

*Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der
Kreislaufkrankheiten
der Ludwigs-Maximilians-Universität München*

Direktor: Prof. Dr. med. P.C.Weber

*Charakterisierung podosomaler
Adhäsionsstrukturen in primären humanen
Nabelschnurendothelzellen*

*Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwigs-Maximilians-Universität zu München*

*vorgelegt von
Anna-Eleonora Osiak*

aus Breslau

2007

*Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München*

1. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. S. Linder

1. Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. U. Welsch

2. Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Schliwa

3. Mitberichterstatter: Prof. Dr. O. Steinlein

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2007

Hiermit erkläre ich, diese hier vorliegende Doktorarbeit selbstständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Anna-Eleonora Osiak

Faber est quisque fortunae suae !

*Denen, die mich auf all meinen Wegen unterstützen,
Denen, die an mich glauben*

meiner Familie

Veröffentlichungen :

Osiak AE, Zenner G, Linder S., Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Exp Cell Res.* 2005 Jul 15; 307(2):342-53.

Poster und Vorträge mit gedruckten *Abstracts*:

Osiak, A.-E., Aepfelbacher, M., Linder, S. (2003). "RhoGTPase-dependent formation of novel adhesion structures in migratory HUVEC." 4th symposium on the biology of endothelial cells, München. *Angiogenesis* 5, 350, Abstract P55

Osiak, A.-E., Linder, S. (2003). "RhoGTPase-dependent formation of novel adhesion structures in migratory HUVEC." Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie, München, Abstract P17

Osiak, A.-E., Linder, S. (2003). "RhoGTPase-dependent formation of novel adhesion structures in migratory HUVEC." 43rd meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco, Abstract P2507

Die vorliegende Arbeit wurde durch Mittel des von der DFG geförderten Graduiertenkollegs 438 sowie durch die R.-SCHNEIDER-Stiftung der Universität München unterstützt.

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	I
II.	Abkürzungsverzeichnis.....	III
1.	Einleitung.....	1
1. 1.	Endothelzellen.....	1
1. 2.	Zytoskelett.....	2
1. 3.	Aktinfilamente.....	3
1. 4.	Die Dynamik des Zytoskeletts wird durch Rho GTPasen kontrolliert.....	5
1. 5.	Arp2/3 abhängige Aktinnukleation.....	8
1. 6.	WASP-Proteinfamilie.....	10
1. 7.	Rolle des Zytoskeletts bei der Migration.....	12
1. 8.	Rolle des Zytoskeletts bei podosomalen Adhäsionsstrukturen.....	13
1. 9.	Rolle von MMPs und MT-MMPs sowie deren Inhibitoren.....	17
1. 10.	Das Aktin-modulierende Protein Drebrin.....	18
1. 11.	Zielsetzung.....	20
2.	Material.....	21
2. 1.	Geräte.....	21
2. 2.	Verbrauchsmaterial.....	22
2. 3.	Kits.....	22
2. 3. 1.	Säulen und Aufreinigungskits.....	22
2. 3. 2.	Enzyme und Enzymkits.....	22
2. 4.	Antikörper.....	23
2. 5.	Chemikalien.....	24
2. 6.	Vektoren.....	25
2. 6. 1.	Der Vektor pEGFP-C1.....	25
2. 6. 2.	mRFP.....	25
2. 6. 3.	pGEX-2T.....	25
2. 6. 4.	pMAL.....	26
2. 7.	Molekulargewichtsmarker.....	26
2. 8.	Oligonukleotide.....	26
2. 9.	Puffer und Lösungen.....	26
2. 10.	Bakterienkulturen.....	27
2. 10. 1.	Bakterienstämme.....	27
2. 10. 2.	Kulturmedien für Bakterien.....	28
2. 11.	Zellkultur.....	28
2. 11. 1.	Zelllinien - primäre Zellkultur.....	28
2. 11. 2.	Nährmedien.....	28
3.	Methoden.....	29
3. 1.	Arbeiten mit Nucleinsäuren.....	29
3. 1. 1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
3. 1. 2.	Kolonie-PCR.....	30
3. 2.	Gelelektrophorese – Qualitative Analyse der Nucleinsäurelösungen.....	30
3. 3.	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	31
3. 4.	Präzipitation von Nucleinsäuren.....	31
3. 4. 1.	Natrium-Acetatfällung von Nucleinsäuren.....	31
3. 4. 2.	Isopropanolfällung von DNA.....	31
3. 5.	Enzymatische Behandlung von DNA-Molekülen.....	32
3. 5. 1.	Verdau der DNA durch Restriktionsendonucleasen.....	32
3. 5. 2.	Ligation.....	32
3. 6.	Transformation von Bakterien.....	33
3. 7.	Herstellung elektrokompetenter Bakterien.....	33
3. 8.	Elektroporation von Plasmid-DNA.....	34
3. 9.	Plasmid-DNA-Präparation.....	34
3. 9. 1.	Plasmid-Minipräparation.....	34
3. 9. 2.	Plasmid-Midipräparation.....	34
3. 10.	Zellbiologische Arbeitsmethoden.....	34
3. 10. 1.	Isolierung und Kultivierung der humanen Nabelschnur-Zelllinie.....	34
3. 10. 2.	Zellzahlbestimmung.....	35
3. 10. 3.	Transfektion von HUVEC-Zellen.....	35
3. 10. 3. 1.	Transfektion mit Lipofectamin.....	35
3. 10. 3. 2.	Transfektion mit Amaxa.....	35

3. 11.	RNA interference (RNAi).....	36
3. 12.	Matrixverdau.....	36
3. 13.	Wund-Assay.....	36
3. 14.	Modulierende und inhibierende Substanzen.....	36
3. 15.	Immunfluoreszenz.....	37
3. 16.	Live cell imaging.....	37
3. 17.	Fluoreszenzmikroskopie.....	38
3. 18.	Herstellung von Zell-Lysaten.....	38
3. 19.	Arbeiten mit Proteinen.....	38
3. 19. 1.	Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen mittels.....	38
3. 19. 1. 1.	Expression von MBP-Fusionsproteinen.....	38
3. 19. 1. 2.	Expression des GST-Fusionspreoteins.....	38
3. 19. 2.	Pull-down.....	39
3. 19. 3.	Immunopräzipitation.....	39
3. 19. 4.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
3. 19. 5.	Silberfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen 50 % Methanol + 12 % Eisessig.....	40
3. 19. 6.	Westernblot.....	41
3. 19. 7.	Immunofärbung von PVDF-Membran.....	42
3. 19. 8.	Dialyse.....	42
3. 19. 9.	Proteinbestimmung.....	42
3. 20.	Mikroinjektion.....	43
4.	Ergebnisse.....	44
4. 1.	Charakterisierung einer Podosomen-ähnlichen Aktin-Struktur in HUVEC.....	44
4. 2.	HUVEC-Podosomen werden in migratorischen Nabelschnurendothelzellen konstitutiv generiert.....	45
4. 3.	HUVEC-Podosomen stellen eine Adhäsionsstruktur dar.....	47
4. 4.	Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) tragen zu proteolytischen Funktionalität der HUVEC- Podosomen bei.....	48
4. 5.	Intrazelluläre Verteilung von HUVEC-Podosomen.....	49
4. 6.	Die Bildung von HUVEC-Podosomen ist abhängig von der de novo-Proteinbiosynthese.....	51
4. 7.	Src-Kinase Abhängigkeit der HUVEC-Podosomen.....	52
4. 8.	Die Rolle von RhoGTPasen bei der Bildung von HUVEC-Podosomen.....	53
4. 9.	Arp2/3-Komplex vermittelte Aktinnukleation und ihre Bedeutung für die Bildung von HUVEC-Podosomen.....	56
4. 10.	Einfluß von Zytokinen auf die Bildung von Podosomen.....	57
4. 11.	PI3-Kinase ist an der Signalkaskade involviert, die die Generierung von HUVEC-Podosomen induziert.....	61
4. 12.	Drebrin nimmt eine zentrale Rolle bei der Generierung von HUVEC-Podosomen ein.....	62
4. 13.	Drebrin ist essentiell für die Bildung von HUVEC-Podosomen.....	63
4. 14.	Drebrin nimmt eine zentrale Rolle bei der Generierung von HUVEC-Podosomen ein.....	64
4. 15.	Drebrin trägt zur Ausbildung von HUVEC Netzwerken bei.....	66
4. 16.	Bindungspartner des Drebrin-Proteins.....	69
5.	Diskussion.....	70
5. 1.	Migratorische humane Nabelschnurendothelzellen bilden podosomale Adhäsionsstrukturen.....	70
5. 2.	HUVEC-Podosomen fungieren als Adhäsionsstrukturen, die Orte einer lokalen Matrixdegradierung darstellen.....	72
5. 3.	Zytokine und Monozyten stimulieren die Bildung von HUVEC-Podosomen.....	73
5. 4.	RhoGTPasen kontrollieren die Bildung von HUVEC-Podosomen.....	76
5. 5.	PI3- und Src-Kinasen beeinflussen die Bildung von HUVEC-Podosomen.....	77
5. 6.	Arp2/3-Komplex-vermittelte Aktinnukleation beeinflusst die Generierung von HUVEC-Podosomen.....	78
5. 7.	Drebrin stellt einen Marker von HUVEC-Podosomen dar und kontrolliert die Bildung dieser Strukturen.....	79
5. 8.	Drebrin kontrolliert die Bildung und Dynamik von HUVEC-Podosomen.....	80
5. 9.	Einfluß von Drebrin auf die Bildung kapillarer Netzwerke.....	82
5. 10.	Interaktionspartner von Drebrin.....	83
6.	Zusammenfassung.....	85
7.	Perspektiven.....	87
8.	Literaturverzeichnis.....	89
9.	Lebenslauf.....	100
10.	Anhang: Video-CD.....	102
11.	Danksagung.....	103

- Abbildung 1: Darstellung der Aktinfilamente.
- Abbildung 2: *Treadmilling*-Mechanismus.
- Tabelle 1: Eine Auswahl Aktin-bindender Proteine.
- Abbildung 3: GTPase Zyklus.
- Abbildung 4: Regulation der Aktinremodelierung durch monomere RhoGTPasen.
- Abbildung 5: Spontane Aktinpolymerisation.
- Abbildung 6: Aufbau und Struktur des Arp2/3-Komplexes.
- Abbildung 7: Allgemeine Domänenstruktur von N-WASP, WASP und WAVE.
- Abbildung 8: Stufen der Zellbewegung (A) und die hierbei entstehenden Protrusionen (B).
- Abbildung 9: Fokale Adhäsionen (A) und Hemidesmosomen (B).
- Abbildung 10: Podosomenmodell mit Detailansicht und Symbolerklärung.
- Abbildung 11: Domänenstruktur von MMPs.
- Abbildung 12: Diagramm der Drebrin Domänenstruktur.
- Tabelle 2: Übersicht über primäre Antikörper.
- Tabelle 3: Übersicht über sekundäre Antikörper.
- Tabelle 4: Zur Klonierung verwendete Ologonukleotide
- Tabelle 5: Im Thermocycler durchgeführter standard Reaktionsablauf und Reaktionsansatz.
- Tabelle 6: Im Thermocycler durchgeführter Reaktionsablauf.
- Tabelle 7: Trennbereiche von Agarosegelen.
- Tabelle 8: Berechnung der Transformationskompetenz kompetenter Zellen.
- Tabelle 9: Targetsequenz der eingesetzten RNAi.
- Tabelle 10: Übersicht der in den Experimenten eingesetzten Substanzen.
- Tabelle 11: Herstellung von Sammel- und Trenngelen.
- Tabelle 12: Silberfärbung.
- Tabelle 13: Charakterisierung von HUVEC-Podosomen.
- Abbildung 13: Die Ausbildung von HUVEC-Rosetten.
- Abbildung 14: HUVEC-Podosomen werden in subkonfluenten HUVEC konstitutiv gebildet.
- Abbildung 15: Ventrale Lage der HUVEC-Podosomen.
- Abbildung 16: HUVEC-Podosomen enthalten MT1-MMP und degradieren die ECM.
- Abbildung 17: Positionelle Verteilung der HUVEC-Podosomen in migrierenden HUVEC.
- Abbildung 18: HUVEC-Podosomen werden schnell und in einer konstanten Anzahl generiert.
- Abbildung 19: Für die Bildung von HUVEC-Podosomen ist eine intakte Proteinbiosynthese notwendig.
- Abbildung 20: Src-Tyrosinkinase hat einen Einfluß auf die Bildung von HUVEC-Podosomen.
- Abbildung 21: RhoGTPasen kontrollieren die Bildung von HUVEC-Podosomen.
- Abbildung 22: RhoGTPasen kontrollieren die Bildung von HUVEC-Podosomen.
- Abbildung 23: Arp2/3-Komplex vermittelte Aktinnukleation und N-WASP-Aktivität beeinflussen die Bildung von HUVEC-Podosomen.
- Abbildung 24: Einfluß von Zytokinen und Monozyten auf die Bildung von HUVEC-Podosomen.
- Abbildung 25: Zytokine und Monozyten erhöhen die Bildung von HUVEC-Podosomen.
- Abbildung 26: Zytokine erhöhen die Bildung von HUVEC-Podosomen.
- Abbildung 27: PI3-Kinase Inhibierung bewirkt eine Reduktion in der Zahl von Zellen die HUVEC-Podosomen bilden können.
- Abbildung 28: Drebrin kolokalisiert in HUVEC-Podosomen mit F-Aktin
- Abbildung 29: Drebrin-siRNA reduziert die Zahl an Zellen, die HUVEC-Podosomen enthalten.
- Abbildung 30: Domänenstruktur von DrebrinE2 (Volllänge) und der in dieser Studie konstruierten und verwendeten GST- bzw. MBP-Fusionsproteine.
- Abbildung 31: Verschiedene Drebrin-Domänen beeinflussen die Bildung von HUVEC-Podosomen.
- Abbildung 32: Drebrin lokalisiert in kapillaren Netzwerken an den Zell-Grenzen.

- Abbildung 33: Ein Mangel an Drebrin führt zur Reduktion der Netzwerkbildung in HUVEC-Kulturen.
- Abbildung 34: Interaktionen von Proteinen mit den Drebrin-Domänenteilkonstrukten.
- Abbildung 35: Modell der Architektur von HUVEC-Podosomen.
- Abbildung 36: HUVEC-Podosomen fusionieren zu Superstrukturen, den Rosetten.
- Abbildung 37: Modell der Funktion und Regulation von HUVEC-Podosomen.

II. Abkürzungsverzeichnis

A

A	Ampere
Amp	Ampicillin
amp	Ampicillin-Resistenzgen
AMV	abiäres Myoblastosis-Virus (<i>avian myoblastosis virus</i>)
aq.dest	deionisiertes destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-5'-triphosphat

B

β-Gal	β-Galactosidase
bp	Basenpaar(e)
bidest.	Bidestilliert
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise

C

cDNA	komplementäre DNA, die bei der reversen Transkription von RNA entsteht
cfu	koloniebildende Einheit (<i>colony forming unit</i>)
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (<i>calf intestine phosphatase</i>)
CMV	Cytomegalievirus

D

dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanidin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat; umfasst dATP, dCTP, dGTP und dTTP
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-5'-triphosphat

E

E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol

F

Fa.	Firma
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

G

g	Gramm
GFP	grünfluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)

H

h	Stunde
HCl	Salzsäure

K

kan	Kanamycin-Resistenzgen
kb	Kilo-Basenpaare

L	
l	Liter
LB	Luria Broth; ein Bakterienmedium
Lsg	Lösung
M	
M	Molar, mol/L
mA	Milliampere
min	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)ethansulfonsäure; Puffersubstanz
mRNA	Boten-RNS (<i>messenger RNA</i>)
μ	mikro
N	
neo	Neomycin-Resistenzgen
nt	Nucleotide
O	
OD	optische Dichte
Oligo	Oligonukleotid
ON	über Nacht
ori	Replikationsstart (<i>origin of replication</i>)
P	
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
R	
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat; ein Detergens
ssDNA	einzelsträngige DNA
SV40	Simian Virus 40
T	
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer; ein Elektrophoresepuffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
Temp.	Temperatur
T _m	DNA-Schmelztemperatur
Tris	Tris (hydroxymethyl)aminomethan; Puffersubstanz
U	
ÜNK	Übernachtkultur
U	Einheit (<i>unit</i>); Mengenangabe bei Enzymen
UV	Ultraviolett
V	
V	Volt
Vol	Volumenteile
v/v	Volumen pro Volumen bei Prozentangaben
W	
W	Watt
w/v	Masse pro Volumen bei Prozentangaben

1. Einleitung

1.1. Endothelzellen

Das Endothel kleidet als wesentlicher Bestandteil der *Tunica intima* das gesamte Blutgefäßsystem aus. Dort fungiert es als Barriere zwischen dem strömenden Blut und der glatten Muskulatur, wodurch es hämodynamische Veränderungen registrieren und verarbeiten kann. Es stellt beim Menschen das größte endokrine Organ mit einem breiten Spektrum an spezialisierten Funktionen dar. Es hat ein Gewicht von etwa 1 kg und bedeckt mit 10^{13} Zellen eine Fläche von 7 m^2 (Alberts *et al.*, 2002). Charakteristisch ist, daß trotz vieler morphologischer und funktioneller Merkmale auch eine Heterogenität des Endothels je nach Lokalisierung erkenntlich wird. In den Venen oder Arterien, sogar im gleichen Organ, kommt es zu einer gewissen Variabilität zwischen den Endothelzellen und so dem dadurch bedingten Aufbau und der Funktion des Endothels (kontinuierliches, diskontinuierliches und fenestriertes Endothel, Blut-Hirn-Schranke) (Garlanda *et al.*, 1997). Das Endothel bildet prinzipiell jedoch nicht nur eine Schranke zwischen Blut und Gewebe, denn es interagiert daneben mit dem strömenden Blut, wie z.B.: gerinnungshemmend und fibrinolytisch bei intakter Zellschicht, sowie gerinnungsfördernd bei gestörter Gewebsintegrität. Die Endothelzellen sind wesentlich an der Regulierung des Vasotonus und der Kontraktilität beteiligt (Pohl *et al.*, 1994), der Zusammensetzung der Basalmembran und dem Stoffaustausch. Weiterhin vermitteln sie immunologische Prozesse (Alberts *et al.*, 2002) und sind bei der Angiogenese involviert (Jaffe *et al.*, 1985). So ist das Endothel der Hauptregulator der vaskulären Homöostase, und übt eine Vielzahl an vasoprotektiven Effekten aus:

- 1) beim Gleichgewicht zwischen Vasodilatation und Vasokonstriktion,
- 2) bei der Migration von glatten Muskelzellen. Zumal in dieser Schicht auch die Produktion und Sekretion von Wachstumsfaktoren (*basic fibroblast growth factor*, *platelet-derived growth factor*) stattfindet.
- 3) Während der Inhibition der inflammatorischen Antwort (Thrombogenese und Fibrinolyse). Hierzu gehört u. a. der Transport und der Metabolismus von diversen Substanzen zwischen Blut und Intima, wodurch ein regulierender Einfluß auf die Gewebehomöostase ausgeübt wird. Zudem produzieren Endothelzellen sowohl Aktivatoren als auch Inhibitoren der Thrombozytenaggregation, der plasmatischen Blutgerinnung und der Fibrinolyse.
- 4) In der Barrierefunktion und Permeabilität wie auch der Adhäsion von Endothelzellen.

Im Gegensatz hierzu tritt die endotheliale Dysfunktion in Erscheinung, wenn die endotheliale Balance herabgesetzt wird und der Schaden so auf die arterielle Wand übergreift. Diese definiert einen Zustand, in welchem die vom Endothel ausgehenden und abhängigen Reaktionen nicht mehr korrekt gesteuert und induziert werden können und die Homöostase, wie z.B. an der physiologischen Barrierefunktionen des Endothels zu sehen, gestört ist. So gelangen Plasmalipoproteine wie *low density lipoproteins* und die *very low density lipoproteins*, in den subendothelialen Raum und werden beim Durchtritt durch diese Schicht oxidativ verändert. Auf den Endothelzellen werden in dieser Phase spezifische Rezeptoren exprimiert, die die Anlagerung von Monozyten und Thrombozyten bedingen. Einmal in der Intima angelangt setzen die Monozyten Sauerstoffradikale frei, die in einem *circulus vitiosus* eine gesteigerte Oxidierung der Lipoproteine bedingen und so auch die Endotheldysfunktion potenzieren. Daneben wird die Aktivität der Makrophagen gesteigert, die gehäuft oxidiertes Cholesterin aufnehmen und so als Schaumzellen (*fatty streaks*), die atherosklerotischen Läsionen generieren. Vermehrt kann dann eine Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten, sowie ein vermehrtes Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen beobachtet werden. Das Risiko, an Atherosklerose und Herz-Kreislaufkrankungen wie Ischämie, Myokardinfarkt, Schlaganfall, kongestiver Herzinsuffizienz zu erkranken, steigt demnach, wenn das Endothel in seiner Funktion eingeschränkt ist (Dzurik *et al.*, 2005; Chong *et al.*, 2006; Hayakawa *et al.*, 1997).

Endothelzellen bilden einen Zellverband aus. Besonders unter der apikalen Zellmembran ist ein dichtes Netzwerk von Aktinfilamenten vorhanden, das mit den Desmosomen der lateralen

Zellmembran verbunden ist. Wichtig für die Funktion ist, daß sich dieses Netzwerk unter Vermittlung der Haftstellen an der seitlichen Zellmembran über einen ganzen Zellverband erstrecken und dieser so als „funktionelles Synzytium“ fungieren kann. Insbesondere spielt dies bei der Entwicklung und auch bei der Wundheilung eine Rolle. Ausgangspunkt kann dabei eine Kontraktion im submembranösen Netzwerk einer einzelnen Zelle sein. Von hier aus können Kontraktionswellen dann über den ganzen Zellverband verlaufen und die Formveränderung des Verbandes bewirken (Cooper *et al.*, 2000).

