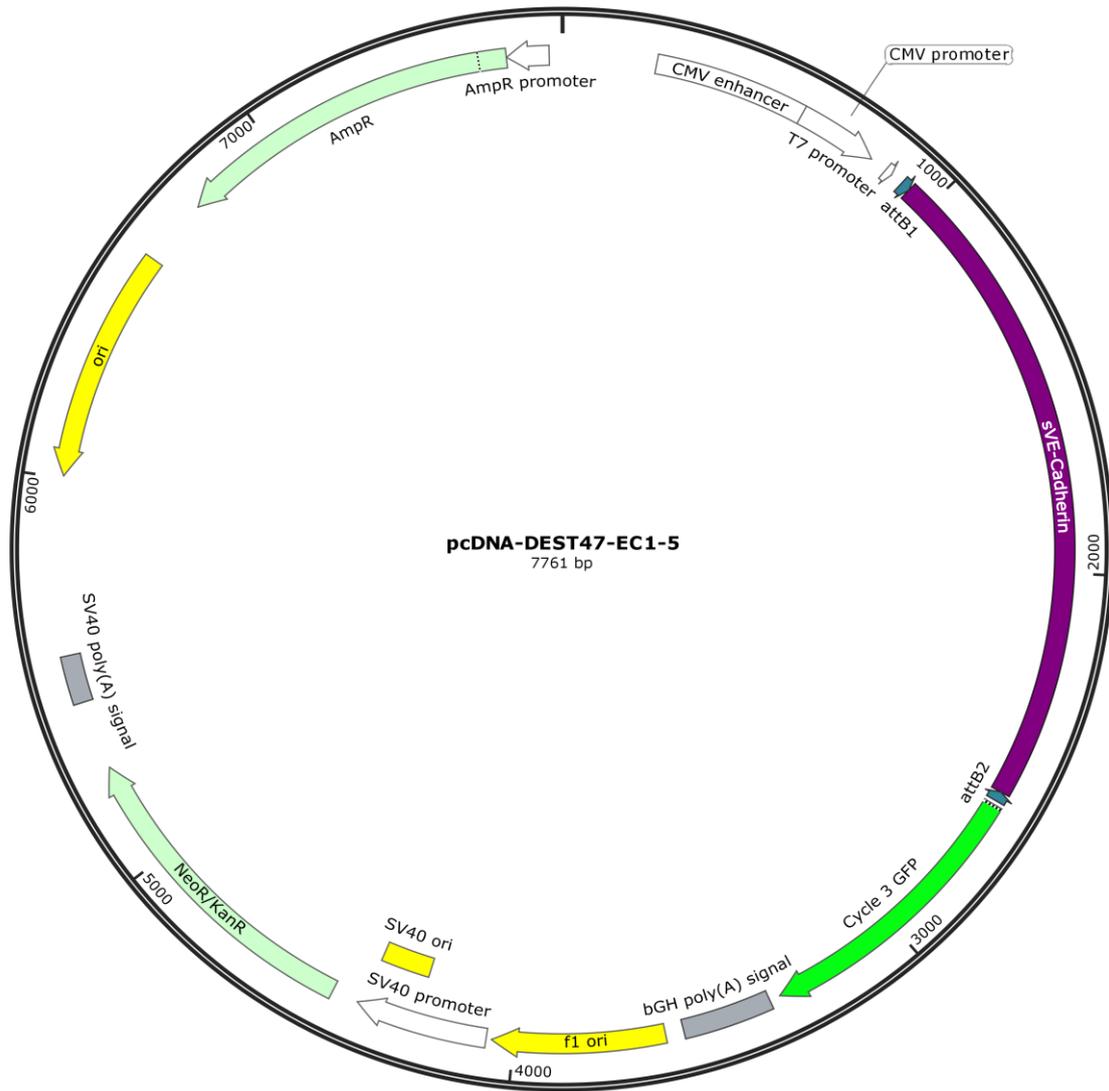
TGA GGC ACC TAT CTC AGC GAT CTG TCT ATT TCG TTC ATC CAT AGT TGC
CTG ACT CCC CGT CGT GTA GAT AAC TAC GAT ACG GGA GGG CTT ACC
ATC TGG CCC CAG TGC TGC AAT GAT ACC GCG AGA CCC ACG CTC ACC
GGC TCC AGA TTT ATC AGC AAT AAA CCA GCC AGC CGG AAG GGC CGA
GCG CAG AAG TGG TCC TGC AAC TTT ATC CGC CTC CAT CCA GTC TAT
TAAT TGT TGC CGG GAA GCT AGA GTA AGT AGT TCG CCA GTT AAT AGT
TTG CGC AAC GTT GTT GCC ATT GCT ACA GGC ATC GTG GTG TCA CGC TCG
TCG TTT GGT ATG GCT TCA TTC AGC TCC GGT TCC CAA CGA TCA AGG CGA
GTT ACA TGA TCC CCC ATG TTG TGC AAA AAA GCG GTT AGC TCC TTC GGT
CCT CCG ATC GTT GTC AGA AGT AAG TTG GCC GCA GTG TTA TCA CTC ATG
GTT ATG GCA GCA CTG CAT AAT TCT CTT ACT GTC ATG CCA TCC GTA AGA
TGC TTT TCT GTG ACT GGT GAG TAC TCA ACC AAG TCA TTC TGA GAA TAG
TGT ATG CGG CGA CCG AGT TGC TCT TGC CCG GCG TCA ATA CGG GAT
AAT ACC GCG CCA CAT AGC AGA ACT TTA AAA GTG CTC ATC ATT GGA
AAA CGT TCT TCG GGG CGA AAA CTC TCA AGG ATC TTA CCG CTG TTG
AGA TCC AGT TCG ATG TAA CCC ACT CGT GCA CCC AAC TGA TCT TCA
GCA TCT TTT ACT TTC ACC AGC GTT TCT GGG TGA GCA AAA ACA GGA
AGG CAA AAT GCC GCA AAA AAG GGA ATA AGG GCG ACA CGG AAA TGT
TGA ATA CTC ATA CTC TTC CTT TTT CAA TAT TAT TGA AGC ATT TAT CAG
GGT TAT TGT CTC ATG AGC GGA TAC ATA TTT GAA TGT ATT TAG AAA AAT
AAA CAA ATA GGG GTT CCG CGC ACA TTT CCC CGA AAA GTG CCA CCT
GAC GTC