Die Endothelzellen verfügen über die Fähigkeit, ihre Anzahl und Anordnung den jeweiligen Anforderungen anzupassen und so Wachstum und Reparatur von Geweben zu ermöglichen, aber auch den Aufbau neuer Gefäße. Um diese Vielfalt an Vorgängen zu ermöglichen, sezernieren sie diverse Mediatoren, Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und synthetisieren notwendige Matrixproteine. Dank den MMPs können die Zellen wachsen oder migrieren, da sie durch ihre Expression das Substrat modifizieren und/oder abbauen können. Zudem sind sie aber auch in der Lage, an der Regulation des Blutgefäßtonus teilzunehmen. Dem Endothel kommen durch die Sekretion von diversen Mediatoren zahlreiche Schlüsselfunktionen zu. Bei der Hämostase reguliert es z.B. die Produktion von Komponenten der Blutgerinnungskaskade, die Fibrinolyse, die Hemmung gerinnungsfördernder Proteine und die Produktion von Faktoren zur Plättchenaggregation. Hierzu produziert und sezerniert das Endothel die Blutgerinnungsfaktoren V und VIII sowie das Gewebethromboplastin (Faktor III), das den Blutgerinnungsfaktor VII aktiviert, der mit dem Faktor V und Ca^{2+} -Ionen eine Prozessierung von Prothrombin in Thrombin bewirkt und damit die Blutgerinnung einleitet. Bei der Fibrinolyse wird aus Plasminogen die Bildung von Plasmin eingeleitet, wobei die Endothelzellen die urokinaseartigen Plasminogen-Aktivatoren (uPA) und die Gewebsaktivatoren (tPA) sezernieren. Die Endothelzellen sezernieren bei der Thrombosebildung und -inhibition antithrombogene Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) oder das Prostacyclin (PGI_2). Im physiologischen Zustand herrscht zwischen den antithrombotischen und prothrombotischen Substanzen ein Gleichgewicht. Erst eine erniedrigte NO-Freisetzung führt zur Aktivierung von Plättchen und thrombogenen Proteinen wie den Gewebefaktoren und des PDGF (*platelet derived growth factor*). Endothelzellen synthetisieren zudem Transmittersubstanzen, die zum einen zu einer Relaxation der benachbarten glatten Muskulatur führen, wie das bereits erwähnte Stickstoffmonoxid oder Endothelin. Sie können aber auch auf der Endothelzelloberfläche lokalisiertes *angiotensin-converting-enzyme* (ACE) aus Angiotensin-I das vasokonstriktorisch aktive Angiotensin-II prozessieren (Lafleur *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; May *et al.*, 2002).

1.2. Zytoskelett

Ein entscheidender Faktor bei der progressiven Evolution von eukaryontischen Zellen ist wohl das Zytoskelett, das in allen eukaryonten Zellen aus Mikrotubuli, Aktinfilamente und intermediären Filamenten besteht. Alle Teile dieses Zytoskeletts fügen sich zu einem hochstrukturierten, dynamischen, zytoplasmatischen Netzwerk zusammen, das die Form und Funktion einer Zelle und des Gewebes beeinflusst. Zudem fungiert es im Zusammenspiel der Interaktionen zwischen den einzelnen Proteinen in und außerhalb der Zellen auch als mechanische Stütze. Die prominenteste Art einer solchen Verankerungsstruktur ist die intrazelluläre Verbindung vom Adhärenztyp (Zonula adhaerens) oder semistabile Verbindungen zur extrazellulären Matrix (fokale Komplexe, fokale Adhäsionen) (Pollard *et al.*, 2003).

Der Regulation des Zytoskeletts unterliegt eine Vielzahl von zellulären Prozessen, die die Zellmotilität und Migration, interzelluläre Adhäsion, Zellmorphogenese, intrazellulären Vesikeltransfer und Organellentransport, Zellpolarität, Endo- und Exozytose wie auch die Signaltransduktion beinhaltet. Die Beteiligung dieser Filamente in solch zeitlich und räumlich angelegten Ereignissen erfordert eine komplexe Regulation seiner Dynamik und seiner strukturellen Organisation (Aspenström *et al.*, 1999).

1.3. Aktinfilamente

Aktin, ein Protein mit einer molekularen Masse von 43 kDa, ist das häufigste Protein eukaryontischer Zellen (bis zu 5% Gesamtproteinanteil). Insgesamt gibt es sieben verschiedene Aktin-Isoformen, die jeweils charakteristisch für bestimmte Zellen sind und von einer Familie hochkonservierter Gene kodiert werden. Zu unterscheiden sind drei verschiedene Klassen wie die α -Aktine in Muskelzellen und β - wie auch γ -Aktine in Nichtmuskelzellen.

Aktin existiert sowohl in der Form des als G-Aktin bezeichneten globulären Monomers wie auch in der filamentösen Form des F-Aktin, das aus zwei helikal umeinandergewundenen Ketten von G-Aktin-Untereinheiten besteht (36 nm pro Windung). Aktinfilamente (F-Aktin) entstehen durch die Polymerisation freier globulärer Aktinmonomere, die je ein ATP und Ca^{2+} oder Mg^{2+} binden und über eine ATPase Aktivität verfügen (Alberts *et al.*, 2002). Sie sind sehr feine, einzeln gelegene, vernetzte oder gebündelte Fäden mit einem Durchmesser von 5-7 nm und einer variablen Länge. Sie stellen die dünnste filamentäre Struktur des Zytoskeletts dar und werden daher auch als Mikrofilamente (MF) bezeichnet. Obwohl Aktinfilamente überall in der Zelle anzutreffen sind, erreichen sie oft ihre höchste Konzentration unterhalb der Plasmamembran in der Zellkortex. Filamentöses Aktin erfüllt innerhalb der Zelle viele unterschiedliche Aufgaben. Die enorme Bandbreite an Funktionen wird über eine große Anzahl aktinbindender Proteine reguliert.

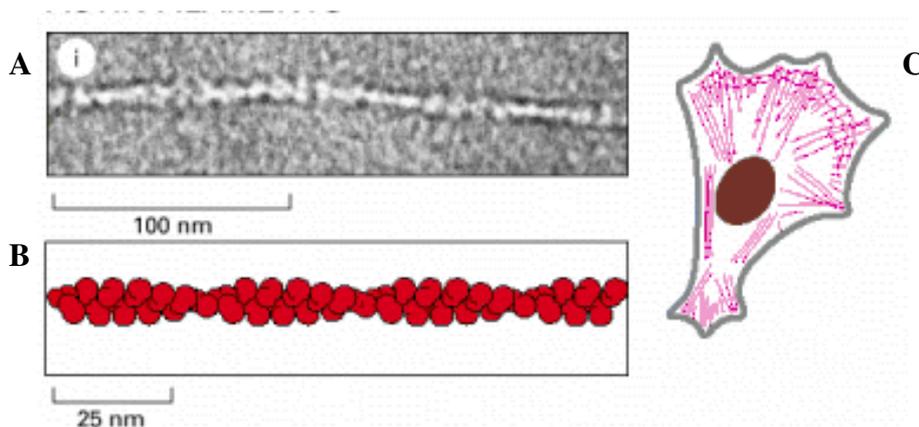


Abbildung 1: Darstellung der Aktinfilamente. Elektronenmikroskopische von Aktinfilamenten (A). (B) Die helikale Konformation der Aktinmoleküle innerhalb des Filaments und die Verteilung von F-Aktin innerhalb der Zelle (C). (Aus Molecular Biology of the Cell. 4th ed. Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter. New York: Garland Publishing; 2002.)

Das Aktin-Zytoskelett verfügt über eine hohe Flexibilität, die die Morphologie der einzelnen Zellen moduliert, da die Aktin-Filamente sich in einem steten Umbau befinden. In diesem Zusammenhang wird die Polymerisation und Depolymerisation (mehr dazu bei Punkt 1.5) dieser Filamente durch diverse Faktoren wie an Aktin gebundene Proteine oder Nukleotide (ATP, ADP) reguliert. Bei der Polymerisation lagern sich Aktin-Monomere an die Enden bereits existierender Aktin-Filamente an, während sie bei der Depolymerisation abdissoziieren. Da Aktin-Filamente favorisiert an dem *barbed end* polymerisieren, dem dadurch schneller wachsenden Plus-Ende, weisen sie auch eine Polarität auf. Das Minus-Ende, das auch als *pointed end* bezeichnet wird, wächst dementsprechend langsamer. Die freien Aktin-Moleküle, die an die Plus-Enden binden, sind mit ATP beladen da die in der Zelle vorhandene ATP-Konzentration hoch ist. Die intrinsische ATPase-Aktivität des Aktin bedingt jedoch anschließend die Hydrolyse des ATP zu ADP und das erhöht wiederum die Geschwindigkeit der Depolymerisation vom (-)-Ende. Da Monomere, die ein ADP gebunden haben, im Polymer eine geringere Bindungsaffinität zueinander besitzen, enthalten die später vom Minus-Ende abdissoziierten Aktin-Moleküle ADP. Dies erhöht die Geschwindigkeit der Depolymerisation vom (-)-Ende im Gleichgewichtszustand

(Higgs *et al.*, 1999). Es kann aber auch ein *treadmilling*-Effekt beobachtet werden bei dem F-Aktin seine Lage nicht jedoch seine Netto-Länge verändern kann. Die Wachstumsrate der Aktin-Filamente am Plus-Ende entspricht in diesem Mechanismus der Dissoziationsrate von Monomeren am Minus-Ende (Svitkina *et al.*, 1999).

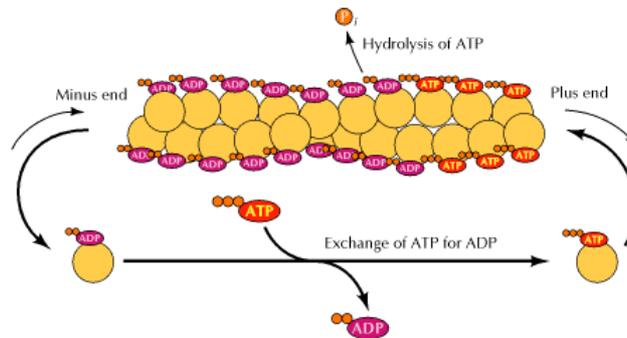


Abbildung 2: Treadmilling-Mechanismus. Die Aktinfilamente stellen aufgrund ihres Aufbaus polare Strukturen dar. Die (-)-Enden, auch als *pointed end* bezeichnet, wachsen langsamer als die *barbed* oder (+)-Enden. Dieser Unterschied in der Wachstumsrate liegt begründet in der kritischen Konzentration von Monomeren. ATP-Aktin assoziiert mit dem schnell wachsenden (+)-Enden. Anschließend wird ATP zu ADP hydrolysiert. ADP-Aktin dissoziiert schneller als ATP-Aktin. Somit ist die kritische Konzentration der Aktinpolymerisation am (+)- und (-)-Ende verschieden. In der Zelle liegt die Konzentration an G-Aktin über der kritischen Konzentration für die Assoziation an ATP-beladene Aktin-Moleküle, jedoch unterhalb der kritischen Konzentration, die für die Assoziation an ADP-beladene Aktin-Moleküle benötigt wird. Die Assoziation von G-Aktin an ein bestehendes Filament erfolgt daher bevorzugt am (+)-Ende. Bei bestimmten Konzentrationsverhältnissen von F- und G-Aktin tritt ein als Tretmühlenmechanismus (*treadmilling*) bezeichneter Vorgang auf. Falls die Konzentration der Aktin-Monomere zwischen der kritischen Konzentration des (+)-Endes und derjenigen des (-)-Endes liegt, verlängern sich die (+)-Enden während sich die (-)-Enden verkürzen, ohne dass es zum Nettowachstum des Filaments kommt (Aus *The Cell*, 2nd ed. Cooper, Geoffrey M. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc; 2000.).

Wie bereits erwähnt wird die Polymerisation aber auch durch Aktin-bindende Proteine reguliert wie durch das an G-Aktin bindenden Profilin oder die an F-Aktin bindenden *Capping*-Proteine. Diese können entweder an die Minus-Enden binden und so das Filament durch Inhibition der Depolymerisation stabilisieren, oder aber an die Plus-Enden, wo sie die Polymerisation verhindern und die Filamente destabilisieren, da am Minus-Ende weiterhin Monomere abdissoziieren. Die G-Aktin bindenden Proteine regulieren die Filamentdynamik durch den Grad des Austausches von ATP zu ADP bzw. umgekehrt (Luna *et al.*, 1997; Welch *et al.*, 2002; Pollard *et al.*, 2002).

Das Aktinzytoskelett besteht neben den Aktinpolymeren auch aus Aktin-assoziierten Proteinen wie Myosin und Tropomyosin. Die Lage der Aktinfilamente zueinander kann sich funktionellen Anforderungen anpassen und wird durch Aktin-bindende Proteine bestimmt. Die Kombination von quervernetzenden Proteinen bestimmt in diesem Gefüge die dreidimensionale Architektur des Mikrofilamentsystems und somit auch die Ausbildung spezifischer Zellstrukturen wie z. B. von Mikrovilli und Filopodien. Durch Anlagerung von Myosin, einem Motorprotein, das selbst zu Filamenten assoziieren kann, entsteht das sogenannte Aktomyosin, das kontraktile Filamentsystem der Muskelzellen. Die Kontraktibilität des Aktomyosins wird durch die mechanochemische ATPase-Funktion des Myosin vermittelt. Aber auch in Nicht-Muskelzellen ermöglicht Myosin die Kontraktion der Aktin-Filamente, wie des kontraktilen Ringes, der während der Zytokinese durch Kontraktion zur Einschnürung und hierdurch zur Teilung des Zellkörpers in zwei Tochterzellen führt (Tanakawa *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2004). Weitere Aktin-bindende Proteine erfüllen vielfältige Funktionen innerhalb der Zelle (Siehe Tabelle 1).

Protein	Zusammenwirken mit Aktin
α -Aktinin	Bündelungsprotein; koppelt Filamente in Parallelanordnung, so entstehen lockere kontraktile Bündel, die Streifasern
ADF (<i>actin depolymerization factor</i>)	Bindung an G-Aktin verhindert Polymerisation, beschleunigt G-Aktin Freisetzung und Treadmilling, fragmentiert F-Aktin
capZ (<i>capping protein</i>)	Bindung an das Plus-Ende von F-Aktin verhindert Einbau von G-Aktin
Fascin	Bildet durch Kreuzvernetzung 3D Netzwerke langer Aktinfilamente im submembranösen Kortex vieler Nichtmuskelzellen. Verleiht Stabilität
Filamin	Flexible Quervernetzungen zwischen Aktinfilamenten zum 3D Geflecht (Gel)
Fimbrin	Bindet Aktinfilamente zu eng gepackten, parallelen Bündel zusammen, ohne Myosin, wie Mikrospeikes und Filopodien
Gelsolin	Ca ²⁺ -abhängiges Aktinfragmentierungsprotein, an dem dadurch freiwerdenden (+)-Ende eine Kappe bildet; fragmentiert F-Aktin, verhindert Einbau von G-Aktin
Myosin-I	Bewegung von Vesikeln entlang der Filamente
Myosin-II	Gleiten der Filamente
Nichtmuskelmyosin	ATPase, die mit F-Aktin zur Erzeugung von Bewegung in Wechselwirkung tritt
Profilin	Schränkt Polymerisation des G-Aktins durch Bindung an das Monomer ein, beschleunigt ADP gegen ATP Austausch
Spektrin	Bildet mit Aktin ein Netzwerk auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran
Talin	Verankerungsproteine, die Aktinfilamente mit der Plasmamembran vernetzen
Thymosin	Bindet G-Aktin nach der Dissoziation von einem Filament und blockiert den Austausch des gebundenen ADP durch ATP verhindert so Polymerisation des Aktins, dient als ATP-G-Aktin-Speicher
Tropomyosin	Verstärkung von Aktinfilamenten, schützt das Filamentsystem vor dem Angriff durch Gelsolin
Villin	Bindet Aktinfilamente zu parallelen Bündeln
Vinculin	Verankerungsprotein, die Aktinfilamente mit der Plasmamembran vernetzen

Tabelle 1: Eine Auswahl Aktin-bindender Proteine. In der Tabelle sind einige Aktin-bindende Proteine und deren Funktion aufgelistet.

Zur Untersuchung von dynamischen Zellprozessen dienen stabilisierende oder destabilisierende Substanzen, wobei sie die Zellmigration aufgrund fehlender Aktindynamik völlig unterbinden. So können Cytochalasine, die Produkte von Pilzen, an (+)-Enden der Filamente binden und das Längenwachstum unterbinden. Beim Phalloidin handelt es sich um ein Toxin aus dem Knollenblätterpilz *Amanita phalloides*, das die Aktinfilamente gegen eine Depolymerisation schützt, indem es seitlich an diese bindet (Cooper *et al.*, 1987).

1.4. Die Dynamik des Zytoskeletts wird durch Rho GTPasen kontrolliert

Extrazelluläre Signale steuern über membranständige Rezeptoren, die zur Aktivierung von G-Proteinen (Guaninnukleotid-bindende, regulatorische Proteine) führen, die Organisation des Aktinzytoskeletts. Eine Zelle enthält eine Vielzahl unterschiedlicher Typen von GDP/GTP-bindenden Proteinen, die sich in zwei große Klassen unterteilen lassen: Die G α -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine und die Familie der kleinen monomeren GTPasen. Heterotrimere G-

Proteine sind zytoplasmatische Mediatoren von aktivierten Membranrezeptoren der Familie der *G-protein-coupled receptors* (GPCR) (Manneville *et al.*, 2002). Insgesamt läßt sich die Superfamilie der kleinen GTPasen in vier Subfamilien unterteilen: Ras, Rho, Rab und Arf (Ridley *et al.*, 1992). Die Rho-Superfamilie beinhaltet drei hoch verwandte Proteine: RhoA, RhoB und RhoC, außerdem noch drei Rac Proteine und Cdc42 (Hall *et al.*, 1990).

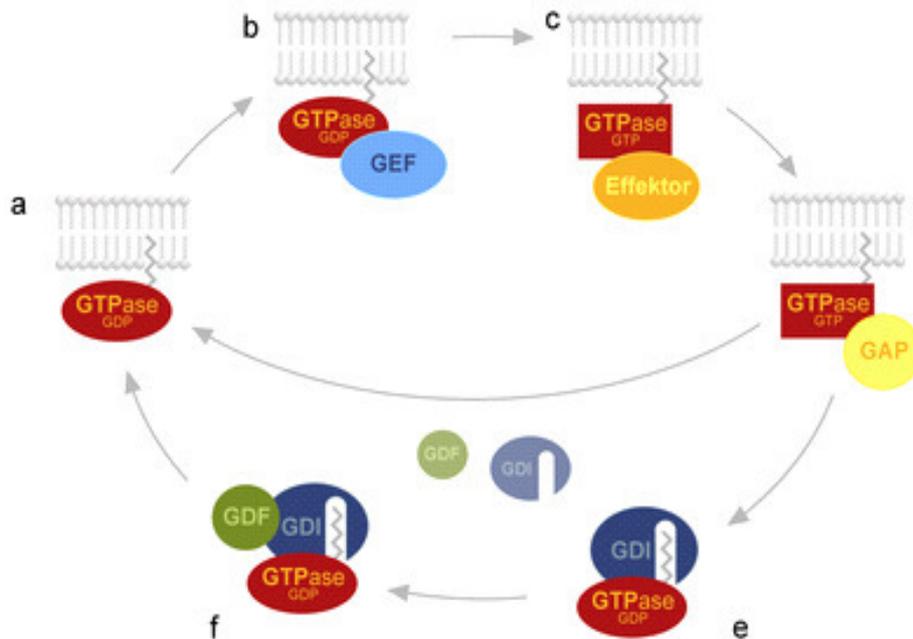


Abbildung 3: GTPase Zyklus. Der Wechsel von GTP- zu GDP-gebundener Form durch *GTPase-activating proteins* (GAPs), welche die intrinsische GTPase-Funktion der kleinen GTPasen verstärken und so die Hydrolyse des GTPs zu GDP bewirken, inaktiviert die kleinen GTPasen. *Guanine nucleotide dissociation inhibitors* (GDIs) halten die GTPase im Zytoplasma in einem inaktiven Zustand. Sie stabilisieren den GDP-gebundenen Zustand und lösen die GTPase aus der Membran, indem sie an den prenylierten C-Terminus der GTPasen binden. Die Dissoziation des GTPase-GDI-Komplexes wird durch *GDI dissociation factors* (GDFs) katalysiert. Der Wechsel von GDP- zu GTP-gebundener Form und damit die Aktivierung der GTPasen wird durch *guanidine exchange factors* (GEFs) katalysiert. (Aus Stephen Media)

Die Mitglieder der Proteinfamilie der kleinen GTPasen sind kleine Proteine von 20-30 kDa, die durch die alternierende Bindung der Nukleotide GDP (inaktive Form) oder GTP (aktive Form) als molekulare „Schalter“ in Signaltransduktionswegen fungieren. Sie werden durch drei Klassen von Proteinen (GEFs, GAPs, GDIs) reguliert (Siehe Abbildung 3), wobei sich hierdurch ihre Konformation ändert. Oft können für dieselbe GTPase mehrere solcher Proteine identifiziert werden, die gewebe- oder entwicklungsspezifisch exprimiert oder durch unterschiedliche Signale aktiviert werden und auf diese Weise zur Spezifität der Aktivierung einer GTPase beitragen. GDP/GTP-Austauschfaktoren (GEFs) aktivieren RhoGTPasen, indem sie den Übergang in den GTP-gebundenen Zustand fördern. GTPase-aktivierende Proteine (GAP) beschleunigen den Hydrolyseschritt und inaktivieren hiermit die GTPasen, wohingegen die GDP-Dissoziationinhibitoren (GDI) RhoGTPasen im inaktiven Status binden und eine Aktivierung bedingt durch die GEFs hemmen (Schwarz *et al.*, 2004; Aspenström *et al.*, 1999).

Kleine GTPasen übernehmen in der Zelle vielfältige Aufgaben. Sie sind am Zell-Wachstum (Ras) und der Gentranskription beteiligt. Außerdem sind sie die Schlüsselregulatoren des Zytoskeletts und damit dessen Morphologie und Dynamik (Rho, Rac, Cdc42), regulieren die Exozytose und Endozytose sowie den intrazellulären Vesikeltransport (Arf, Rab) (Manneville *et al.*, 2004; Aspenström *et al.*, 2004; Fukata *et al.*, 2001).

Die RhoGTPasen können in ihrem inaktiven Zustand oft im Zytosol in einem löslichen Komplex mit GDIs lokalisiert werden. Eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von RhoGTPasen liegt in der posttranslationalen Modifizierung mittels der Anheftung von Fettsäureresten an den N- oder C-Terminus (Farnesyl-, Geranylgeranyl-, Myristyl- oder Palmitylrest). Diese Lipidmodifikation bedingt ihre Translokation aus dem Zytosol an die Zellmembran. Da die Isoprenylierung substratspezifisch ist, werden RasGTPasen farnesyliert, während die RhoGTPasen geranylgeranyliert werden. Bei der am häufigsten vorkommenden Prenylierung werden Farnesyl- oder Geranylgeranylreste an ein Cystein gekoppelt, welches Bestandteil des C-terminalen Erkennungsmotivs CAAX ist (Wennerberg *et al.*, 2004).

Durch die Nukleotidbindung kommt es zur Konformationsänderung zweier Regionen, *switch* I-Region, auch als *effector loop* bezeichnet, und *switch* II-Region. Im Anschluß daran können sie Bindungen mit anderen Proteinen eingehen. Den RhoGTPasen ist es nur in ihrer aktivierten Form möglich mit zahlreichen Effektorproteinen in Kontakt zu treten, deren Aktivität zu regulieren und die unter ihrer Kontrolle stehenden *pathways* zu regulieren. Es konnte hierbei gezeigt werden, daß Cdc42 aktinreiche Strukturen wie Mikrospikes und Filopodien beeinflusst (Nobes und Hall, 1995), während Rac1 Lamellipodien wie auch *membran ruffling* auslöst (Ridley *et al.*, 1992) und RhoA an der Regulation von Streßfasern und fokalen Adhäsionen beteiligt ist (Ridley und Hall, 1992). Alle drei GTPasen sind an der Regulation der Podosomen involviert (Linder *et al.*, 1999, 2003; Ory *et al.*, 2002). Die Komplexität dieser funktionellen Aktivität wird zusätzlich durch eine Aktivierungshierarchie gesteigert sowie durch zelltypspezifische Signalkaskaden und deren regulatorische Auswirkungen. So kann Cdc42 Rac und dieses wiederum Rho aktivieren. (Wojciak *et al.*, 2003; Kawakatsu *et al.*, 2002; Svitkina *et al.*, 2003). So werden in der initialen Adhäsionsphase Rac1 und Cdc42 aktiviert, was zur Aktin-Polymerisierung und zur Bildung von Filopodien und Lamellipodien führt. Während zu einem späteren Zeitpunkt durch die Aktivierung von RhoA Streßfasern generiert werden, was die Kontraktilität erhöht.

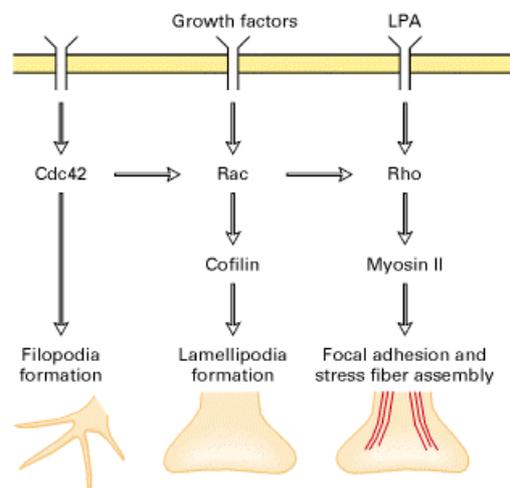


Abbildung 4: Regulation der Aktinremodelierung durch monomere RhoGTPasen. Extrazelluläre Signale induzieren am Leitsaum eine Rac- oder Cdc42-abhängige Signalkaskade die zur Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien führt. Während Wachstumsfaktoren direkt über Rho oder indirekt über Rac Rho-abhängige kortikale Kontraktion oder den Aufbau von fokalen Adhäsionen einleiten. Dabei ist das biologisch aktive Phospholipid LPA (Lysophosphatidsäure), ein Intermediärprodukt des intrazellulären Fettstoffwechsels und Bestandteil zellulärer Membranen, das diverse Wege der Signaltransduktion wie dynamische Veränderungen des Zytoskeletts und die Genexpression stimuliert (Aus Molecular Cell Biology. 4th ed. Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E. New York: W. H. Freeman & Co.; 2000.)

Zahlreiche Publikationen verweisen darauf, daß kleine G Proteine der Rho Familie eine wichtige Funktion als Mittler zwischen Zellmembran, Zytoskelett und Genexpression bei der

Signaltransduktion in der Gefäßwand spielen (Wagner *et al.*, 2000). In Endothelzellen ist RhoA ein negativer Regulator der eNOS (Laufs *et al.*, 1998), kontrolliert die Expression von Endothelin (Hernandez-Perera *et al.*, 2000), die Adhäsion von Monozyten (Hall *et al.*, 1998) und die Permeabilität des Endothelzellverbandes (Hernandez-Perera *et al.*, 2000).

1.5. Arp2/3 abhängige Aktinnukleation

Ab einer bestimmten Monomerkonzentration können sich G-Aktin-Moleküle unter Hydrolyse des gebundenen ATP zu Polymeren zusammenlagern. Der gesamte Prozeß verläuft reversibel wobei hinzukommt, daß eine spontane Ausbildung von F-Aktin energetisch einen ungünstiger Vorgang darstellt. Zuerst muß das G-Aktin durch die Bindung eines Mg^{2+} -Ions aktiviert werden, wobei es seine Konformation verändert und erst jetzt in der Lage ist zu polymerisieren. Bei der spontanen Nukleation muß G-Aktin das energetisch ungünstige Dimer- und Trimerstadium überschreiten, bevor eine Nukleation von Aktinfilamenten erfolgen kann (Welch *et al.*, 2002).

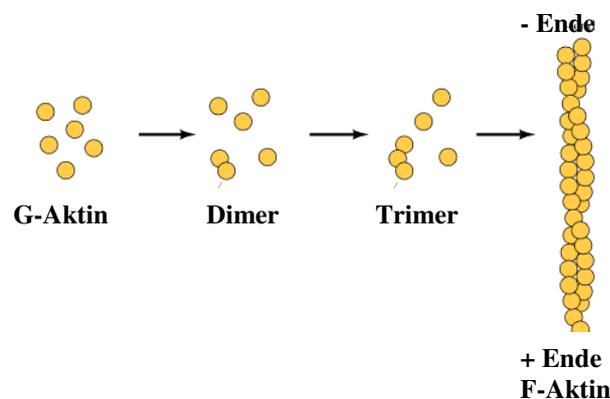


Abbildung 5: Spontane Aktinpolymerisation. Zwei G-Aktin Moleküle binden schwach aneinander, jedoch erst durch die Bindung eines dritten Monomers wird diese Anordnung stabiler. Dieser Nukleus dient als Ausgangspunkt der Polymerisierung. (Aus *The Cell - A Molecular Approach*. 2nd ed. Cooper, Geoffrey M. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc; 2000.)

Aufgrund dieser Energiebarriere haben Zellen energetisch günstigere Mechanismen entwickelt, die die Polymerisation von Aktinfilamenten auf drei unterschiedlichen Wegen erzielen. Zum einen ist es die *de novo* Nukleation von Filamenten aus dem monomeren Aktin, zum anderen basiert es auf dem Aufbrechen bereits existierender Filamente, um so freie *barbed ends* zu schaffen. Ein zusätzlicher Weg ist das *uncapping* schon existierender *barbed* Enden. Jeder dieser Wege wird bei unterschiedlichen zellulären Prozessen beobachtet, der *de novo* Nukleation kommt jedoch eine zentrale Bedeutung zu (Bretschneider *et al.*, 2004; Weitere Möglichkeiten zur Aktinnukleation siehe Seite 12).

Der Arp2/3 Komplex ist in Zellen stabil und besteht aus sieben Untereinheiten. Jede der Komponenten hat homologe Proteine in anderen eukaryontischen Organismen. Dieses 220 kDa Makromolekül ist aus zwei Aktin-verwandten Molekülen, den *actin related proteins* Arp2 und Arp3 und fünf anderen Komponenten, jeweils mit einer einzigen Kopie pro Komplex, aufgebaut. Die Homologie von Arp2 und 3 zur Struktur von Aktin, ermöglicht die Bildung eines Heterodimers, das als Nukleationskern dient, da es ein Aktin-Dimer nachahmt. Arp2 und Arp3 binden Aktinmonomere nach Bildung eines Nukleationskerns, während p34 und p41 als Filamentbindungsstellen dienen. P41 enthält WD-Wiederholungen, die auch in heterotrimeren GTP-bindenden Proteinen vorgefunden werden. WD-Domänen werden in vielen eukaryotischen Proteinen vorgefunden, die zahlreiche Funktionen ausüben wie z.B. in Adaptoren/regulatorische Moleküle der Signaltransduktion, dem pre-mRNA *processing* und bei der Zytoskelett-Organisation. Sie nehmen teil an der Bildung von Multiproteinkomplexen, wodurch p41 in Aufbau und

Erhaltung der Struktur des Arp2/3-Komplexes involviert ist. Andererseits vermitteln diese Interaktionen mit zahlreichen Molekülen, die so regulatorisch auf Arp2/3-Komplex einwirken. Eine bekannte Interaktion erfolgt z.B. mittels der Pleckstrin-Homologie-Domäne, welche in einer Vielzahl von Signal- und zytoskelettalen Proteinen gefunden wird, die mit der Zellmembran interagieren können. Eine Interaktion zwischen p41-Arc und einem PH-Domäne-haltigen Protein könnte die Rekrutierung von dem Komplex zur Zellmembran vermitteln und so bei der Aktivierung der Aktinpolymerisation fungieren, indem sie die Kapazität des Komplexes fördert (Cooper *et al.*, 2000; Pollard *et al.*, 2002). Die anderen sechs Proteine sind wichtig für die Stabilisierung des Komplexes, regulieren deren biochemische Aktivität und bestimmen deren intrazelluläre Lokalisation. So können WASP-Familie Proteine eine Brücke zwischen p21 und p41 bilden und hierdurch die aktive Konformation des Arp2/3-Komplexes begünstigen (Mullins *and* Pollard, 1999).

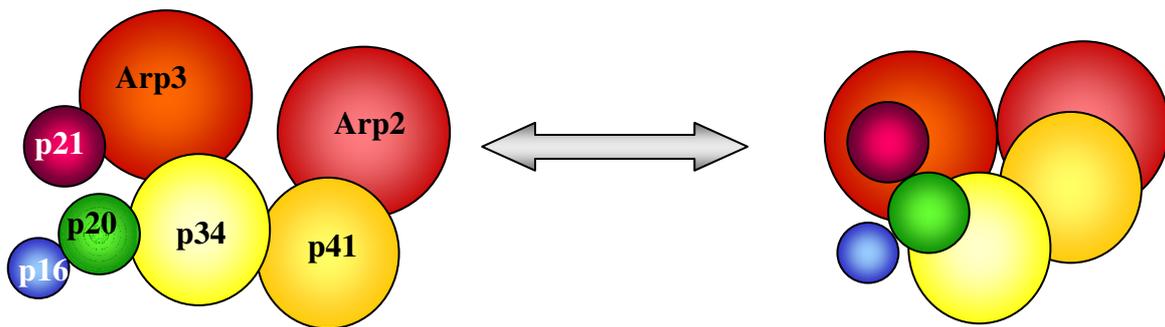


Abbildung 6: Aufbau und Struktur des Arp2/3-Komplexes. Die Abbildung veranschaulicht, welche Untereinheiten miteinander interagierten und wie deren inaktive (links) und aktive Konformation innerhalb der Zelle vorliegen (Mullins *et al.*, 1997).

Durch die Bindung an Aktinfilamente wird die Aktivierung induziert und so kommt es zur Konformationsänderung im Komplex, die die sonst getrennten Komponenten Arp2 und 3 in räumliche Nähe zueinander bringt. Hiermit wird die Bildung von neuen Filamenten eingeleitet aber auch die Nukleation von der Seite bereits bestehender Filamente eingeleitet. Die so generierten Aktinnetzwerke verfügen über eine hohe mechanische Stabilität, die zur gerichteten Migration genutzt werden kann und sind mit Verzweigungen identisch, die am Leitsaum motiler Zellen beobachtet werden (Lamellipodien) (Cooper *et al.*, 2000; Pollard *et al.*, 2002). *In vitro* bindet aktiviertes Arp2/3 oft lateral an bereits existierende Aktin-Filamente und stimuliert so die Bildung neuer Filamente. Dieser Prozess, der als dendritische Nukleation bezeichnet wird, führt am Leitsaum migrierender Zellen zur Bildung von einem Netzwerk von verzweigtem Aktin-Filamenten, die die Motilität der Zellen bedingen. Der Arp2/3 Komplex verfügt über quervernetzende Eigenschaften, die neu gebildete Filamente in Y-verzweigte Konformation anordnet, für die ein Winkelausmaß von 70° charakterisiert ist. In diesem System ist eine konstitutive Aktivierung des Arp2/3-Komplexes essentiell, da das Wachstum am stumpfen Ende durch *capping* beendet wird und die Hydrolyse vom ATP zur Depolymerisation der Aktinfilamente durch ADF/Cofilin führt (Mullins *et al.*, 1998; Pollard *et al.*, 2001).

Der Arp2/3-Komplex kann durch eine Klasse von Proteinen, die als Nukleationsfördernde Faktoren (NPFs) bezeichnet werden, aktiviert werden. Obwohl alle NPFs einige gemeinsame Charakteristika teilen, gibt es bemerkenswerte Unterschiede in deren strukturellen Organisation und den Proteinbereichen, mit welchen sie interagieren. Das bedeutendste Element, das in allen NPFs konserviert vorliegt, ist eine Arp2/3-bindende Sequenz, die als CA-Region bezeichnet wird, die notwendig ist, um den Arp2/3-Komplex zu aktivieren. Die CA-Region besteht aus einer kurzen *central region* (C) und einer *acidic region* (A). Proteine, die diese Sequenz enthalten, sind in der Lage mit den Untereinheiten Arp3, Arp2, p41 und p21 des Arp2/3 Komplexes zu interagieren.

Aber auch die benachbarte WH2 Regionen (*WASP homology 2*) stellt in diesem Zusammenhang eine wichtige Funktion her. Sie repräsentiert die Bindungsstelle der einzelnen Mitglieder der NPFs für G-Aktin (Klasse I von NPFs: WASP, N-WASP, Scar) bzw. für F-Aktin (FAB, F-Aktin-Bindungsstelle, Klasse II von NPFs: Cortaktin, Abp) anhand derer sie sich in zwei Klassen unterscheiden lassen (Higgs *et al.*, 1999; Mullins *et al.*, 2000; Welch *et al.*, 2002).

Es wurden aber auch Arp2/3-Komplex-unabhängige Wege zur Aktinnukleation entdeckt, z. B. über Proteine der Formin-Familie (Zigmond *et al.*, 2003). Formine sind Multidomänen-Proteine mit einer hochkonservierten Formin-Homologie-Domäne-2 (FH2). Diese Proteine enthalten im Gegensatz zum Arp2/3-komplex keine Aktinverwandten-Proteine, können jedoch wie diese zur Nukleation neuer Aktin-Filamente beitragen. Die FH2-Domäne ist notwendig für eine Dimerisierung. Sie bindet auch an *barbed*-Enden vom F-Aktin, moduliert deren Elongation und schützt sie vor Addition von Kappenproteinen. Formine fungieren selbst wie Kappenproteine, indem sie mit den *barbed*-Enden assoziieren, jedoch den Einbau neuer Monomere ermöglichen. Im Gegensatz zu den Filamenten, die aus Arp2/3-abhängiger Nukleation stammen, sind durch Formine katalysierte Filamente immer unverzweigt. Beide Filamentarten können gebündelt werden. Die vom Arp2/3-Komplex generierten Filamente wurden u.a. in *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen, wo sie eine protrusive Kraft ausüben vermögen und an der Orientierung vom kontraktilen Ring involviert sind (Cooper *et al.*, 2002; Ballestrem *et al.*, 1998). Zudem konnte beschrieben werden, daß *Diaphanous-related formin* dDia2 an der Generierung von Filopodien, die als parallele Bündel von Aktinfilamenten vorliegen, involviert ist (Schierenbeck *et al.*, 2006).

1.6. WASP-Proteinfamilie

Das Wiskott-Aldrich Syndrom Protein ist Mitglied der WASP-Familie, einer Gruppe von zytosolischen Proteinen, die *downstream* von zahlreichen Signalen an der Regulation des Aktinzytoskeletts involviert sind. Beim Menschen sind fünf Mitglieder isoliert worden, wie WASP, N-WASP, Scar-1-3 (*suppressor of a cyclic AMP receptor*) auch bekannt als WAVE1-3 (WASP Familie Verprolin-homologes Protein). N-WASP wird ubiquitär exprimiert, am stärksten jedoch in Nervenzellen (Neuronales-WASP). Bis auf das ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimierte WASP, werden alle anderen Mitglieder dieser Familie ubiquitär vorgefunden (Takenawa *et al.*, 2001; Higgs *et al.*, 1999). Zwischen all diesen Multidomänenproteinen sind C-terminale Aminosäurebereiche, wie die Polyprolin-Domäne, die WH2- und die A-Region, konserviert, während N-terminal nur eine geringere Homologie vorhanden ist. Dieser Bereich vermittelt die Substratspezifität.

Die Familie der WASP-Proteine enthält C-terminal eine konservierte VCA-Region (*verprolin homology, central region, acidic region*) und eine Polyprolin-Region mit einem Consensus-Motiv für SH3-Domän-haltige Proteine (*Src-homology3*). Während N-WASP und WASP eine WH1-Domäne (*WASP-homology1*), eine basische Region (B) gefolgt von einer GBD (*GTPase binding domain*) enthalten, fehlen die WH1-Domäne und die GBD bei den WAVE-Proteinen, die statt dessen über eine WHD/SHD-Domäne (WAVE- und Scar-Homologie-Domäne) verfügen (Badour *et al.*, 2002).

Die WH1-Domäne findet man aber auch in anderen Proteinen wie Ena/Mena, VASP (*vasodilator-stimulated phosphoprotein*), die auch in die Regulation des Aktinzytoskeletts involviert sind. Diese Domäne interagiert mit der prolinreichen Regionen zahlreicher Proteine wie WIP (*WASP-interacting protein*) und ähnelt strukturell der Phospholipid-bindenden Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH). In diesem Zusammenhang wird ihr auch eine zentrale Bedeutung bei der Bindung dieses Proteins an die Membran zugewiesen (Anton *et al.*, 2003; Miki *et al.*, 2003).

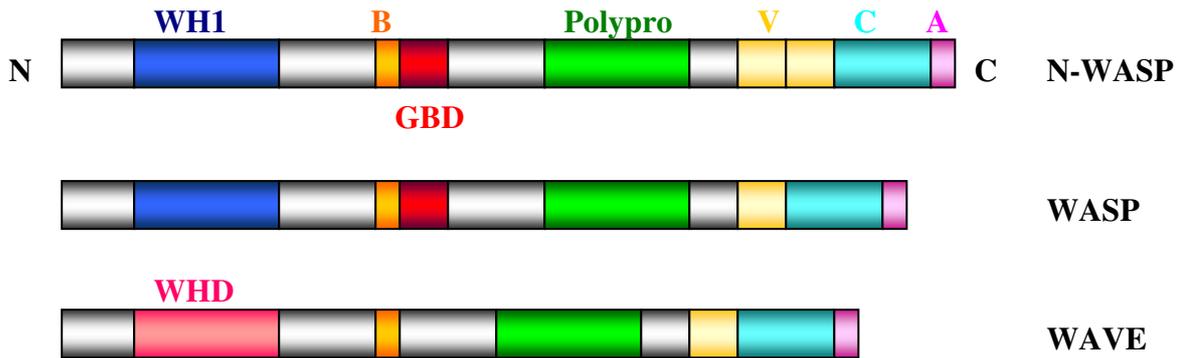


Abbildung 7: Allgemeine Domänenstruktur von N-WASP, WASP und WAVE. WH1-Domäne (*WASP homology domain*); WHD (WAVE-Homologie-Domäne); B (*basic region*); GBD (GTPase bindende Domäne); Polypro (Polyprolin-reiche Region); V (*verprolin homology domain*); C (*connecting-domain*); A (*acidic region*) (Higgs und Pollard, 1999).

WASPs repräsentieren Effektoren für Cdc42, das spezifisch als aktive, prenylierte, GTP-gebundene Form an GBD bindet. Im inaktiven Zustand befindet sich WASP in einer autoinhibitorischen Konformation, die zur Aktinnukleation aktiviert werden muß. Die inhibitorische Bindung, die die VCA-Domäne maskiert und so die Stimulierung vom Arp2/3-Komplex verhindert, wird zusätzlich durch die Interaktion der A- mit der B-Region verstärkt. Hauptsächlich geht Cdc42 mit PIP2 (bindet an die basische Region) eine Synergie ein, um N-WASP aus einem konstitutiv autoinhibitierten Status, in dem die VC-Homologie-Domäne an die hydrophobe Kernstruktur GBD bindet, zu befreien. Dies führt zur Aufhebung der autoinhibitorischen Konformation und zur Demaskierung der aktiven Regionen. Da prenyliertes Cdc42 und PIP2 an der Plasmamembran lokalisiert sind, wird die Aktivierung des N-WASP und anschließend die vom Arp2/3-Komplex-vermittelte Aktinfilamentnukleation auf diese Region innerhalb der Zelle beschränkt (Badour *et al.*, 2003; Notarangelo *et al.*, 2003; Miki *et al.*, 2003; Takenawa *et al.*, 2001; Thrasher *et al.*, 2002). WASP wie auch N-WASP werden zudem noch durch Phosphorylierung reguliert, wobei durch eine Trypsin-Kinase ein Phosphat-Rest an ein Tyrosin in der Nähe der GBD Region angeheftet wird und so die Autoinhibition aufhebt (Suetsugu *et al.*, 2002; Eduardo Torres *et al.*, 2006).