12.2 Plasmidkarten

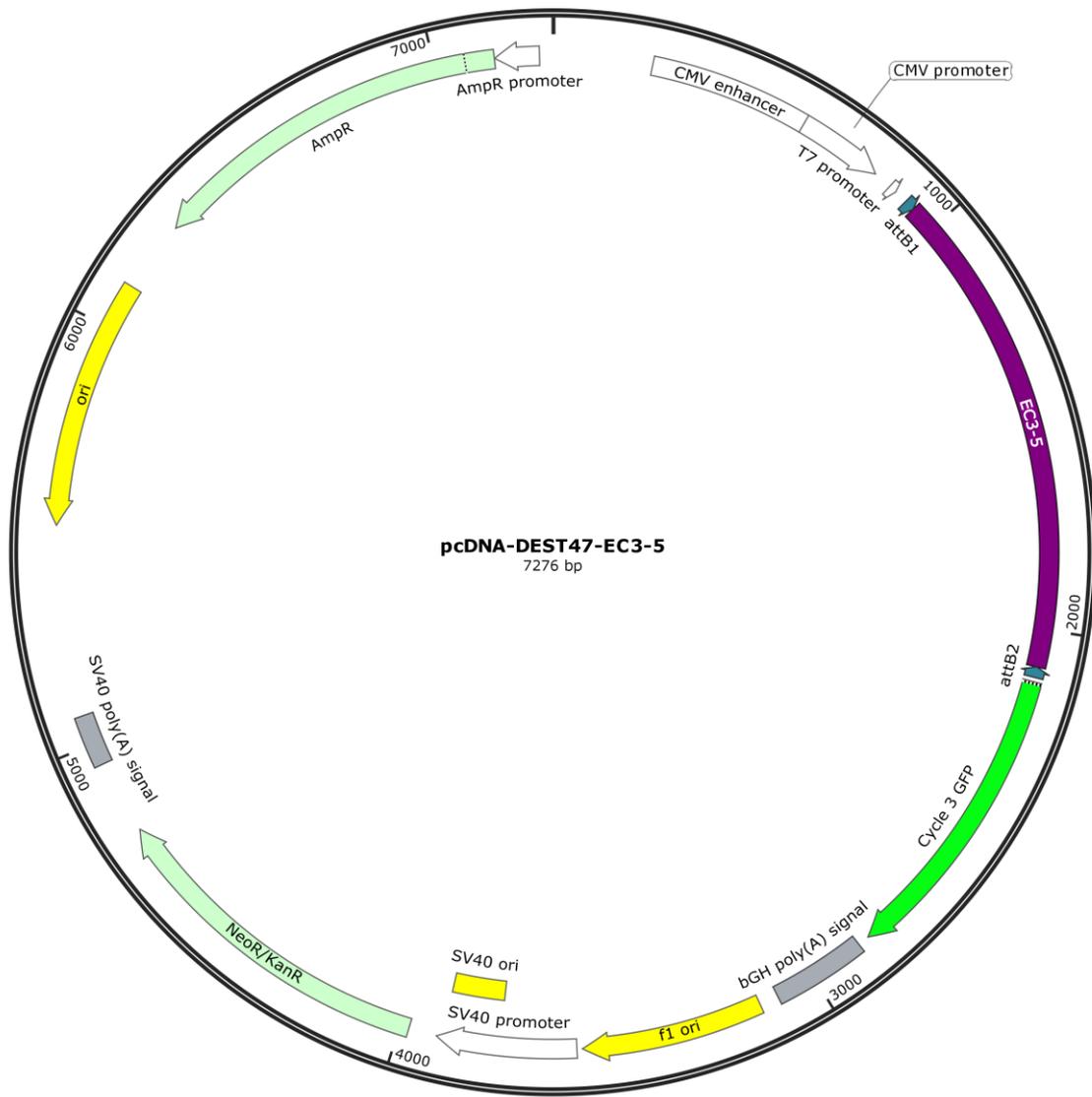
Created with SnapGene®

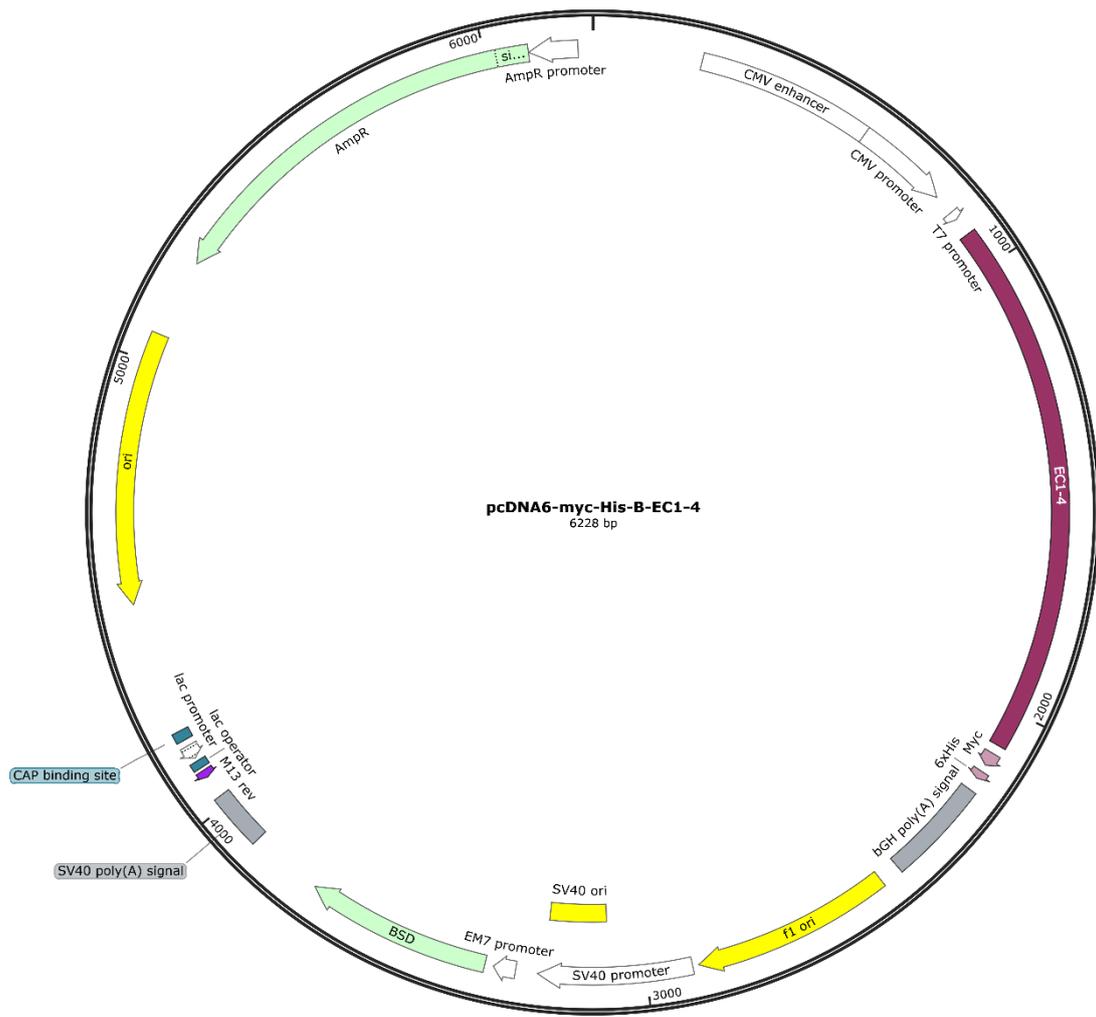












Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Untersuchungen zur Bedeutung von Spaltprodukten des vaskulär endothelialen (VE-) Cadherin als Auslöser für die Schrankenstörung des Gefäßendothels“ eigenständig, das heißt insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 22.05.2023

Ort, Datum Unterschrift