Im Gegensatz zu WASP werden die WAVE-Proteine nicht über den Mechanismus der Autoinhibition reguliert. Sie interagieren zudem mit anderen Mitgliedern der Rho-Familie, nämlich Rac, wobei diese Interaktion indirekt ist, da sie nicht über eine GBD-Domäne verfügen. WAVE-1 liegt inaktiv in einem heterotetrameren Komplex mit Proteinen wie PIR121, Abi1, Nap125 und HSPC300 vor. Um WAVE-1 zu aktivieren muß aktiviertes Rac an die RBD (Rac Bindungsdomäne) am N-Terminus vom IRSp53, einem Adaptorprotein, binden. Dieses bindet nun an WAVE. In einem Modell geht man davon aus, daß nun GTP-Rac1 und Nck an WAVE binden können und eine Dissoziation des WAVE-1 Komplexes in zwei weitere Subkomplexe bedingen. Einer dieser Subkomplexe enthält aktives WAVE-1+HSPC300, was schlußendlich eine Aktinnukleation induzieren kann. Der zweite Subkomplex besteht aus Proteinen wie Nap125+PIR121, an den NCK oder Rac1 gebunden bleiben. WAVE1 wird hierbei durch die N-Terminale SHD-Region (SCAR Homologie Domäne) aus dem Zytoplasma an die Membran transloziert, was den Ort der Nukleation prädestiniert (Eden *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2001; Takenawa *et al.*, 2001). Ein anderes Modell geht davon aus, daß der oben beschriebene Komplex nicht dissoziieren muß und nur als eine stabile Verbindung die Aktivierung von WAVE-1 induziert (Stradal und Scita 2006).

Aktiviertes WASP ist durch die C-terminale VCA-Domäne das Effektor-Molekül der Aktinnukleation. Die VC-Domäne vermittelt dabei eine Interaktionen mit Adaptormolekülen wie Nck, Grb2, Fyn, während die V-Region direkt mit G-Aktin interagieren kann. Die C-Region erhöht die Interaktion vom G-Aktin- und Arp2/3-Komplex mit der V und A Region, die eine hochaffine Bindungsstelle für den Arp2/3-Komplex darstellt. Somit bindet die VCA-Domäne G-Aktin und auch Arp2/3-Komplex, welches es zudem aktiviert. Bedingt wird dies möglicherweise durch die Häufigkeit des Vorkommens der V-Domäne, die zweimal in N-WASP und einmal im WAVE1 vorhanden ist. Die Tandem-G-Aktin-Bindung scheint für die Aktinnukleation optimaler zu sein, denn N-WASP ist der stärkste Aktivator des Arp2/3-Komplexes und WAVE mit nur einer V-Domäne der schwächste (Badour *et al.*, 2003; Hübner *et al.*, 2001; Takenawa *et al.*, 2001). Entdeckt wurde WASP bei einer seltenen, X-chromosomal rezessiv vererbten Immundefizienz, dem Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS). Die klinische Manifestation dieser Erkrankung stellt einen hohen Grad an Variabilität dar, wobei der Schweregrad des klinischen Phänotyps mit der Expression des WAS-Proteins korreliert. Man kann die leichte Form einer isolierten Thrombozytopenie (X-chromosomal vererbte Thrombozytopenie, XLT; Punktmutation in der WH1-Domäne) von WAS unterscheiden, bei der Mutationen in der VCA-Region beobachtet werden. Die schwere Manifestationen bei WAS-Patienten äußert sich in Ekzemen, Thrombozytopenie und beeinträchtigte zelluläre und humorale Immunität, eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber viralen und opportunistischen Infektionen und einem erhöhten Aufkommen von Tumoren. WAS-Patienten zeigen verschiedene Defekte in der Zellmotilität, dem *homing* und eine beeinträchtigte Podosomenbildung. Das Fehlen von Podosomen korreliert mit einer dramatischen Erniedrigung der Fähigkeit zur Zelladhäsion und Orientierung in chemotaktischen Gradienten (Badolato *et al.*, 1998; Linder *et al.*, 2003; Notarangelo *et al.*, 2003; Trasher *et al.*, 2002).

1.7. Rolle des Zytoskeletts bei der Migration

Bei vielen komplexen zellulären Vorgängen wie der Inflammation, Embryogenese und Wundheilung spielt die Zellmotilität eine entscheidende Rolle und muß räumlich und zeitlich strikt reguliert werden. Wird diese Regulation gestört, bedingt dies das Aufkommen von pathologischen Prozessen. Die gerichtete Zellbewegung, Taxis, wird durch äußere Stimuli induziert, die Chemotaxis bei chemischen Verbindungen, Thermotaxis bei Wärme, Thigmotaxis bei Berührung. Ohne solche Stimuli erfolgt der *persistent random walk*, bei den die Zelle ungerichtete Bewegung in eine Richtung vollführt, die sie dann zufällig ändert (Bailly *et al.*, 2001; Miri *et al.*, 2003)

An motilen Zellen entstehen dynamische Aktinfortsätze als Ausstülpungen, für die die treibende Kraft aus der Polymerisation des Aktins hervorgebracht wird. Zuerst können am Leitsaum dünne, steife, lange *mikrospikes* aus lockeren Bündeln von ca. 20 Aktinfilamenten entstehen, deren (+)-Enden nach außen orientiert sind. Sie haben einen Durchmesser von ca. 0,1 μm , eine Länge von 5-10 μm . Anschließend werden deren Extensionen, die Filopodien, die eine Länge bis zu 50 μm erreichen können, beobachtet. Die Richtung der Zellbewegung wird durch die Progression des Lamellipodiums auferlegt. Dünne, flächige Lamellipodien, die ein dichtes Geflecht aus F-Aktin bilden, können auch zusätzlich auf ihrer Oberfläche *mikrospikes* und Filopodien tragen. Zu diesem Zeitpunkt bzw. kurz danach werden auch *ruffles* beobachtet, die apikalen Anteile der Lamellipodien, die während der Bewegung über die Zelle nach hinten verschoben werden (Dove *et al.*, 2003; Svitkina *et al.*, 2003). Nach der Ausbildung eines Lamellipodiums erfolgt die Anheftung der Aktinfilamente dieser Lauffront an das Substrat durch Bildung fokaler Komplexe, die später zu fokalen Adhäsionen umstrukturiert werden. Das hintere Zellende hingegen löst bestehende Adhäsionen und zieht sich zusammen.

Die Zellmotilität ist aber ein noch komplexerer Vorgang, der außer der Ausbildung solcher Protrusionen zusätzlich den Matrixverdau beinhaltet. Motile Zellen durchlaufen diverse Phasen

während des Vorgangs der Migration wie die Auflösung bestehender Zell-Zell-Verbindungen, Adhäsion, *spreading*, Kontraktion und Retraktion des Zellkörpers, wobei die letzten vier Prozesse im Zyklus ablaufen bis die Zelle an dem Ort ihrer Bestimmung einwandert und neue Zell-Zell-Verbindungen knüpft (Holly *et al.*, 2000). In diesen Ablauf sind verschiedene Proteine, die all diese Phänomene steuern, involviert. Zuerst wird aufgrund der Remodelierung des Aktinzytoskeletts die Zellperipherie mit Hilfe der dadurch generierten Protrusionen in die Richtung der Fortbewegung elongiert. Anschließend finden Umbauprozesse statt, die im Zusammenhang mit der Adhäsion zur ECM bestehen. Während dieser Phase kann das hintere Ende der Zelle aktiv in die Richtung der Zellbewegung nachgezogen werden. Der Zug, der hierzu notwendig ist, entsteht neben der aktiven Kraftentwicklung durch MyosinII, hauptsächlich durch die Spannung, die durch die Polymerisation der Aktinfilamente aufkommt. Alles in allem ist die Rate der Zellmigration von der Adhäsionsbildung und Ablösung der Zellen von der ECM und der Polymerisation von Aktin abhängig (Kajita *et al.*, 2001; Wolf *et al.*, und Yamazaki *et al.*, 2003).

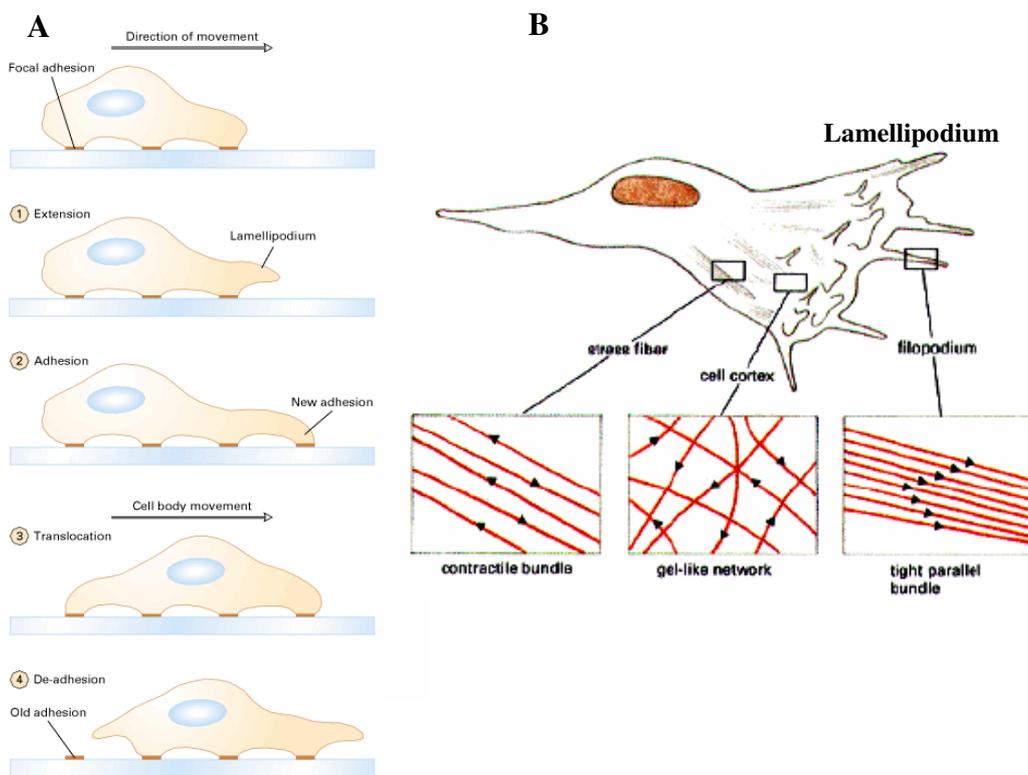


Abbildung 8: Stufen der Zellbewegung (A) und die hierbei entstehenden Protrusionen (B). Die Zellbewegung beginnt mit einer Extension, dem Lamellipodium am Leitsaum einer Zelle (1); einige dieser Strukturen können an die ECM mit Hilfe von Adhäsionen adhären (2); der Hauptteil der Zelle bewegt sich (3); das hintere Zellende löst sich von der ECM ab und wird zurückgezogen (4). (Aus Molecular Cell Biology. 4th ed. Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E. New York: W. H. Freeman & Co.; 2000.)

1.8. Rolle des Zytoskeletts bei podosomalen Adhäsionsstrukturen

Bekannte Zell-Matrix-Kontakte sind vor allem fokale Komplexe, fokale Adhäsionen und fibrilläre Adhäsionen, sowie Podosomen und Invadopodien (Linder und Kopp 2005). Zusätzlich stellen Hemidesmosomen Zellstrukturen dar, die eine Verbindung zwischen der basalen Oberfläche der Zellen mit der Basallamina herstellen und so zur Stabilisierung der Zellen in ihrer Umgebung dienen. Hierbei binden die extrazellulären Domänen der Integrine an Laminin-

Komponenten der Basallamina, während die intrazelluläre Domänen über Ankerproteine wie das Plektin an Keratinfilamente interagieren. Diese Haftverbindungen ermöglichen es den Zellen, zusätzlich Zugkräfte auf die Nachbarzellen und die Matrix auszuüben (Spinardi et al., 2004).

Fokale Komplexe haben eine längliche Erscheinungsform mit einer Länge von ca. 0,5 μm und stellen frühe Matrixkontakte einer protrusiven Zelle dar. Sie reifen zu fokalen Adhäsionen durch Kraftentwicklung wie bei der Retraktion zellulärer Protrusionen heran, wobei sie an Größe und Bindungsfestigkeit zum Substrat zunehmen. Zudem werden weitere Proteine (Zyxin) dorthin rekrutieren und Aktinstreißfasern gebildet (Aktinbündel) (Buccione et al., 2004; Linder und Kopp 2005). Die Bildung neuer fokaler Komplexe wird durch Rac kontrolliert. Diese RhoGTPase ist an der Zellfront aktiv, wo Protrusionen und fokale Komplexe gebildet werden. Rho hingegen ist im Zellkörper aktiv wo die Spannung aufbaut und die fokalen Adhäsionen stabilisiert werden. Das Wachstum und die Reifung dieser Kontaktpunkte zu fokalen Adhäsionen wird durch Rho-abhängige Prozesse bestimmt (Ridley et al., 2003).

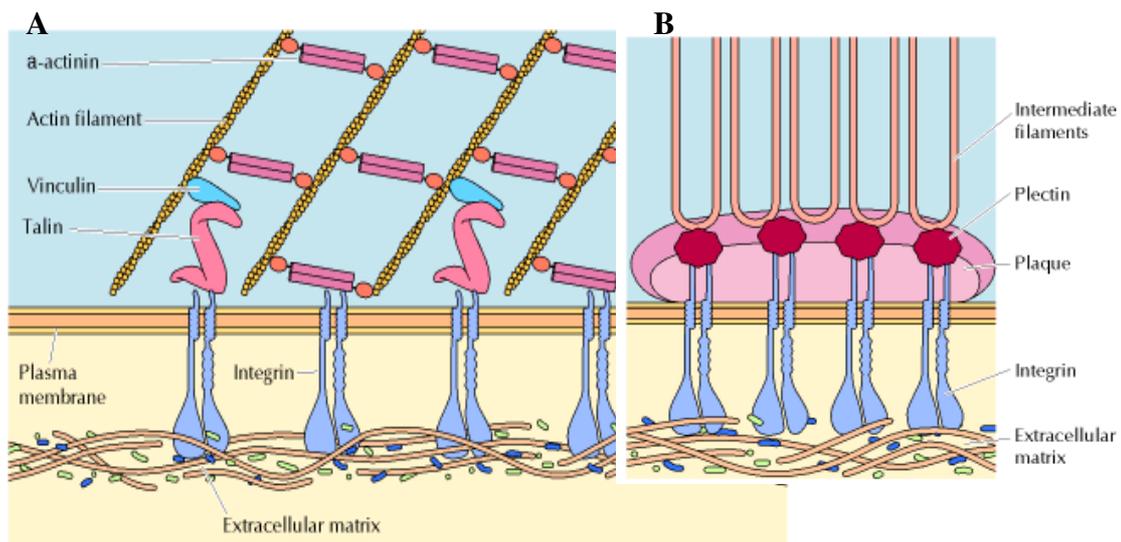


Abbildung 9: Fokale Adhäsionen (A) und Hemidesmosomen (B). Zellen werden mittels der fokalen Adhäsionen und der Hemidesmosomen an der extrazellulären Matrix fixiert. An beiden Strukturen greifen die Aktin- bzw. Intermediär-Filamente an, die das Cytoplasma durchspannen (Aus *The Cell - A Molecular Approach*. 2nd ed. Cooper, Geoffrey M. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc; 2000).

Fokale Adhäsionen werden temporär unter der Beteiligung von Kinasen bei der Migration von Zellen generiert. Die GTPase Rho fördert Bildung von fokalen Adhäsionen und ihre mögliche biologische Funktionalität. Diese Integrin-basierenden Kontaktpunkte des Aktinzytoskeletts mit der ECM bestehen aus einer Vielzahl von Adapter- und Signalproteinen, wie Talin und α -Aktinin. Diese Komponenten der fokalen Adhäsionen gehören zu den F-Aktin-organisierenden Proteinen, die die Struktur dieser Filamente bestimmen. All diese spezifischen integralen Membranproteine, nämlich die Integrine aber auch die Proteoglykane, stellen intrazellulär über Ankerproteine wie Talin, α -Aktinin und Vinculin eine Verbindung mit dem Zytoskelett her. Die extrazelluläre Domäne der Integrine bindet wiederum mit Komponenten der ECM, die eine RGD-Sequenz enthalten wie z.B. das Kollagen. Als weitere Komponenten können Kinasen und deren Regulatoren aufgelistet werden, die diverse Signalwege regulieren (Hall et al., 2000; Petit et al., 2000). Während eine Zelle migriert, bleiben diese Adhäsionsstrukturen an Ort und Stelle bestehen, wodurch sie zum Aufbau von Zugkräften genutzt werden. In nicht motilen Zellen kann das Aktin-Myosin-Netzwerk Spannung aufbauen, wodurch die fokalen Kontakte migrieren können. Fokale Adhäsionen haben zudem Kontakt zu Mikrotubuli und stabilisieren sie gegenüber der Depolymerisierung oder dienen einer Polymerisierung dieser Filamente. Mikrotubuli können durch eine Interaktion die Auflösung dieser Strukturen herbeiführen (Kaverina et al., 1998). Am hinteren Zellende geschieht dies öfter, was zu einer reduzierten

Haftung des Zellteils an der Matrix führt, während am vorderen Ende dieses Ereignis selten erfolgt und so die Neubildung von fokalen Adhäsionen fördert. Somit könnte dieser Mechanismus entscheidend bei der Zellpolarisierung beteiligt sein. (Avraham *et al.*, 2003; Quian *et al.*, 2003; Wells *et al.*, 2004).

In hämatopoetischen Zellen wie Monozyten, Makrophagen, Osteoklasten und dendritischen Zellen werden zusätzlich zu den beschriebenen Zell-Matrix-Verbindungen hochdynamische punktförmige, invasive Adhäsionsstrukturen, die Podosomen, generiert. Zudem treten Podosomen-ähnliche Strukturen, die Invadopodien, in malignen Zellen wie den Mammakarzinomzellen auf. Hingegen wurden in Fibroblasten und Endothelzellen keine Podosomen entdeckt, die konstitutiv gebildet werden. Durch die Transformation dieser Zellen mit dem RSV, *Rous sarcoma virus*, konnte hier jedoch die Generierung dieser Adhäsionsstrukturen induziert werden. Diese Transformation wird durch eine Tyrosinkinase, nämlich Src, ausgelöst (Linder und Kopp 2005; Kaverina *et al.*, 2003). In Osteoklasten tragen Podosomen zu der Migration und eine verwandte Struktur, die sogenannte *sealing zone*, zur Resorption von mineralisierter Knochensubstanz bei. Im Unterschied zu den Podosomen, die auf nicht Apatithaltigen Substraten induziert werden, ist dieses jedoch für die Generierung der *sealing zone* unentbehrlich. Zudem werden die Podosomen in ausgebreiteten Osteoklasten gebildet, während die *sealing zone* in der Phase der Resorption generiert und bei Zellausbreitung und Migration abgebaut wird (Destaing *et al.*, 2003; Saltel *et al.*, 2004).

Podosomen, sind definiert als füßchenartigen Protrusionen der Plasmamembran. Sie sind hochdynamische Strukturen, die 10-mal schneller auf- und abgebaut werden als fokale Adhäsionen. Ihre Bildung ist zudem unabhängig von der *de novo* Proteinbiosynthese. Podosomen werden an der ventralen Zelloberfläche nach Kontaktaufnahme zum Substrat gebildet und sind ringförmig um die Zellperipherie angeordnet (Mizutani *et al.*, 2002; Burgstaller und Gimona, 2005).

Die Podosomen und Invadopodien werden durch ihre Fähigkeit zur Matrixdegradation gegen andere Zell-Matrix-Kontakte abgegrenzt. Podosomen haben jedoch eine Halbwertszeit von 2-12 min, einen Durchmesser von 0,5 bis zu 1 μm und eine Tiefe von 0,2 - 0,4 μm , während Invadopodien 200 nm breite und 3 μm lange Membranprotrusionen von invasiven Zellen darstellen, Extensionen in die Matrix ausbilden, die mehrere Mikrometer tief gehen können und über eine längere Halbwertszeit verfügen. Angereichert sind hier Integrine, Tyrosinkinase-Signalmaschinerie-assoziierten Proteine, MMPs, Dynamamin2 und zum größten Teil Aktin und Aktin-regulierende Proteine (Destaing *et al.*, 2003; Saltel *et al.*, 2004). Zwischen diesen zwei Strukturen gibt es in der Architektur und Zusammenstellung Ähnlichkeiten (Burns *et al.*, 2001; Buccione *et al.*, 2004). Sie haben aber eine andere Organisation, obwohl Invadopodien aus podosomal Vorläufern entstehen könnten. In den Podosomen ist die Erhaltung des F-Aktinkerns von Src-Kinasen und Grb2 abhängig. Dieser Kern bedingt die Stabilität dieser Struktur und ist für Podosomen charakteristisch. Er besteht aus F-Aktin (Hauptprotein), und Aktin-assoziierten Proteinen wie den Mitgliedern der WASP-Familie, Dynamamin, MMPs, N-WASP, Grb2, dem Arp2/3-Komplex, Cortaktin, er ist in einer Ringstruktur eingebettet aus Integrinen und Integrin-assoziierten Proteinen, die zudem Proteine enthält wie Gelsolin, Talin, Vinkulin, Paxilin, VASP und Kinasen wie PIK3, Src-Kinasen oder Pyk2/FAK. Paxillin verbindet die Integrine zu Aktin-assoziierten Molekülen und interagiert weiter mit Mitgliedern des c-Src-Komplex und Vinkulin. Vinkulin bindet wiederum an Ringkomponenten wie Talin und α -Aktinin. In der Regulation von Podosomen und der Rekrutierung von Signalmolekülen an Podosomen spielen Phosphatidylinositole eine wichtige Rolle. Ring und Kern sind durch Brücken-Proteine wie α -Aktinin verbunden, und die gesamte Struktur ist umgeben von einer Wolke aus G-Aktin, welches als Quelle für den Podosomenumsatz dient (Gavazzi *et al.*, 1989; Linder *et al.*, 2005; Zamboni-Zallone *et al.*, 1989; Tarone *et al.*, 1985).

Rekrutierung von Podosomen an den Leitsaum migrierender Zellen, ihre Lokalisation zum Substrat hin aber auch ihre Komponenten wie die Integrine demonstrieren, daß sie eine entscheidende Funktion bei der Migration und Adhäsion ausüben. Dieses wird auch untermauert

durch Experimente an Makrophagen mit defekten WASP, die daraufhin nicht mehr in der Lage sind einem Gradienten zu folgen und insgesamt eine gestörte Migration vorweisen. Auch unterstützt dies eine weitere Beobachtung, die zeigt, daß diese Strukturen in Zellen zu finden sind, die invasives Verhalten entwickeln können. Gleichzeitig deutet dieses Phänomen und die Tatsache, daß Podosomen MMPs als Komponenten, beinhalten daraufhin, daß sie zudem an der Degradierung der ECM teilnehmen, wie zahlreiche Experimente beweisen (Mizutani *et al.*, 2002; Burgstaller und Gimona, 2005; Osiak *et al.*, 2005).

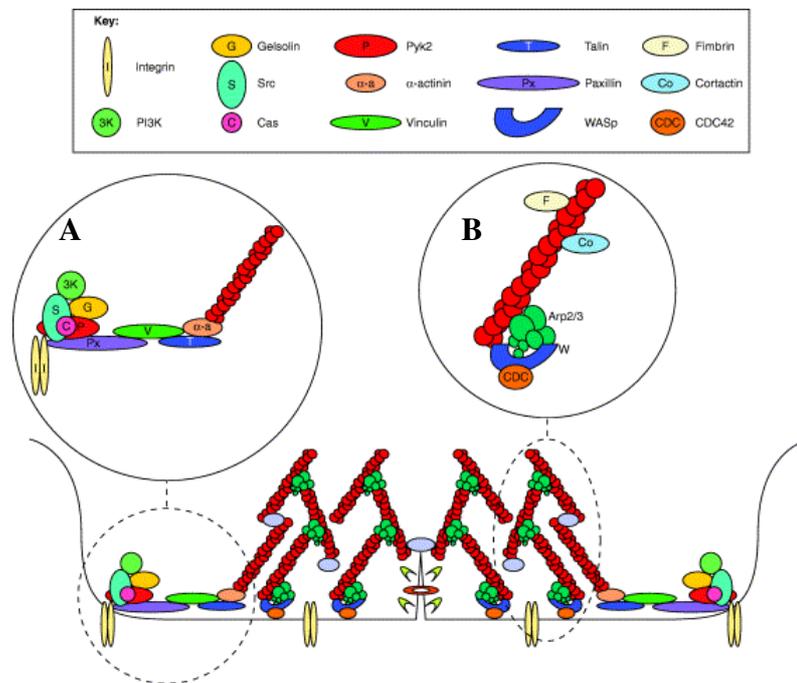


Abbildung 10: Podosomenmodell mit Detailsicht und Symbolerklärung. Die Abbildung zeigt ein Podosom im Querschnitt senkrecht zur ECM. **A: Podosomenring:** Integrine binden an die ECM, Paxillin dient als Gerüst für den intrazellulären Komplex aus Src, Pyk2/FAK, Gelsolin und PI3K. Der Podosomenring ist über Vinculin, Talin und α -Aktinin an F-Aktin des Kerns gekoppelt. **B: Podosomenkern:** Cdc42 aktiviert WASP/N-WASP und dieses über den Arp2/3 Komplex die Aktinpolymerisation. F-Aktin ist über Cortactin und Fimbrin gekoppelt. (Aus „Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells“ Linder and Aepfelbacher Trends Cell Biol. 2003 Jul;13(7):376-85.)

Wie schon erwähnt können Podosomen am Leitsaum migrierender Zellen *de novo* generiert werden. Ein anderer Weg zu Ausbildung von diesen Adhäsionsstrukturen liefert die Fraktionierung von podosomal Vorläufern, die miteinander fusionieren können. Die Bildung von Podosomen ist im Gegensatz zu fokalen Adhäsionen von einem intakten Mikrotubulsystem abhängig, das die Podosomen stabilisiert und deren Bildung reguliert. Mikrotubuli enden meist in der Zellperipherie wo Podosomen lokalisiert sind und stehen in enger räumlicher Nähe (Buccione *et al.*, 2004; Evans *et al.*, 2003; Linder *et al.*, 2000). Nach der Depolymerisierung von Mikrotubuli kommt es zu Podosomenauflösung und Streßfaserentstehung und Bildung von fokalen Adhäsionen. Eine solche Verbindung zwischen den Podosomen und Mikrotubuli könnte WASP selbst darstellen. Die Polyprolin-Domäne (bindet auch zahlreiche weitere Proteine wie Tyrosinkinasen der Src-Familie, die Adaptor-Proteine Nck und Grb2) bindet WASP an Mikrotubuli durch das CDC42 interacting protein 4 (CIP4, kann auch an Cdc42 binden) (Linder *et al.*, 2000).

Podosomen werden zudem durch zahlreiche Proteine reguliert, die teilweise selbst Komponenten dieser Adhäsionsstrukturen sind. Viele dieser Faktoren, wie z. B. die Rho-Familie der kleinen GTPasen, üben jedoch innerhalb der Zelle noch andere Funktionen aus, die auch auf weitere

Teile des Zytoskeletts Einfluß nehmen. So treten bei Podosomen-assoziierten Krankheiten wie dem Wiskott-Aldrich-Syndrom und der chronische myeloide Leukämie (CLM) Defekte in der Podosomen-Bildung und Chemotaxis auf (Linder *et al.*, 1999).

1.9. Rolle von MMPs und MT-MMPs sowie deren Inhibitoren

Zellinvasion benötigt eine zeitliche und räumliche Koordination zwischen der Bildung von Adhäsionen und der Degradierung von Zelloberflächenmolekülen und Komponenten der ECM. Am letzteren Prozeß sind die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) involviert. MMPs stellen eine Familie von 25 Zn²⁺-bindenden Ca²⁺-abhängigen Endopeptidasen dar, wovon 18 sezerniert und sieben Membran-assoziiert sind. Es existieren vier Subgruppen: Collagenasen, Stromelysine, Gelatinasen und Membran-Typ MMPs (MT-MMPs) (Fieber *et al.*, 2003). Sie verfügen über eine breite Substratspezifität der Degradierung von ECM-Komponenten, Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Zelloberflächenproteinen und diversen Proteinkinasen. Sie haben eine duale Rolle bei der inflammatorischen Aktivität. MMPs sind sowohl in die Aktivierung als auch die Inaktivierung von Chemokinen und deren Rezeptoren involviert, indem sie diese verkürzen und so deren Aktivität senken oder sie so prozessieren, daß deren Aktivität ansteigt. Die lokal kontrollierte Proteolyse kann jedoch nur bei gebundenen nicht bei sezernierte MMPs beobachtet werden, wodurch diese über eine breitere biologische Funktionalität verfügen (Belkin *et al.*, 2001). Die durch die MMPs induzierte Degradierung erfolgt an spezifischen Stellen, an welchen die invasiven Zellen durch Strukturen wie Invadopodien und Podosomen Kontakt zu ECM herstellen. Sie werden aber auch an der *leading edge* von Zellen sezerniert (Baldassarre *et al.*, 2003; Genersch *et al.*, 2000). Normalerweise werden MMPs nicht im normalen gesunden Gewebe exprimiert (Parks *et al.*, 2004).

MMPs werden auf transkriptionalem und posttranskriptionalem Level reguliert, wie auch durch die Aktivierung und Inhibition und Zell/ECM-Lokalisation, welche gewebespezifische, räumliche und zeitliche Regulation der funktionellen Aktivität erlaubt. Expressionslevel können durch verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, ECM-Interaktionen und zytoskelettale Änderungen moduliert werden. Die Stimulation von Endothelzellen mit Zytokinen bewirkt eine Erhöhung der MMP-Expression, induziert deren Aktivierung und steigert die Zellmigration. Umgekehrt bewirkt die enzymatische Aktivierung vom MT1-MMP Zytokin Hochregulierung durch eine Aktivierung des Src-Tyrosinkinase-Signalweges. Auch exogene Hinzugabe von MMP stimuliert die Migration (Lee *et al.*, 2004; Kim *et al.*, und Seiki *et al.*, 2003; Sounni *et al.*, 2004).

MMPs, aber auch deren Inhibitoren und Oberflächenrezeptoren spielen durch ihre Fähigkeit zu kombinierter und regulierter Degradierung eine zentrale Rolle bei der Gewebsintegrität und jede Abweichung bedingt eine Dysfunktion. Sie sind aktiv während der Invasion, Migration in physiologischen und pathologischen Prozessen, einschließlich der Morphogenese, Differenzierung, Ovulation, Migration, Apoptose, Gewebereparatur, Tumordinvasion, Wachstum, Arthritis und Angiogenese (Chen *et al.*, 1989; Preston *et al.*, 2002).

MMPs werden als Zymogene mit einem Signalpeptid und einer Propetid-Domäne synthetisiert (Siehe Abbildung 11), die bei MMPs für die Latenzhaltung verantwortlich ist und bei den MT-MMPs als intramolekulares Chaperon fungiert. Die Propetid-Domäne enthält ein Cystein, das eine Verbindung mit dem Zink der katalytischen Domäne ausbildet und so die enzymatische Aktivität blockiert, die zur Aktivierung des Enzyms proteolytisch gelöst werden muß. Bei dieser Aktivierung fungieren Plasmin, Trypsin, MMPs und MT-MMPs. Die katalytische Domäne bildet eine konservierte, sphärische Topologie mit einer Substratbindungsfurche, die Variationen der Substratspezifität und inhibitorische Spezifitäten für TIMPs, der *tissue inhibitors of metalloproteinases* (s.u.), bedingt (Brinkerhoff *et al.*, und Pawlaki *et al.*, 2002).

Die Substratspezifität wird zusätzlich durch weitere Domänen beeinflusst, wie die C-terminale Hemopexin-Domäne, die die Fähigkeit zur Interaktion mit anderen ECM-Komponenten und Zelladhäsionsmolekülen verleiht und die zelluläre Lokalisation von MMPs bedingt (Brinkerhoff *et*

al., 2002; Lee *et al.*, 2004; Preston *et al.*, 2002). Ihre 3D Struktur ist ein 4-facher Propeller mit einer Ca^{2+} -bindenden Furche. Für einige MMP/Substrat-Interaktionen sind Kalzium-Ionen nötig. Endgültige Aktivierung der MMPs beinhaltet oft eine Ablösung der Hemopexin-Domäne. Die isolierte Hemopexin-Domäne inhibiert oft intakte MMPs. Die *hinge* Region verleiht Spezifität durch direkte Bindung oder durch Orientierung der Hemopexin-Domäne und der katalytischen Domäne (Preston *et al.*, 2002; Seiki *et al.*, 2003). MT-MMPs sind durch ihre hydrophobe Transmembrandomäne oder Glykosylphosphatidylinositol-Anker an der Plasmamembran assoziiert, durch die sie oft in zytoskelettale Signalkaskaden involviert sind (Kajita *et al.*, 2001).

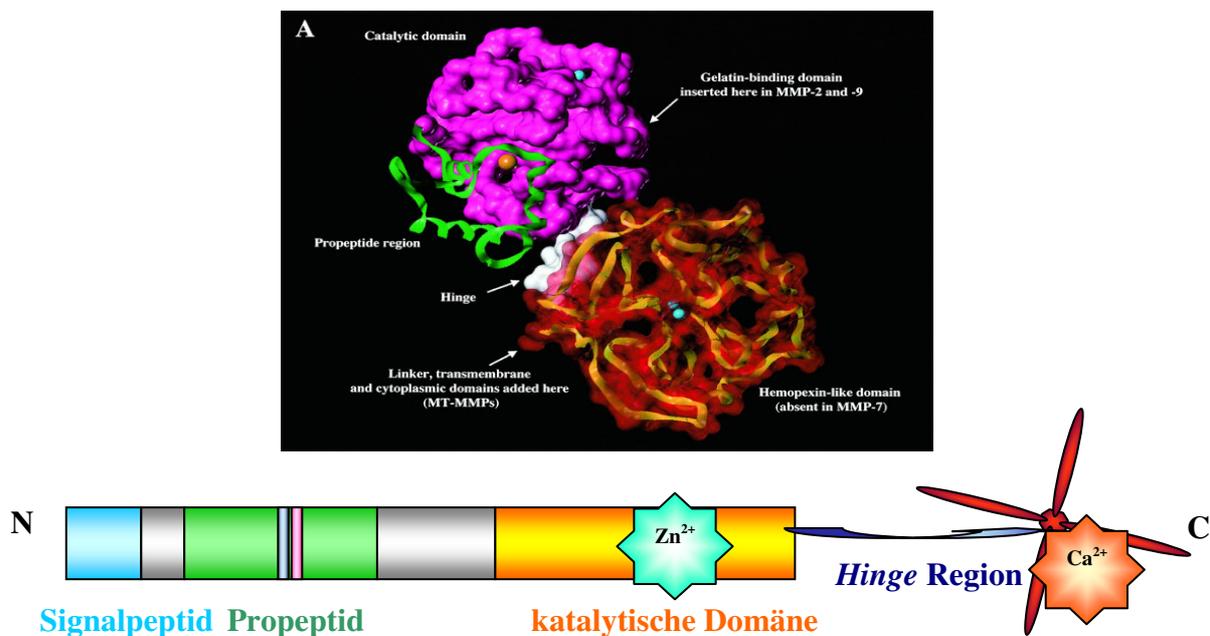


Abbildung 11: Domänenstruktur von MMPs. Signalpeptid und Propetid-Domäne bedingen die Erhaltung der Latenz. Die katalytische Domäne, die *hinge*-Region und die Hemopexin-Domäne vermitteln die Substratspezifität.

Die TIMPs kontrollieren als native spezifische Inhibitoren die Aktivität der MMPs. Die für MMPs spezifische TIMP-Familie, von denen bislang vier Mitglieder (TIMP-1, -2, -3 und -4) bekannt sind, bilden nicht-kovalente, irreversible Komplexe mit den MMPs und inaktivieren sie hierdurch. Es kommt hierbei zur Bildung eines 1:1 Komplexes mit dem aktivierten katalytischen Zink-Ion in den MMP (Lafleur und Murphy *et al.*, 2003). Synthetische Inhibitoren wie die MMPi, ahmen die Substraterkennungseiten des Kollagens nach, binden an Zink-Ionen und inhibieren die MMP-Aktivität effizient, jedoch mit so geringer Spezifität, daß sie auch andere Metalloenzyme inaktivieren. Sie werden als anti-inflammatorische Medikamente, die die MMPs-Aktivität inhibieren und die Genexpression der MMPs senken, eingesetzt, da das invasive Verhalten der Zellen unterdrückt wird. Weiter dienen sie auch als Therapeutika bei Gewebeerstörung bei inflammatorischen Krankheitsbildern, wie der Arthritis. Sie verhindern nicht die Ausdehnung der Tumorzellen, halten aber metastatische Läsionen in ruhendem Status (Brinkerhoff *et al.*, und May *et al.*, 2002; Parks *et al.*, 2004).

1.10. Das Aktin-modulierende Protein Drebrin

Das 70 kDa große Protein Drebrin (*developmentally regulated brain protein*) ist ursprünglich als Neuron-spezifisches Protein deklariert worden. Im Laufe von zahlreichen Forschungsarbeiten konnte es aber auch in einer Vielzahl von anderen Zellen wie in Schweißdrüsen, Endothel,

Epidermis, Hauttumoren, glatten Muskelzellen und Perizyten vorgefunden werden. Es ist in Aktinmikrofilamenten angereichert, die mit Plaques von Zell-Zell-Kontakten, den Adhärenzverbindungen assoziiert sind. Es fehlt jedoch in Kardiomyozyten, Hepatozyten und gestreifter Muskulatur (Peitsch *et al.*, 1999 und 2003).

Insgesamt existieren drei Drebrin Isoformen, die auf alternatives *splicing* eines einzigen Gens zurückzuführen sind. Die adulte Form, DrebrinA, ist nur in reifen Neuronen präsent, trägt zur Wirbelsäulenplastizität bei, ersetzt im Laufe der Entwicklung DrebrinE2 und ist in Vorgänge der Migration involviert (Toda *et al.*, 1993). Die embryonalen Formen E1, die früheste embryonale Form, dient der Migration, und E2, das E1 während der Embryogenese ersetzt, spielt eine Rolle in der Embryogenese als auch in der Bildung von Axonen und Dendriten und wird am häufigsten im Hirn gefunden. Interessanterweise findet man bei alternden Menschen, Alzheimer und Down-Syndrom-Patienten, eine drastisch reduzierte Menge an Drebrin-Protein (Keon *et al.*, 2000; Peitsch *et al.*, 2005).

Drebrin verfügt über eine ADF (*actin-depolymerizing factor*)-Homologie-Domäne, die N-Terminal lokalisiert ist. Die Aktin-Bindungs-Domäne und die Aktin-Remodelierende-Region befinden sich im zentralen Anteil des Drebrins, wo auch eine *coiled coil*-Struktur anzutreffen ist. Dies ist eine der häufigsten Interaktionsdomänen von Proteinen und verleiht diesen die Fähigkeit Homodimere oder Heterodimere zu bilden, was hypothetisch zu Multimerisierung von Drebrin-Proteinen führen könnte. Die Aktin-Remodelierende-Region (AS 233-317) wurde durch Verwendung verschiedener Trunkations-Konstrukte von Drebrin entdeckt. Hierbei wurde festgestellt, daß dieser Abschnitt die Remodellierung des F-Aktins und so der Zellform induziert (Hayashi *et al.*, 1999).

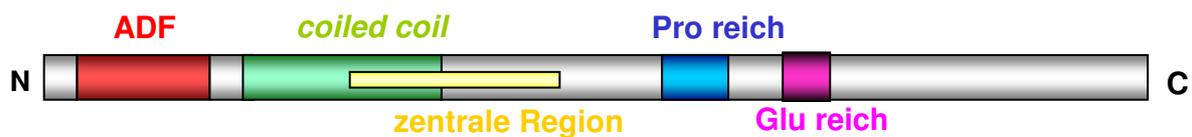


Abbildung 12: Diagramm der Drebrin Domänenstruktur. Die ADF-Homologie-Domäne (*actin-depolymerizing factor*), liegt N-Terminal gefolgt von einer zentralen Region und der *coiled coil*-Struktur. C-Terminal kommen Prolinreiche (Pro) und Glutaminreiche (Glu) Sequenzen vor.

C-terminal liegt eine Prolin-reiche Sequenz vor, die F-Aktin nur schwach bindet jedoch nicht remodeliert. Diese Prolin-reiche Sequenz ermöglicht zudem eine direkte Interaktion von Drebrin mit Profilin und bedingt dadurch eine Stimulierung der Aktinpolymerisation. Der N-terminale Bereich von Drebrin kann auch an F-Aktin binden und bedingt in etwa 50% der Fälle Aktin-Remodelierung. Eine Deletion in diesem Bereich übt jedoch keine Reduktion weder auf das Vermögen F-Aktin zu binden noch auf die Aktinremodelierung aus. Drebrin fördert im positiven Sinne die Bindungsfähigkeit von F-Aktin mit zahlreichen Aktin-modulierenden Proteinen. Auch kleine G-Proteine regulieren Reorganisation des Aktinzytoskeletts mittels einer direkten Interaktion mit Aktin-modulierenden Proteinen und so möglicherweise auch durch eine indirekte Interaktion mit Drebrin (Mammoto *et al.*, 1998; Ooe *et al.*, 2004; Peitsch *et al.*, 2001).

Drebrin bindet mit hoher Affinität an F-Aktin, jedoch konkurrierend mit den Aktin stabilisierenden Proteinen wie Tropomyosin, Fascin und α -Aktinin und fördert, wenn einmal gebunden, die Dissoziation dieser von Aktinfilamenten, wodurch die Morphogenese reguliert und die dynamische Natur des F-Aktins erhöht wird, da es kurz und ungebündelt gehalten wird. Dies hat Auswirkungen auf das Zytoskelett wie auch auf die Adhäsion zur Nachbarzelle und zum Substrat. Wenn Drebrin an F-Aktin gebunden ist, kann Aktin nicht durch Gelsolin fragmentiert werden, während mit der Bindung von F-Aktin an Tropomyosin Gelsolin seine Wirkung entfalten kann (Hayashi *et al.*, 1999; Peitsch *et al.*, 2001). Durch die Konkurrenz mit Tropomyosin inhibiert Drebrin zudem die Aktin-Myosin Interaktion und die Kontraktilität. Drebrin reduziert die Gleitgeschwindigkeit von Aktinfilamenten an immobilisierten Myosin und inhibiert die Aktin-aktivierte ATPase Aktivität von Myosin. Auf der anderen Seite führt Drebrin

zur Induktion der Aktinpolymerisation und hierdurch zu einer orientierten Migration jeweiliger Zellen (Hayashi *et al.*, 1999).

Die Lokalisierung von Drebrin und/oder den Drebrin-haltigen Partikeln, die als Drebrinosomen bezeichnet werden, an und in zellulären Protrusionen wie den Filopodien, läßt annehmen, daß dieses Protein bei der Generierung von solchen Zellausläufern partizipiert. Weiterhin wird es vermutlich auch die Funktionen solcher Strukturen regulieren und so zu Vorgängen wie u.a. der Migration führen können. Es gibt aber auch Hinweise auf die Involvierung vom Drebrin bei der Regulation der Zell-Zell-Kontakten wie *gap junctions*, wo dieses Protein mit Connexin43 colokalisiert (Butkevich *et al.*, 2004). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte auch eine zentrale Rolle von Drebrin bei der Regulation von Podosomen nachgewiesen werden.

1.11. Zielsetzung

Das aus Mikrotubuli, Aktin- und Intermediär-Filamenten sowie deren Regulatoren generierte Zytoskelett, ist für Migration und intra- und extrazellulären Transport ausschlaggebend. Insgesamt muß aber auch die Vielfalt an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen in die Regulation der äußeren Gestalt einer Zelle und ihres migratorischen Verhaltens einbezogen werden. Zwischen beiden Systemen herrschen zahlreiche Interaktionen, die die Funktionen der Zelle modulieren und auf diese Weise zahlreiche elementare Prozesse wie Wundheilung, Differenzierung und Angiogenese ermöglichen (Tanaka *et al.*, 1993).

Durch die Forschungsarbeit der letzten Jahre konnte die Anzahl von bestehenden Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten nicht nur genauer definiert sondern auch vergrößert werden (Yamaguchi *et al.*, 2002).

Auch bei den von uns durchgeführten Experimenten in primären humanen Endothelzellen konnte eine bisher nicht beschriebene Adhäsionsstruktur entdeckt werden, die im Rahmen dieser Dissertation charakterisiert werden sollte. Folgende Fragen sollten hierzu erörtert werden:

1. Handelt es sich bei den von uns in HUVEC beobachteten Podosomen-ähnlichen Strukturen tatsächlich um Podosomen? Wie ist die molekulare Zusammensetzung und die Architektur dieser Proteinkomplexe?
2. Gibt es eine bestimmte subzelluläre Verteilung dieser Strukturen? Wie kann das Vorkommen temporär und spezifisch definiert werden, wie z.B.: in konfluenten gegenüber subkonfluenten Zellen?
3. Welche Funktion/en (z.B. Adhäsion) übt dieser Proteinkomplex innerhalb der Zelle aus?
4. Welche extrazellulären Stimuli bzw. intrazellulären Signaltransduktionsketten sind an der Generierung dieser Podosomen-ähnlichen Strukturen beteiligt?
5. Hat dieser Proteinkomplex einen potentiellen Nutzen für die klinische Anwendung?

2. Material

2.1. Geräte

Autoklav:	Bioclav (Schütt Labortechnik GmbH, Deutschland)
Brutschränke:	Eukaryonten: Modell 3035 (Forma Scientific, USA) Prokaryonten: Modell 3032 (GFL, Deutschland)
Blotkammer:	Fast Blot B33 (Biometra/ B. Braun, Deutschland)
Elektrophoresekammer:	Horizontalgelkammern Sub-Cell GT, Mini-Sub und Mini-Protean II (Bio-Rad, Deutschland)
Filmkassette:	Polaroid 667 (Polaroid, Deutschland)
Geräte zur Elektroporation:	Gene PulserII, Gene Pulse ControllerII (Bio-Rad, Deutschland)
Heizblock:	Thermomixer 5437 (Eppendorf, Deutschland)
Live cell imaging:	UltraView Confocal LCI (Perkin Elmer, UK) Typ 104-QS, 1cm Schichtdicke, 1ml-Halbmikroküvette (Hellma)
Mikroinjektionsanlage:	Transjector 5246, Mikromanipulator 5171 (Eppendorf, Deutschland)
Mikroskope:	Spot Kamera (Leica, Deutschland) confocal laser scanning microscope (Leica DMIRB, Deutschland)
PCR-Thermocycler:	Mastercycler (Eppendorf, Deutschland)
pH-Meter:	pH 765 (Knick, Deutschland)
Pipetten:	Pipetman (Gilson International B.V., Niederlande)
Photometer:	Kontron Instruments (Watford, UK)
Photosystem:	Leuchttisch, UV-Kontaktlampe N90 (UniEquipe, Deutschland) Kamera, Polaroid MP4 (Polaroid, Deutschland)
Schüttelinkubator:	GFL-3031 (Gesellschaft f. Labortechnik, Deutschland)
Semidry-Blotkammer:	Fastblot B33 (Biometra, Deutschland)
Spannungsgerät:	Power Pack 200, 300 (Bio-Rad, Deutschland)
Speedvac:	UniVapo 150H (UniEquip GmbH, Deutschland)
Sterilbank:	Modell UVF 6183 (BDK, Deutschland)
Thermomixer:	Thermomixer compact (Eppendorf, Deutschland)
Ultraschall:	Sonopuls Modell HD70 & Modell UW70 Standard-Mikrospitze, konisch (Bandelin, Deutschland)
UV-Tisch:	Transilluminator TI1 (Biometra, Deutschland) UVT-28ME (Herolab, Deutschland)
Überkopfschüttler:	(Barnstead International, USA)
Vortex:	MS1 Minishaker (Ika-Works, USA)
Waagen:	Sartorius BP 2100S (Landgraf Laborgeräte, Deutschland) Sartorius MC 210S (Landgraf Laborgeräte, Deutschland)
Wipptisch:	WT 12 (Biometra, Deutschland)
Zählkammer:	Neubauer (HBG, Deutschland)
Zentrifugen:	Centrion H-401 (Kontron Instruments, UK) BIOfuge fresco (Hereaus, Deutschland) Omnifuge 2.0RS (Hereaus Sepatech, Deutschland)

2.2. Verbrauchsmaterial

Dialyseschlauch:	Spectra/Pora Membranes, MWCO: 3,5 (Roth, Deutschland)
Elektroporationsküvetten:	Gene Pulser Cuvette; 0,1 cm (Bio-Rad, Deutschland)
Filme:	X-Omat AR (Kodak, Deutschland) Polaroid 667 (Polaroid, Deutschland)
Filterpapier:	Whatman Ca251/1, 150x280mm (Schleicher & Schuell, Dassel)
Küvetten:	Quarzküvetten (Hellma, LAT, Deutschland)
Multiwell Platten:	8 Well Platte, TC (Greiner, Deutschland) 12 Well Platte, TC (Greiner, Deutschland)
Petrischalen:	Cellstar 94/16 mm (Greiner, Deutschland) Cellstar 145/20 mm (Greiner, Deutschland)
Reaktionsgefäße:	0,5 ml Polycarbonatröhrchen (Becton Dickinson, USA) 1,5 ml, 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße (Sarstedt, Deutschland) 1,8 ml Einfrierröhrchen (Nunc, Dänemark) 15 ml, 50 ml Falcons (Greiner, Deutschland) 12 ml Greiner Reagenzröhrchen (Greiner, Deutschland)
Spritzen:	Injekt 10 ml Luer (Braun, Melsungen) Omnifix 2 ml Luer (Braun, Melsungen)
Sterilfilter:	1x-Filterhalter Rotrand, 0,2 µm, steril (Schleicher & Schuell, Dassel)
Zellkulturflaschen für adhärenente Zellen:	Cellstar 75 cm ² Polystyrol, 250 ml (Greiner, Frickhausen) mit kontaminationssicherem Verschuß Cellstar 175 cm ² Polystyrol, 650 ml (Greiner, Frickhausen) mit kontaminationssicherem Verschuß

2.3. Kits

Alexa568 Protein Labelling Kit (A-10238)	(Molecular Probes, Deutschland)
Matrigel	(BD Biosciences, USA) (basement membrane matrix, phenol-red free)

2.3.1. Säulen und Aufreinigungskits

Nucleobond AX100 Midipräp Kit	(Machere Nagel GmbH, Deutschland)
Maxi Plasmid Kit, Endofree	(Qiagen, Hilden)
Mini Plasmid Kit	(Qiagen, Hilden)
MACS MicroBeads	(Miltenyi Biotech GmbH, Deutschland)
PCR-Purification Kit	(Qiagen, Hilden)
QIAEX II Gel Extraktion Kit	(Qiagen, Hilden)

2.3.2. Enzyme und Enzymkits

Restriktionsendonukleasen:	BamHI 20U/µl G↓GATCC EcoR I 20U/µl G↓AATTC EcoR V 20U/µl GAT↓ATC Hind III 20U/µl A↓AGCTT Not I 10 U/µl GC↓GGCCGC
(soweit nicht anders angegeben von New England Biolabs, Deutschland)	

Deep Vent DNA-Polymerase	(New England Biolabs, Deutschland)
T4-DNA-Ligase	(Roche Diagnostik GmbH, Deutschland)
Taq™ DNA-Polymerase	(PeqLab, Deutschland)
Trypsin/EDTA-Lösung	(Sigma, Deisenhofen)
Alligator™ Ligations Kit	(Genaxxon bioscience, Deutschland)

2.4. Antikörper

Arp2/3 (p41)	Dr. Harry Higgs	MMP-2	Oncogene
Caveolin pAb	Transduction Laboratories	MMP-9	Oncogene
Caveolin1	Transduction Laboratories	Moesin	Santa Cruz Biotechnologie
Caveolin2	Santa Cruz Biotechnologie	MT1-MMP	Oncogene
Caveolinpan	Transduction Laboratories	Myosin	Transduction Laboratories
Cofilin	Cytoskeleton	NCK	Transduction Laboratories
Cortactin	Transduction Laboratories	N-WASP	Dr. Harry Higgs
Drebrin E2/A2	Dr. W.Peitsch	Paxillin	Transduction Laboratories
Drebrin M2F6	Dr. W.Peitsch	Phosphotyrosin	Santa Cruz Biotechnologie
Drebrin Max50.8	Dr. W.Peitsch	PHOX	BD Biosciences
Drebrin Max823.50.8	Dr. W.Peitsch	PI3-Kinase	Transduction Laboratories
Drebrinpep	Dr. W.Peitsch	Profillin	Cytoskeleton
Ezrin	Transduction Laboratories	Pyk 2	Transduction Laboratories
FAK	Upstate	Talin	Chemicon
GK(swap70)-1	Dr. M. Bähler	Tubulin	Cytoskeleton
GK(swap70)-2	Dr. M. Bähler	VASP	ImmunoGlobe
Integrin α5β1	Chemicon	VAV	Santa Cruz Biotechnologie
Integrin αV	Chemicon	VE-Cadherin	Phar Mingen
Integrin β1	Chemicon	Vinculin	Santa Cruz Biotechnologie
Integrin β2	Chemicon	WASp	Cytoskeleton
MMP-1	Oncogene	WAVE-scar	Chemicon

Tabelle 2: Übersicht über primäre Antikörper. Aufgelistet sind hier alle im Laufe der Experimente eingesetzten Antikörper mit Bezugsquelle. (Verdünnung 1:20 bis 1:200).

<i>goat-anti-rat</i> IgG, FITC oder TRIC-markiert [1,5 mg/ml]	Molecular Probes, Deutschland
<i>goat-anti-guinea pig</i> IgG, FITC oder TRIC -markiert [1,5 mg/ml]	Molecular Probes, Deutschland
<i>goat-anti-mouse</i> IgG, FITC oder TRIC -markiert [1,5 mg/ml]	Molecular Probes, Deutschland
<i>goat-anti-rabbit</i> IgG, FITC oder TRIC -markiert [1,5 mg/ml]	Molecular Probes, Deutschland

Tabelle 3: Übersicht über sekundäre Antikörper. Aufgelistet sind hier alle im Laufe der Experimente eingesetzten Antikörper mit Bezugsquelle. (Verdünnung 1:200).

Rhodamin-Phalloidin

(Molecular Probes, Deutschland)

2.5. Chemikalien

A

Agarose, ultraPure (Life Technologies, Deutschland)
Ampicillin (Invitrogen, Leek, Niederlande)

B

Bacto-Agar (Difco, USA)
Bacto-Hefeextrakt (Difco, USA)
BSA, Albumin Fraktion V (Boehringer, Deutschland)
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (Biomol, Deutschland)
Bromphenolblau (Serva, Deutschland)

C

Coomassie Brilliantblau (Gibco BRL, Deutschland)
complete mini (Roche, USA)

D

DEPC (Sigma, Deutschland)
Dodecylsulfat (SDS) (Serva, Deutschland)
DTT (Boehringer, Deutschland)

E

Essigsäure (Eisessig) (Baker, USA)
Ethanol (Baker, Usa)
Ethidiumbromid (Sigma, Deutschland)
Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)
-N,N'-tetraessigsäure(EGTA) (Serva, Deutschland)

F

Formaldehyd (Sigma, Deutschland)

G

Glycerin (Sigma, Deutschland)
Glycin (Biomol, Deutschland)
Glycogen (Boehringer, Deutschland)

I

Igepal CA-630 (Sigma, Deutschland)
Isopropyl-b-D-thiogalactosid (IPTG) (Biomol, Deutschland)
Isopropanol (Sigma, Deutschland)

M

Magermilchpulver (Biorad, Deutschland)
Magnesiumsulfat-Hexahydrat (Riedel-de Haën, Deutschland)
Methanol (Baker, Deventer, Niederlande)
MOPS (Sigma, Deutschland)

N

Natriumacetat	(Sigma, Deutschland)
Natriumhydroxid	(Riedel-de Haen, Deutschland)
Natriumpyruvat	(Gibco BRL, Deutschland)
N,N'-Methylenbisacrylamid	(Roth, Deutschland)
N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin	(Roth, Deutschland)
dNTP`s	(Amersham, Deutschland)

P

Penicillin (10000U/ml)/Streptomycin (10000µg/ml)	(Biochrom/Seromed, Deutschland)
Ponceau-S	(Sigma, St. Louis, USA)

S

Salzsäure	(Riedel-de Haen, Deutschland)
Silbernitrat	(Serva, Deutschland)
Sodiumorthopervanadat	(ICN Biomedicals Inc., USA)

T

Triton X-100	(Sigma, Deutschland)
Tween 20	(AppliChem, Deutschland)

Alle anderen Chemikalien wurden in p.A. Qualität von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

2.6. Vektoren**2.6.1. Der Vektor pEGFP-C1**

(Clontech, USA)

Der Vektor pEGFP-C1 wurde nicht für die Klonierung verwendet, sondern zur Transfektion von HUVEC-Zellen. Über GFP(*green fluorescent protein*)-Expression ist es schnell und einfach möglich eine Effizienzrate zu detektieren und Experimente mit Hilfe von *live cell imaging* oder Fluoreszenzmikroskopie auszuwerten.

2.6.2. mRFP

(New England Biolabs, Deutschland)

Der Vektor mRFP wurde nicht für die Klonierung verwendet, sondern zur Transfektion von HUVEC-Zellen. Über RFP (*monomeric red fluorescent protein*)-Expression ist es schnell und einfach möglich eine Effizienzrate zu detektieren und Experimente mit Hilfe von *live cell imaging* oder Fluoreszenzmikroskopie auszuwerten.

2.6.3. pGEX-2T

(Pharmacia, Deutschland)

Mit dem Expressionsvektor pGEX-4T können Glutathion-S-Transferase (GST) Fusionsproteine in große Mengen erzeugt werden, zudem ist es möglich unter Einsatz dieses Vektors *pull down*-Versuche durchzuführen. Aus diesem Grunde wird dieser Vektor auch bei Klonierungsexperimenten zur Herstellung von Drebrinkonstrukten verwendet. Eine Aufreinigung kann über Affinitätschromatographie mit Glutathione Sepharose 4B erfolgen.

2.6.4. pMAL

(New England Biolabs, Deutschland)

Mit Hilfe des pMAL-Expressionsvektors (6148 bp) können Fusionsproteine mit Maltosebindendem Protein (MBP) exprimiert werden, die dann über Affinitätschromatographie mit Maltoseharz isoliert werden können. Zudem kann dieser Vektor in *pull down*-Versuchen eingesetzt werden und diente der Klonierung von Drebrin-Konstrukten.

2.7. Molekulargewichtsmarker

DNA-Marker:

Smart SF Ladder (Eurogentec, Heidelberg): 14 Banden zwischen 200 - 10 000 bp: 10 kbp / 8 kpb / 6 kpb / 5 kpb / 4 kpb / 3 kpb / 2,5 kpb / 1 kpb / 0,8 kpb / 0,6 kpb / 0,4 kpb / 0,2 kpb

Protein-Marker (peqlab, Deutschland):

Der *prestained* Marker wird im Westernblot eingesetzt.

low range (kDa): 102 / 81 / 46,900 / 32,700 / 20,200 / 24,000

SDS-PAGE (BioRad, Deutschland):

Molecular Weight Standard, Low Range

Dieser Marker wird bei der SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung eingesetzt.

Fragmente in kDa: 97,4 / 66,2 / 45 / 31 / 21,5 / 14,4

2.8. Oligonukleotide

Alle Primer wurden in einem Maßstab von 0,2 µmol bei MWG synthetisiert. Die Primer werden im autoklavierten Aqua dest. aufgenommen.

Primer	Sequenz	Zielvektor
Drebrin13_for	5'-GGGAGCAGGGATCCGAGGAGCACA-3'	pGEX-2T
Drebrin1_rev	5'-CTGTCCAGGTGGAATTCCTATCGATGGTTGA-3'	pGEX-2T
Drebrin33_for	5'-AGTCCGGACTCCGATCCGCCGGCGTCAG-3'	pGEX-2T
Drebrin-33_rev	5'-GTTTCCTCCTGAATTCCTAGATCTGCT-3'	pGEX-2T
ADF_33_rev	5'-CTGGAGAGGAATTCCTAGCCGTTAGAGAG -3'	pGEX-2T
coco_11_for	5'-AAGACGGATGGATCCGTGGAAATG -3'	pGEX-2T
coil_11_rev	5'-TCCCGATGGAATTCCTAGATAGAC -3'	pGEX-2T
Drebrin22pmal_for	5'-TCGCCCTTCAACGAATTCCTCCAGGAAG-3'	pMAL-p2X
Drebrin22pmal_rev	5'-TAGGGCTGGCGAAGCTTCTAATCACCA -3'	pMAL-p2X

Tabelle 4: Zur Klonierung verwendete Oligonukleotide. Aufgelistet sind alle zur Klonierung synthetisierten Primer mit Sequenz und dem Zielvektor.

2.9. Puffer und Lösungen

DNA-Gele:

25 x TAE: 1 M Tris-Acetat pH 8,1, 25 mM EDTA pH 8,0

Verwendung: Verdünnung auf 1 x Konzentration und Zugabe von 5 µl EtBr je 100 ml Puffer

Puffer:

1 x PBS: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ in 800 ml aq.dest lösen, pH auf 7,4 mit HCl einstellen, ad 1 L mit aq.dest

5 x SDS-Probenpuffer: 5 ml 0,5 M Tris/HCL pH 6,8, 2 ml Glycerol, 0,8 g SDS, 1 ml 0,5% Bromphenolblau, 2 ml H₂O_{dd} [gelösten Bestandteile sterilfiltriert, 1:5 aufs gewünschte Endvolumen verdünnt – zusammen mit 5% β-Mercaptoethanol]

10 x DNA-Auftragspuffer: 100 mM EDTA, 2% SDS, 60% Glycerin, Spatelspitze Bromphenolblau

IP-Puffer: 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1% Triton-100, 50 mM Tris pH 7,4, 10% Glycerol, 1 Tablette Protease-Inhibitoren (als Waschpuffer diente eine Lsg. gleicher Zusammensetzung mit jedoch nur 0,1% Triton-100 bzw. Igepal CA-630)

Mikroinjektionspuffer: 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,4, 5 mM MgCl₂

pulldown – Puffer: 25 mM Tris (pH 7,2), 137 mM NaCl, 10% Glycerol, 1% Igepal CA-630, 25 mM NaF, 10 mM NaPPi, 1 mM EDTA, 1 Tablette *complete*, 1% DTT (frisch) (als Waschpuffer diente eine Lsg. gleicher Zusammensetzung mit jedoch nur 0,1% Triton-100)

T/E-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0

Puffer für Proteinaufreinigung:GST-Fusionsproteine:

Lysepuffer: 50 mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DDT, Leupeptin 1 μg/ml, Pepstatin 1 μg/ml, Aprotinin 475 μg/ml, Pefabloc 1 μg/ml

Resuspensionspuffer: 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DDT

Dialysepuffer: 10 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM DDT

MBP-Fusionsproteine:

Säulenpuffer: 20 mM Tris pH 8, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA

Dialysepuffer: 20 mM Tris pH 8, 25 mM NaCl

Puffer für SDS-PAGE:

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris, 1 g SDS ad 250 ml H₂O_{dd}, pH 8,8

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris, 1 g SDS ad 250 ml H₂O_{dd}, pH 6,8

Running-Puffer: 25 mM Tris, 0,1 g SDS, 192 mM Glycin

Blotting-Puffer: 25 mM Tris, 196 mM Glycin

TBS: 20 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl

TBST: TBS mit 0,3% Tween

2.10. Bakterienkulturen

2.10.1. Bakterienstämme

ELEKTROMAX DHα –E Zellen (Life Technologies, Eggenstein):

Genotyp: F- f 80dlacZDM15 (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rK-, mK+) gal-phoA supE44 l- thi-1 gyrA96 relA1.

2.10.2. Kulturmedien für Bakterien

Luria-Broth-Medium (LB-Medium):

10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 10 g NaCl mit aq.dest ad 1L, pH 7,5, autoklavieren

LB-Agar:

10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 10g NaCl, 15g Bacto-Agar mit aq.dest ad 1L, pH 6,9, autoklavieren

SOB-Medium:

20 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 5g NaCl, 1,5 g KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ mit aq.dest ad 1L, pH 6,9, autoklavieren

SOC-Medium:

SOB-Medium mit 20 mM Glucose

Die LB-Medien wurden von Fa. Difco (Detroit, USA) bezogen. Bei Zugabe von Antibiotikum wurde folgende Konzentration eingesetzt: Ampicillin: 80 µg/ml, Stammlösung 1 g/20 ml in aq.dest (sterilfiltriert), Aufbewahrung bei -20°C.

2.11. Zellkultur

2.11.1. Zelllinien – primäre Zellkultur

Die Isolierung beider Zelltypen [Monocyten: aus Blut; HUVEC-Zellen: aus Nabelschnur] erfolgte kurz vor Verwendung. Maximal wurden HUVECs bis Passage sechs verwendet.

2.11.2. Nährmedien

Endothelial cell growth medium + Supplement	(PromoCell, Deutschland)
DMEM (1x) high Glucose + 20% FCS	(PAA Laboratories GmbH, Österreich)
OPTI-MEM	(Gibco BRL, Eggenstein)

Einfriermedium:

(20% FCS mit 10% DMSO, sowie das jeweils für die Zelllinie erforderliche Medium)

PBS mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺	(PAA Laboratories, Österreich)
PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	(PAA Laboratories, Österreich)

Alle verwendeten Medien wurden mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin [und Gentamycin 100 µg/ml] supplementiert, um die Gefahr von bakterieller Kontamination zu minimieren. Die Zellen wurden bei 37°C in feuchter Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert.

3. Methoden

3.1. Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

[Saiki et al., 1988]

Die PCR ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge und Sequenz. Hierzu benötigt werden zwei Oligonukleotide, die jeweils komplementär homolog zu dem (+)-Strang des einen Endes und zu dem (-)-Strang des anderen Endes der zu amplifizierenden DNA-Region sind. Nach Hitzedenaturierung der DNA können sich diese *primer* bei der anschließenden Abkühlung des Reaktionsansatzes an die DNA-Matrize anlagern. Eine hitzestabile Polymerase erstellt ausgehend vom 3'-OH-Ende des Oligonukleotides durch *primer*-Extension eine Kopie der DNA-Matrize. Nachdem die gewünschte Sequenz synthetisiert ist, werden die Stränge durch Hitzeeinwirkung voneinander getrennt. Durch erneute schnelle Senkung der Temperatur wird eine spezifische Bindung der *primer* an die entstandenen DNA-Stücke ermöglicht. Durch mehrmaliges Wiederholen dieser Zyklen erreicht man eine vielfache Vermehrung des definierten DNA-Bereiches zwischen den *primern*.

Die Ausbeute und Spezifität der PCR ist im starken Maße von den experimentellen Parametern, wie der Magnesiumkonzentration und dem pH-Wert im Ansatz, der Menge und Qualität des *templates*, der Anzahl der Zyklen und der Dauer und Temperatur der einzelnen Schritte abhängig. Hierbei lassen sich folgende Reaktionsschritte unterscheiden:

1. Hitzedenaturierung: durch Hitzebehandlung (94°C) wird die DNA in Einzelstränge zerlegt, die dann als *template* für DNA-Polymerase dienen.

2. *annealing*: zunächst müssen für die verwendeten *primer* die *annealing* Temperaturen nach der Formel:

$([\text{Anzahl A} + \text{T}] \times 2) + ([\text{Anzahl G} + \text{C}] \times 4) = T_m$, ermittelt werden. T_a^{opt} liegt 3 - 5°C unter der errechneten Schmelztemperatur.

3. Elongation: [*primer*-extension im Temperaturoptimum der Polymerase (ca.72°C) durch Nukleotidveresterung] Die Elongationszeit sollte an die Länge des zu amplifizierenden Produkts angepaßt sein. In einer durch die DNA-Polymerase in Gegenwart von dNTP's katalysierten Reaktion werden die Einzelstränge zum Doppelstrang aufgefüllt.

Die doppelsträngigen PCR-Produkte werden nach Ablauf der Reaktionen in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

Zyklus	Anzahl	Zeit	Temperatur	50 µl Reaktionsansatz	
Vorzyklus (1x):	94°C	300 sec	Denaturierung	Menge	Substanz (im Ansatz)
Hauptzyklus (30x):	55°C	60 sec	Annealing	5 µl	10x PCR-Puffer (1x)
	72°C	60 sec	Extension	1 µl	10 µM <i>primer</i> 1 (1 µM)
	94°C	60 sec	Denaturierung	1 µl	10 µM <i>primer</i> 2 (1 µM)
Endzyklus (1x):	55°C	60 sec	Annealing	1 µl	je 2 mM dNTP's (je 200 µM)
	72°C	360 sec	Extension	0,5 µl	5 U/µl Taq-DNA-Polymerase (2,5 U)
	4°C	unendlich	Abkühlen	20 ng	DNA-Matrize - mit x µl autoklaviertes Aqua dest. auf 50 µl auffüllen

Tabelle 5: Im Thermocycler durchgeführter standard Reaktionsablauf und Reaktionsansatz. Die angegebenen *annealing*-Temperaturen werden zum jeweiligen *primer*-Paar entsprechend errechnet und die Zeiten den der entsprechenden Sequenz angeglichen.

3.1.2. Kolonie-PCR

Zur Analyse der vorgefundenen Klone werden jeweils 15-50 Kolonien gepickt, und als Übernachtskultur je in 5 ml LB-Medium und 8 µl selektiven Antibiotikum angeimpft. Aus der ON-Kultur wird je 1 µl der Bakteriensuspension in 9 µl A.bidest. aufgenommen und für 10 min bei 94°C erhitzt. Nach dieser Denaturierungsreaktion folgt die Zugabe von 14 µl *mastermix* (*primer*, Puffer, dNTP's und Taq-Polymerase).

Zyklus	Anzahl	Zeit	Temperatur
Vorzyklus	1 x	180 sec	94°C
Hauptzyklus	28 x	60 sec	55°C
		90 sec	72°C
		60 sec	94°C
Endzyklus	1 x	15 min	72°C
		∞	4°C

Tabelle 6: Im Thermocycler durchgeführter Reaktionsablauf. Die angegebenen *annealing*-Temperaturen werden zum jeweiligen *primer*-Paar entsprechend errechnet und die Zeiten den der entsprechenden Sequenz angeglichen.

3.2. Gelelektrophorese – Qualitative Analyse der Nukleinsäurelösungen

[Ogden R.C. und Adams D.A.; 1987]

Die Elektrophorese ist ein biophysikalisches Trennverfahren, bei dem die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld zu deren Trennung ausgenutzt wird. Das Verfahren kann sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken eingesetzt werden. Nukleinsäuren wandern bei der Elektrophorese zur Anode, da sie aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats bei allen pH-Werten negativ geladen sind. Die Längsachsen einzelner DNA-Moleküle sind parallel zu den elektrischen Feldern ausgerichtet und die Moleküle bewegen sich schlangenartig durch die Poren des Gels und wandern schlußendlich bei gleicher Länge in eine entsprechende Bande. Das Wanderungsverhalten hängt von der Nettoladung der Moleküle, die Wanderungsgeschwindigkeit von der Stärke des angelegten elektrischen Felds, der Größe und Form der Moleküle und der Porengröße der verwendeten Matrix ab.

Trenneigenschaften von Agarose-Gelen		
Konzentration (%)	Trennbereich (kb)	Bromphenol (bp)
0,7	0,8 – 12	700
1,0	0,5 – 7	300
1,2	0,4 – 6	200
1,5	0,2 - 3	120

Tabelle 7: Trennbereiche von Agarosegelen. Zusätzlich sind die Längen der Fragmente angegeben, die mit den Farbstoff Bromphenol komigrieren.

Die benötigte Agarosemenge wird in 100 ml 1 x TAE-Puffer aufgenommen und in der Mikrowelle aufgeköcht, auf 60°C abgekühlt, mit 5,0 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) versetzt und zum Polymerisieren in den Gelträger gegossen. Als Laufpuffer wird 1 x TAE (mit 0,5 µg/ml EtBr Endkonzentration) eingesetzt.

Die DNA-Proben werden vor dem Auftragen 1:10 mit 10 x Beladungspuffer verdünnt, wobei das darin enthaltene Bromphenolblau als Farbmarker für die Elektrophoresefront dient. Die Elektrophorese wird bei konstant 120 V/40 mA durchgeführt. Die Agarosegele werden nach der Elektrophorese mit UV-Licht (312 nm) bestrahlt. Der Nachweis der DNA erfolgt aufgrund des interkalierten Ethidiumbromids, das im sichtbaren Licht rot-orangefarbig (590 nm) fluoresziert. Die Sensitivität der Detektion kann als sehr hoch eingestuft werden, da die Nachweisgrenze unter einem Nanogramm Nukleinsäure pro Bande liegt.

3.3. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

[Vogelstein B, Gillespie D, 1979]

Die Firma Qiagen stellt eine schnelle und einfache Methode der Isolierung und Aufreinigung von elektrophoretisch aufgetrennter, linearer DNA-Fragmente aus Agarosegelen zur Verfügung. Es handelt sich hierbei um das QIAquick Gel Extraktions Kit. Dieses Kit ist für die Gewinnung von bis zu 10 µg linearer DNA aus Agarosegelen konzipiert und wird laut dem Herstellerprotokoll verwendet.

3.4. Präzipitation von Nukleinsäuren

[Wallace, 1987]

3.4.1. Natrium-Acetatfällung von Nukleinsäuren

Bei der Alkohol-Fällung handelt es sich um ein Verfahren zur Aufreinigung von Nukleinsäuren. Nach der Zugabe von Alkohol und eines monovalenten Salzes, welches in hoher Konzentration vorliegt kommt es zur Aggregation der Nukleinsäuremoleküle, die sich in der folgenden Präzipitation widerspiegelt. Niedermolekulare Oligonukleotide, Nukleotide und Salze bleiben aber im Überstand gelöst. Die Ethanol-fällung kann demnach zur Entfernung von Phenolresten nach Phenol-Chloroform-Extraktion, zum Entsalzen von Ligationsansätzen vor der Elektroporation, zum Umpuffern und zur Konzentrierung von DNA eingesetzt werden.

Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgt durch Zugabe von 1/10 des Ausgangsvolumens einer 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 5,2), dem 3 fachen Volumen an 96%igem eiskalten Ethanol und 1 µl einer Glycogenlösung (20 mg/ml). Anschließend wird bei -70°C für mindestens 30 min inkubiert danach für 30 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert, das Pellet mit 500 µl 70%igem eiskalten Ethanol gewaschen, und erneut für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Nukleinsäuren-haltige Sediment in 1 x TE-Puffer oder autoklaviertes A.bidest. aufgenommen.

3.4.2. Isopropanolfällung von DNA

Um DNA in einer wässrigen Lösung zu konzentrieren, wird diese mit Isopropanol versetzt. Auf diese Weise wird der DNA die Hydrathülle entzogen, wodurch die DNA ausfällt. Dieser Effekt wird durch die Zugabe von Na-Acetat noch verstärkt. Isopropanol fällt Nukleinsäuren viel effektiver als Ethanol, was vor allem bei größeren Volumina interessant ist.

Es erfolgt als erstes eine Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 5,2) zum DNA-Präparat, als auch die von 0.6 x Volumen-Teilen Isopropanol. Danach inkubiert man 30 min bei -70°C und zentrifugiert 30 min bei 13000 rpm und 4°C. Der Überstand wird vorsichtig abgegossen, das Pellet in 1 ml 70% Ethanol gewaschen und nochmals kurz zentrifugiert. Das Pellet wird anschließend getrocknet und die DNA in adäquater Menge TE-Puffer oder A.bidest. aufgenommen.

3.5. Enzymatische Behandlung von DNA-Molekülen

3.5.1. Verdau der DNA durch Restriktionsendonukleasen

[Meselson & Yuan, Linn & Arber, 1969]

Zur Konstruktion von Insert und Vektorrahmen, zur Überprüfung von PCR-Produkten, sowie zu allgemeiner Überprüfung, werden ds DNA-Moleküle mit geeigneten Restriktionsenzymen gespalten. Diese Restriktionsendonukleasen werden entsprechend den Herstellerangaben mit vorgeschriebenen Reaktionspuffern eingesetzt, und eine entsprechende Zeit bei gegebener Temperatur im Reaktionsansatz inkubiert, da die Effizienz einer Restriktionsspaltung davon abhängig ist.

Restriktionsenzyme gehören zu der Gruppe der Endonukleasen und spalten Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäuren durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung. Man unterscheidet drei Klassen von Restriktionsenzymen. In der Molekularbiologie wird nur Typ II der Restriktionsenzyme benutzt, da diese palindromische Tetra- bis Oktanukleotidsequenzen erkennen und die DNA innerhalb dieser Erkennungssequenzen hydrolysieren, wobei lediglich Mg^{2+} -Ionen als Cofaktoren benötigt werden. Dabei entstehen entweder glatte- (*blunt-ends*) oder 5'- bzw. 3'- überstehende (*sticky ends*) Enden. Bei analytischen Restriktionsspaltungen werden 100 - 500 ng dsDNA mit 10fach Restriktionspuffer (1:10/Ansatz) und mit A.bidest. auf das benötigte Volumen aufgefüllt, sowie je für die DNA-Menge nötigen U der gewünschten Restriktionsenzyme versetzt. Es werden ca. 5U Restriktionsendonuklease pro 1 µg DNA eingesetzt. Bei einigen Restriktionsenzymen muß insbesondere darauf geachtet werden, daß die Glycerinkonzentration im Reaktionsansatz unter 5% liegt, damit es nicht zu einem Verlust der Hydrolyseaktivität oder zu unspezifischen Spaltungen (Staraktivität) kommt. Nach der vorgeschriebenen Inkubation der Verdau, werden die Restriktionsenzyme durch Erhitzen oder Zugabe von 1:10 10 x Laufpuffer inaktiviert.

3.5.2. Ligation

[Brady & Timmis, 1983]

Nach Spaltung sowohl von Insert als auch Vektor durch die gleichen Restriktionsendonukleasen ist eine enzymatische Neuverknüpfung derselben möglich. Hierbei katalysieren DNA-Ligasen die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen einer freien 5'-Phosphat-Gruppe und einer freien 3'-Hydroxyl-Gruppe. Die vom T4-Bakteriophagen codierte DNA-Ligase benötigt als energieliefernden Cofaktor ATP und hat ein Temperaturoptimum das bei 37°C liegt. Eine Zirkularisierungsreaktion ist erwünscht, da ein Klonierungsvektor nur als zirkuläres Molekül in der Zelle biologisch aktiv ist und dort nur in dieser Form existieren kann. Die Selbstzirkularisierung des Vektors ohne Einbau des zu klonierenden DNA-Fragments muß vermieden werden. Ebenfalls unerwünscht ist die Concatemerisierung oder Oligomerisierung, d.h. die Ausbildung von Dimeren und anderen Multimeren eines DNA-Moleküls. Zur Unterdrückung dieser unerwünschten Reaktionen existieren mehrere Strategien, wie z.B. das forcierte Klonieren bei dem Vektormoleküle mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut werden.

Ob überwiegend inter- oder intramolekulare Reaktionen ablaufen, kann man primär anhand der Längen der zu ligierenden DNA-Moleküle und der Konzentration der freien Enden in einem Reaktionsansatz bestimmen. Kleine DNA-Fragment erhöhen das Zustandekommen intramolekularen Rezirkularisierung und durch die Erhöhung von freien Enden werden bimolekulare Reaktionen wahrscheinlicher.

Die Ligationen werden 16 h bei 14°C in 1x Ligase-Puffer mit 2 U T4-Ligase in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt. Anschließend folgt eine Inkubation bei 65°C für 10 min, wodurch die T4-DNA-Ligase inaktiviert wird. Vor der Transformation der Bakterien durch Elektroporation werden die Ligationsansätze zum Entsalzen mit Ethanol gefällt.

Bei der Ligation mit dem Alligator Kit wird nach Anleitung des Herstellers verfahren.

3.6. Transformation von Bakterien

[Dower et al., 1988]

Unter Transformation versteht man die Einschleusung von freier, löslicher DNA in eine Bakterienzelle. Die zur Transformation verwendeten Zellen werden durch Vorinkubation in Calciumchlorid-Lösungen für die Aufnahme von DNA-Molekülen empfänglich gemacht, indem ihre Zelloberfläche hierzu notwendige Modifikationen erfährt (kompetente Zellen). Die Fähigkeit der Bakterienzelle, DNA aufzunehmen, ändert sich mit dem physiologischen Zustand der Zelle, und ist in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase am höchsten.

Es sind verschiedene Techniken zur Einführung der DNA entwickelt worden, wobei in dieser Arbeit hauptsächlich das Elektroporationsverfahren angewendet worden ist. Hierbei handelt es sich um eine effiziente Transformationsmethode, durch die eine hohe Transformationsfrequenz bei einer Vielzahl von Zellsorten erreicht werden kann. Beim Elektroporationsverfahren werden die Zellmembranen der in Suspension befindlichen Empfängerzellen durch kurze (10 μ s) elektrische Pulse hoher Feldstärke (ca. 12,5 kV/cm) für hochmolekulare, exogene DNA durchlässig gemacht. Die Waschschrte beim Herstellen der elektrokompenten Zellen sind entscheidend, um die Bakterienzellen zu entsalzen, wodurch die Leitfähigkeit der Bakteriensuspension auf ein niedrigeres Niveau gebracht wird, und so Kurzschlüsse vermieden werden können.

3.7. Herstellung elektrokompetenter Bakterien

[Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW, 1988]

200 ml LB-Medium werden mit einer 5 ml Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,6 (mittlere exponentielle Wachstumsphase) bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend werden die Zellen, aliquotiert a 100 ml, 1 h auf Eis abgekühlt und 10 min bei 5000 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und das Zellsediment in je 100 ml kalter, 1%-iger Glycerin-Lösung behutsam resuspendiert. Es folgt ein Zentrifugationsschritt. Erneut wird das Pellet in je 100 ml 1%-iger, kalter Glycerin-Lösung resuspendiert und wie oben zentrifugiert. Das Pellet wird nach dem letzten Waschschrte in je 500 μ l 1%-iger, kalter Glycerin-Lösung resuspendiert. Die Bakterien werden in vorgekühlten 0,5 ml Reaktionsgefäßen a 100 μ l Aliquots in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Weil frische Zellen jedoch deutlich bessere Ergebnisse liefern als tiefgefrorene, wird eine Test-Transformation ein Tag nach Herstellung der kompetenten Zellen durchgeführt. Nach Transformation mit 2 μ g Plasmid-DNA wird die Transformationskompetenz K der Zellen nach folgender Formel bestimmt:

$$K = \frac{n \times V_0 \times f}{m \times V_1} \quad [\text{cfu}/\mu\text{g}]$$

Tabelle 8: Berechnung der Transformationskompetenz kompetenter Zellen. Die Legende zur Formel: cfu: *colonie forming units*; f: Verdünnungsfaktor des Transformationsansatzes vor dem Ausplattieren; m: eingesetzte Plasmidmenge in μ g; n: Anzahl der Kolonien; V_0 : Volumen des Transformationsansatzes in ml; V_1 : ausplattiertes Volumen in ml

3.8. Elektroporation von Plasmid-DNA

[Johnston SA, Tang DC, 1994]

48-49,5 µl elektrokompente Bakterien werden auf Eis aufgetaut und nach Zugabe des Ligationsansatzes (0,5-2,0 µl) 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird das Gemisch in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Es folgt die Elektroporation bei: Widerstand $R=200-400 \text{ W}$, Kondensatorkapazität $C=25 \text{ µF}$ und Ausgangsspannung $U=2,5 \text{ kV/cm}$. Direkt nach dem Puls werden die elektroporierten Zellen in 800 µl SOC-Medium überführt und bei 37°C zur Regeneration der Zellen und zur Ausbildung der Plasmid-kodierten Antibiotikaresistenz 45-60 min im Schüttelinkubator inkubiert. Es folgt eine Ausplattierung der Ansätze auf selektiven LB-Platten, die bei 37°C ON inkubiert werden. Bei den Kontrollen und Ligationsansätzen werden je 100 µl aus dem Ansatz entnommen und ausplattiert. Die gewachsenen Kolonien werden gescreent, dann falls positiv, einzeln in antibiotikahaltiges LB-Medium überführt, aus dem die Plasmid-Präparation erfolgt.

3.9. Plasmid-DNA-Präparation

3.9.1. Plasmid-Minipräparation

[Birnboim und Doly, 1979]

Bei dieser Extraktion von Plasmid-DNA kann eine hohe Reinheit, da neben Proteinen auch RNA und chromosomale DNA entfernt werden.

Die Aufreinigung erfolgt über alkalischen Lyse in Anlehnung an die Methode von Birnboim und Doly in Kombination mit anschließender Säulenchromatographie. Bei der Bakterienlyse mittels alkalischer Lyse wird die bakterielle DNA effektiv entfernt, da der Sachverhalt ausgenutzt werden kann, daß DNA bei stark alkalischen pH denaturiert ($\text{pH}=12-12,5$). Nach einer Neutralisation können beide Stränge der Plasmid-DNA rasch hybridisieren, während die weit größere chromosomale DNA einzelsträngig bleibt und ausfällt.

3.9.2. Plasmid-Midipräparation

Für präparative Zwecke erfolgt die Plasmid-Midipräparation, wodurch größere Mengen an Plasmid-DNA in einer reinen Form isoliert werden können. Endotoxin-freie DNA-Präparation wird für alle zur Transfektion verwendeten Plasmide benutzt, um aus der Bakterienmembran stammenden Endotoxine zu entfernen, die sonst die Transfektionseffizienz herabsetzen würden. Die Präparation erfolgt nach Anleitung des Herstellers Quiagen.

3.10. Zellbiologische Arbeitsmethoden

3.10.1. Isolierung und Kultivierung der humanen Nabelschnur-Zelllinie

Humane Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) isoliert man direkt aus einer Nabelschnur. Hierbei wird diese in eine sterile Apparatur befestigt und gründlich abgespült (PBS), wie auch desinfiziert (EtOH), um noch vorhandene Blutreste zu entfernen. Anschließend wird eine Kanüle in die *Vena umbilicalis* eingeführt, mit einer Arterienklemmen abgedichtet und fixiert. Hierdurch kann diese Vene mit Gentamycinhaltigen-PBS [50 µg/ml / 37°C] ausgewaschen, nachfolgend mit einer Chromotrypsinlösung [100 mg/ml / 37°C] bis zum Aufblähen gefüllt und mit einer weiteren Klemme abgedichtet werden. Nach einer 30 min Inkubation im Brutschrank wird der Inhalt der so behandelten *Vena umbilicalis* in ein 50 ml – Falconröhrchen mit FCS-haltigen-Medium eluiert. Dieses Eluat wird für 10 min bei 1200 rpm,

RT zentrifugiert, das Pellet im Kulturmedium resuspendiert, passagiert und für weitere 2 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird ein Mediumwechsel vorgenommen und weitere in Abständen von 3 d.

Das Beschichten der Oberflächen von Zellkulturgefäßen mit Collagen/A.bidest. (1:40) erfolgte vor jeder Subkultivierung dieser Monolayerkultur. Danach konnten die Zellen ausgesät werden. Hierzu werden 10 ml des Stopp-Mediums in ein Falcon-Röhrchen vorgelegt. Von den zu passagierenden Zellen wird das Kulturmedium abgenommen, die Zellen 1 mal mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen, mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung versetzt und 1-2 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellsuspension wird abgesaugt, in das vorbereitete Stopp-Medium pipettiert und für 5 min bei 1.000 rpm und RT abzentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und das Zell-Pellet im frischen Kulturmedium resuspendiert, ausverdünnt und auf vorbereitete Zellkulturflaschen und/oder *coverslips* verteilt.

3.10.2. Zellzahlbestimmung

Die Zelldichte (Titer, Zellzahl/ml) läßt sich durch direktes Auszählen von Zellen in einem definierten Volumen bestimmen. Ein 10 μl Aliquot der Zellsuspension wird in der Neubauerkammer ausgezählt. Der Zelltiter wird nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zelldichte} = \frac{\text{Zahl ungefärbter Zellen} \times 2}{4} \cdot 10^4$$

3.10.3. Transfektion von HUVEC-Zellen

3.10.3.1. Transfektion mit Lipofectamin

Ein Tag vor der Transfektion werden 2×10^6 HUVEC-Zellen in einer Zellkulturflasche ausgesät, damit am nächsten Tag 40 - 60% Konfluenz erreicht werden konnten. Am nächsten Tag wird das Wachstumsmedium ca. 2 h vor der Durchführung der Transfektion entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und in OPTI-MEM-Medium inkubiert. In einem sterilen Reaktionsgefäß werden 1,5 μg Plasmid-DNA in 100 μl OPTI-MEM-Medium verdünnt und für 30 min bei RT inkubiert. In einem weiteren Reaktionsgefäß werden 5 μl Lipofectin in 100 μl OPTI-MEM verdünnt, und ebenfalls für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend werden beide Lösungen sorgfältig vermischt und 15 min bei RT inkubiert. Danach wird der Ansatz mit 400 μl OPTI-MEM aufgefüllt und den HUVEC-Zellen zugesetzt. Nach 5 stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 werden 400 μl Stopplösung (Kulturmedium+Supplement) zugesetzt. Nach Ablauf von einer weiteren Stunde, wie auch einen Tag später folgte ein Mediumwechsel. Die transfizierten Zellen werden 48 h nach der Transfektion zur Versuchsauswertung hinzugezogen.

3.10.3.2. Transfektion mit Amaxa

Für die Immunfluoreszenz, *live cell imaging* und *western-blots* werden HUVEC-Zellen mit den gewünschten Vektoren nach Protokoll des Herstellers transfiziert (Programm U-01). Wenige Stunden nach der Transfektion erfolgt ein Mediumwechsel, um die Toxizitätsrate, die von der Transfektionslösung ausgeht, zu erniedrigen. Insgesamt nach 48 h Inkubation werden die transfizierten Zellen zur Auswertung hinzugezogen.

3.11. RNA *interference* (RNAi)

RNA *interference*, RNAi, dient dem *knockdown* von Genen auf RNA-Ebene. Hierbei handelt es sich um ein posttranskriptionelles *Silencing*-Mechanismus. Der Abbau der mRNA eines Zielproteins und die damit verbundene Reduktion der Proteinmenge wird durch *small interfering* RNAs (siRNAs) mit einer Länge von 4-21 nt vermittelt.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete siRNA wird von unseren Kooperationspartner W.Peitsch zur Verfügung gestellt und mit Hilfe des *Nukleofectors* in HUVEC transient transfiziert (1-2 mg).

Name	Sequenz
siRNA	5'-CCAGAAGGUGAUGUACGGCdTdT-3'
siRNA	5'-AAGAGUCGCAUCGGCCUCUdTdT-3'

Tabelle 9: Targetsequenz der eingesetzten RNAi. Eingesetzt wird diese siRNA bei Drebrin *knockdown*-Experimenten.

3.12. Matrixverdau

Nach FITC-Markierung der ECM ist es möglich aufgrund von der Degradation dieser, die Fähigkeit von Zellen zu überprüfen, ob und in welchem Ausmaß sie zum Matrixabbau fähig sind. Die Markierung vom Fibronectin erfolgte nach dem Herstellerprotokol.

Anschließend werden die *coverslips* mit Fibronectin FITC-Alexa 488 *gecoated*. Auf die dementsprechend behandelten Glasgefäße werden 100 000 HUVEC ausgesät, bis zum nächsten Tag bei 37°C inkubiert und nach Färbung gegen ein zellinternes Protein mikroskopisch ausgewertet.

3.13. Wund-Assay

Zunächst wird ein ruhiger *Monolayer* gezüchtet. Hierzu werden 40.000 Zellen ausgesät und verbleiben dann über 6-7 d im gleichen Kulturmedium bis eine gleichmäßige Konfluenz vorliegt. Anschließend wird das Kulturmedium und die Zellen für weiter 2-3 d inkubiert, was bedingt, daß die Zellen ruhig gehalten werden, was bedeutet, daß sie weder motil sind noch neue Zell-Zell-Kontakte ausbilden. Erst jetzt können Verwundungen des *Layers* vorgenommen und dessen Auswirkungen beobachtet werden. Man benutzt eine sterile Spitze (gelb), die am *coverslip* entlanggezogen wird und so einen Wundkanal erzeugt. Zur deutlicheren Auswertung ist die Erzeugung sowohl eines horizontalen als auch vertikalen Wundkanals von Nöten.

3.14. Modulierende und inhibierende Substanzen

Nach dem Aussäen der HUVEC-Zellen mit der erforderlichen Dichte (zw. 20.000 und 60.000 Zellen/*coverslip*) werden diesen am nächsten Tag Substanzen, in der Konzentration wie sie in der unten aufgeführten Tabelle angegeben sind, zugesetzt. Nach Beendigung der Versuche werden die Zellen angefärbt und mikroskopisch, wie auch statistisch, die Auswirkungen dieser Substanzen auf die Zellen ausgewertet.

Art der Modulation	Substanz	Beschreibung	Endkonzentraion	Inkubation
Stimulation	LPS	Bakterielles Lipopolysaccharid	100µl/ml	1-3 h
	GST-C3-Transferase	bakterielles Toxin, inaktiviert die Rho-GTPase	150ng/µl	0-3h
	CNF-1	Aktivator der RhoGTPassen : RhoA, Rac1, Cdc42	5 µg/ml	1,5-3 h
Inhibition der Tyrosinkinasen	PP-2	reversibler Inhibitor	20 µM	1 h
Inhibitoren der PI3-Kinase	Wortmannin	irreversibler Inhibitor	100 nM	1-2 h
	LY294002	reversibler Inhibitor	20 µM	1-2 h
Wachstumsfaktoren	VEGF	Wachstumsfaktor	20 bzw. 50 ng/µl	0-48 h
	TNFα	Wachstumsfaktor	10 bzw. 20 ng/µl	0-48 h
Zellmaterial	Monozyten	Bestandteil des Immunsystems, Vorläufer u. a. der Makrophagen und dendritischen Zellen	3x10 ³ bzw. 3x10 ³	0-48 h
	Blutplättchen	mit 13 anderen Blutgerinnungsfaktoren für Wundverschluß	1x10 ⁴	0-48 h

Tabelle 10: Übersicht der in den Experimenten eingesetzten Substanzen. Angegeben sind hier die allgemeinen Funktionen und die jeweils gewählte Vorgehensweise.

3.15. Immunfluoreszenz

Um die Erkennung der HUVEC-spezifischen Proteine in behandelten oder unbehandelten Zellen zu ermöglichen, werden diese fixiert, permeabilisiert und angefärbt. Die auf *coverslips* ausgesäten Zellen werden in 3,7 % Formaldehyd-PBS-Lsg für 10 min bei RT fixiert. Um sie zu permeabilisieren werden die *coverslips* in eiskaltem Aceton bei -20°C für 5 min inkubiert. Da diverse Antikörper unterschiedlich auf die verschiedenen vorhandenen Fixierungs- und Permeabilisierungssubstanzen reagieren, werden auch andere Protokolle angewendet. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgt in einer feuchten Kammer. Hierzu wird eine große Petrischale gewählt, auf deren untere Schale ein feuchtes Tuch platziert wird und auf dieses Parafilm. Auf diesem Parafilm können die Farbe-Lsg (jeweils 30 µl) pipettiert werden. Anschließend werden *coverslips* mit der Zellbehafteten Seite nach unten, d.h. auf die vorpipettierte Farbe-Lsg gelegt.

In der Färbung selbst lassen sich drei durch Waschschriffe (2 ml PBS-BSA 1%, 3 x 5 min) getrennte Prozesse unterscheiden. Zunächst werden unspezifische Bindungen mittels PBS+BSA (1%), 5% NGS und 5% HGS abgesättigt (15 min). Nach einem Waschschriffe werden die Zellen für 45 min bei RT mit dem ersten Antikörper inkubiert. Anschließend erfolgt wieder ein Waschschriffe, um die nicht gebundenen primären Antikörpermoleküle zu entfernen. Danach folgt die Färbung mit den sekundären Antikörpern und Aktin (1:200) für 30 min und erneut ein Waschschriffe. Hierauf werden die *coverslips* im auf 37°C erwärmten Mowiol auf einen Objektträger überführt, eingebettet und mit Nagellack versiegelt.

3.16. Live cell imaging

In vivo-Aufnahmen werden mit Hilfe des UltraView Confocal LCI der Fa. Perkin Elmer, angeschlossen an das Umkehrmikroskop Eclipse TE 300 Invers der Fa. Nikon, durchgeführt. Die zu untersuchenden Zellen werden in einer Dichte von 1 x 10³ pro Schälchen (*glass bottom dishes*: Fa. MatTek, USA) ausgesät und nach entsprechender Behandlung (Wund-*Assay* oder Transfektion) in die Brutkammer platziert. Die *in vivo*-Aufnahmen werden den jeweiligen Versuchsbedingungen angepaßt und erfolgen in einem Zeitrahmen von 5 bis 100 min.

3.17. Fluoreszenzmikroskopie

Die Analyse Fluoreszenzmarkierter Präparate erfolgt am Fluoreszenzmikroskop, welches mit einer digitalen *Spot*-Kamera verbunden ist, bzw. mit einem konfokalem laser scanning Mikroskop. Die anschließende Bildverarbeitung kann mit den Programmen *Imaging* (Microsoft), *Photoshop* (Adobe), *Corel Draw* (Corel) und *ImageJ* angefertigt werden.

3.18. Herstellung von Zell-Lysaten

Zur Herstellung von Lysaten aus HUVEC-Zellen wird zuerst das Kulturmedium abgenommen, die Zellen mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend werden 100-300 μ l des entsprechenden Lysispuffer hinzugegeben, 5 min auf Eis inkubiert, und mit einem Plastikschaber vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, zu je 1 ml/Eppi transferiert und sonifiziert (65 W 6 x 10 sec). Es folgt eine Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und -4°C . Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für weitere Experimente verwendet bzw. im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.19. Arbeiten mit Proteinen

3.19.1. Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen mittels Affinitätschromatographie

3.19.1.1. Expression von MBP-Fusionsproteinen

Die Proteinexpression erfolgt im 1000 ml-Maßstab. Antibiotikumhaltiges Medium mit Glucosezusatz (cGluc = 10 mM im Ansatz) wird mit einer Übernachtskultur auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD_{600} von 0,4-0,6 wird die Proteinexpression durch Zugabe von 0,5 M IPTG-Lösung (Isopropyl- β -D-thiogalactosidase – Substrat des Enzyms β -Galactosidase) bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M induziert. Nach 2,5 h wird die Expression beendet und die Zellen bei 6000 rpm und 4°C für 5 min abgeerntet und mittels Sonifikation (65 W 6 x 10 sec) aufgeschlossen. Die Zellreste werden in der ZU für 10 min bei 50000 rpm abzentrifugiert.

Gleichzeitig werden 2 ml *resin* in Säulenpuffer für 1h bei 4°C äquilibriert, danach bei 1000 rpm, 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird nach der ZU verworfen, der Überstand zum äquilibrierten *resin* gegeben und für 1 h bei 4°C inkubiert. Nicht gebundenes Protein wird durch 6 x Waschen mit Säulenpuffer entfernt und das MBP-Protein 5 x mit 1 ml Maltoselsg (3,6 g/ml in Säulenpuffer) eluiert. Das Eluat wird ON bei 4°C gegen Dialysepuffer dialysiert, aufkonzentriert und erneut ON dialysiert, nun jedoch gegen Mikroinjektionspuffer.

3.19.1.2. Expression des GST-Fusionspreoteins

Zur Expression von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteins werden in 100 ml LB-Medium mit selektiven Antibiotikum, Bakterien, die das zu exprimierende Plasmid enthalten angeimpft und ON bei 37°C geschüttelt. Nun werden 1000 ml LB/Amp oder Kan-Medium mit Glucosezusatz in einer Endkonzentration von 10 mM mit dieser Übernachtskultur auf eine OD_{600} von ca. 0,1 angeimpft. Das Wachstum erfolgt bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD_{600} von 0,7. Durch Zugabe von 1 M IPTG-Lösung in einer Endkonzentration von 1 mM wird die Proteinexpression induziert. Nach einer Expressionsdauer von 2,5 h werden die Zellen bei 5000 rpm für 20 min abgeerntet, das Zellsediment in vorgekühltem PBS aufgenommen und gepoolt. Die Suspension wird mit kaltem PBS auf 50 ml aufgefüllt und erneut für 20 min bei 5000 rpm, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und das Pellet in 20 ml Lysepuffer

resuspendiert. Die Bakteriensuspension wird mit 65 W 6 x 10 sec mit Ultraschall aufgeschlossen, die Zellreste bei 35000 rpm, 4°C für 30 min abzentrifugiert. Gleichzeitig werden 1-2 ml GST-sepharose-beads 3 min bei 4°C in Lysepuffer äquilibriert und bei 1000 rpm für 2 min zentrifugiert. Nach der Ultrazentrifugation wird der Proteinüberstand auf die *beads* gegeben und 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die *beads* 5 x mit Lysepuffer ohne DTT und 1 x mit Resuspensionspuffer gewaschen. Der Überstand wird dekantiert und das Protein von den *beads* eluiert.

Elution mit Glutathion: Zur Elution werden die *beads* 8 x mit je 2 ml Resuspensionspuffer mit 10 mM Glutathion behandelt und während jeder Behandlung gevortext und 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Nach Ablauf dieser Prozedur werden die Überstände gepoolt und gegen Mikroinjektionspuffer dialysiert.

Thrombinspaltung: Um den GST-Anteil des Fusionsproteins abzuspalten, werden pro ml *beads* 2 U Thrombin gegeben und so ON oder für 2 h bei RT inkubiert. Hiernach werden die *beads* bei 5000 rpm für 5 min abzentrifugiert, der Überstand 3 x mit 2 ml Resuspensionspuffer gewaschen. Um Thrombin zu entfernen, werden zum gewaschenen Überstand 100 µl p-Aminobenzamidin-*beads* pipettiert, für 1 h bei 4°C unter Schütteln inkubiert, wiederum abzentrifugiert und der Überstand gegen Mikroinjektionspuffer dialysiert.

3.19.2. Pull-down

Pro Ansatz werden 200 µl Glutathion Sepharose *beads* (Amersham) bzw. Amylase-Lösung (Amersham Biosences) bei 2000 rpm, 4°C für 30 sec abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, das *pellet* zweimal mit PBS, jeweils 1 ml, gewaschen und anschließend mit 1 ml RIPA-Puffer äquilibriert, mit 1 ml PBS und dem jeweiligen GST-Fusionsprotein (50 µg) bzw. beim Kontrollansatz nur mit GST (50 µg) 1h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Nach zweimaligen Waschen in PBS und später in Lysispuffer werden die *beads* mit Zellysat für eine weitere Stunde inkubiert. Nun werden die Ansätze 2 x in Waschpuffer gewaschen, für 15 min mit 1 ml Waschpuffer im Überkopfschüttler bei 4°C platziert und erneut bei 2000 rpm für 30 sec abzentrifugiert, Der Überstand wird verworfen, ein weitere Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm für 1 min bei 4°C durchgeführt und in je 100 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proben werden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in *western blots* mit entsprechenden Antikörpern analysiert.

3.19.3. Immunopräzipitation

Ziel dieses Verfahrens ist es, eine physikalisch Interaktion zwischen ausgewählten Proteinen nachzuweisen. In vorliegender Arbeit wurde mit dem Immunoprecipitation Kit (MACS, Protein A und G, Fa. Milteny Biotec) und nach Herstellerprotokol gearbeitet. Im Unterschied hierzu werden lediglich Lysis- und Waschpuffer (siehe Material) variierend hergestellt, um bessere Resultate herzustellen. Die Proteine werden im auf 95°C erwärmten SDS-Probenpuffer eluiert, in SDS-Gelen aufgetrennt und im *western-blot*-Verfahren oder durch Silberfärbung nachgewiesen.

3.19.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die Proteine in Gegenwart eines Überschusses von Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgetrennt. SDS ist ein anionisches Detergenz, dessen Natriumsalz zur Solubilisierung von Proteinen und Protein-Komplexen und bei der Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen verwendet wird. Polypeptide binden SDS im konstanten Gewichtsverhältnis, erfahren einen Ausgleich von Ladungsdifferenzen (pro gebundenes SDS-Molekül werden zwei negativ Ladungen zur Gesamtladung beigetragen) und wandern dadurch bei Elektrophoresen entsprechend ihres Molekulargewichts.

Das negativ geladene, stark denaturierende SDS lagert sich in konstantem Gewichtsverhältnis an die Proteine an und komplexiert damit die positive Ladung der Proteine. Die negativ geladenen, komplexierten Proteine weisen ein einheitliches Ladung/Masse-Verhältnis da sie gleichzeitig durch Denaturierungsreagenzien (z.B.: Harnstoff) vollständig denaturiert werden und somit bei der Gelelektrophorese entsprechend ihrer Molmassen zur Anode wandern.

In dieser Arbeit wird das Laemmli-Gelsystem [Laemmli, 1970] verwendet, bei dem die Proteinprobe zuerst in einem Sammelgel konzentriert und dann im Trenngel aufgetrennt wird.

	Substanzen	Trenngel	
		10 %iges	12,5 %iges
	Großes Gel [Minigel]	Trenngelpuffer	12,5 ml [1,25 ml]
Aqua dest.		20,25 ml [2,09 ml]	13,45 ml [1,6 ml]
Acrylamid		16,5 ml [1,67 ml]	16 ml [2,08 ml]
100ng/ml APS		250 µl [25 µl]	200 µl [25 µl]
TEMED		25 µl [2,5 µl]	20 µl [2,5 µl]
		Sammelgel	
Aqua dest.		9,40 ml [1,55 ml]	
Sammelgelpuffer		3,75 ml [625 µl]	
Acrylamid		1,95 ml [325 µl]	
100ng/ml APS		75 µl [75 µl]	
TEMED	15 µl [15 µl]		

Tabelle 11: Herstellung von Sammel- und Trenngelen. Angegeben sind die jeweiligen Stoffe und deren Konzentrationen zur Herstellung von diversen Sammel- und Trenngelen.

Die Gelplatten werden vor dem Zusammenbau mit Ethanol gründlich gereinigt. Das 10 bzw. 12,5 %ige Trenngel wird bis ca. 1 cm unter den oberen Rand in die Gelkammer gegossen und nach Polymerisation, die Oberfläche des Trenngels mit dem 3 %igen Sammelgel überschichtet und der Probenkamm eingesetzt. Die Proteinproben werden mit dem gleichen Volumen Probenpuffer für SDS-PAGE versetzt für 5 min bei 95°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen (30-60 µl). Als Molekulargewichtsmarker wird entweder 5 µl SDS-PAGE *Molecular Weight Standard, Low Range* aufgetragen oder 10 µl *Prestained SDS Molecular Weight Marker*. Die Elektrophorese erfolgt bei konstant 100 V, bis die Bromphenollaufbande das Trenngel erreicht hat und anschließend bei 150 V bis zum Auslaufen der Lauffront in den Elektrophorese-Puffer. Das Sammelgel wird entfernt und das Trenngel entweder mit Silberlösung gefärbt oder geblottet.

3.19.5. Silberfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen [Blum et al., 1987]

Die Silberfärbung beruht auf der Komplexbildung von Silberionen mit dem Aminosäureseitenketten der in der Gelmatrix fixierten Proteine. Nach Zusatz der Entwicklerlösung werden die komplexierten Silberionen reduziert und so in Form von elementarem Silber auf dem Gel sichtbar gemacht.

Die Proteine werden zunächst in der Gelmatrix durch eine Fixierlsg denaturiert und immobilisiert. Beim sogenannten Sensibilisieren werden Silberionen aus der zugesetzten Silbernitratlsg von den präzipitierten Proteinen gebunden und durch Reduktion in Silberkeime umgewandelt, während nicht komplexierte Silberionen durch Waschen entfernt werden. Die Reduktion wird von den funktionellen Gruppen der Aminosäurereste und den Peptidbindungen verursacht. Im vorerst niedrigen pH-Melliue findet keine Reaktion zwischen den Silberionen und dem bereits in der Lsg vorhanden starken Reduktionsmittel Formaldehyd statt. Diese wird erst durch die Zugabe des Entwicklers möglich, der den pH-Wert in den basischen Bereich verschiebt. Nun werden alle Silberionen im Gel mit Hilfe der Silberkeime als Katalysator vom Formaldehyd zu matalischen Silber reduziert. Diese Reduktion verläuft in unmittelbarer Nähe der Silberkeime, d.h. dort wo sich die Proteinbanden befinden wesentlich schneller als im übrigen Gel und führt zur Umwandlung der Banden in braune-schwarze Färbungen. Durch Zugabe der Stopplsg wird eine Verschiebung des pH-Wertes die Redoxreaktion beendet bevor auch der Hintergrund angefärbt wird.

Die Silberfärbung ist etwa 10-50 mal sensitiver als die Proteinfärbung mit Coomassie Blau. Schon 10-100 ng Protein lassen sich deutlich auf dem Gel detektieren.

Name	Zusammensetzung
Stopplösung	50 % Methanol + 12 % Eisessig
Fixierlösung	0,02 % Formalin in Stopplösung
Na-Thiosulfatlösung	20 mg Na-Thiosulfat in 100 ml Aqua dest.
Silbernitratlösung	0,2 % AgNO ₃ -Lsg + 0,03 % Formalin
Entwicklerlösung	0,56 M Na ₂ CO ₃ + 2 ml Na-Thiosulfatlösung + 0,02 % Formalin

Tabelle 12: Silberfärbung. Die zur Silberfärbung verwendeten Lösungen und deren Zusammensetzung.

Alle Lösungen außer der Stopplösung werden frisch angesetzt. Pro Gel werden ca. 25 ml von den angegebenen Lösungen verwendet. Die Inkubation erfolgt auf dem Wipptisch.

Das Trenngel wird mindestens 45 min bei RT fixiert oder über Nacht bei 4°C. Anschließend wird es zur Entfernung der Säure dreimal 10-15 min mit 50 % Ethanol gewaschen. Um die Sensitivität der Silberfärbung zu erhöhen, wird das Gel exakt 1 min mit der Na-Thiosulfatlösung behandelt und nach dreimaligem Waschen mit Aqua dest. 20 min in der Silbernitratlösung gefärbt. Um die überschüssigen Silberionen zu entfernen, wird zweimal mit Aqua dest. gewaschen. Die Entwicklung in der reduzierenden Entwicklerlösung erfolgt so lange, bis die Banden sichtbar sind. Dann wird die Entwicklerlösung sofort mit Aqua dest. abgespült und das Gel zum Beenden der Reduktion 10 min mit Stopplösung versetzt. Die Konservierung des Gels erfolgt durch zwanzigminütige Inkubation in 50 % Methanol, dreißigminütige Inkubation in 30 % Methanol und abschließend durch dreißigminütige Inkubation in 3 % Glycerin. Die Konservierungsreaktionen können auch bei 4°C über Nacht durchgeführt werden. Anschließend wird das Gel eingeschweißt und zur MALDI-Analyse eingereicht.

3.19.6. Westernblot

[Towbin et al., 1979]

Beim Westernblot werden Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran übertragen, auf die sie mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert werden können.

Der Transfer der Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran erfolgt in einer Mini-Protean Kammer nach dem Tankblot-Verfahren. Hierbei werden die Membran, das Gel und das Filterpapier in *blotting*-Puffer inkubiert. Der Transfer erfolgt für 1 h bei 80 V. Im Anschluß daran

wird die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h in TBST-Puffer mit 2,5% BSA inkubiert. Nach drei Waschschrinen in TBST wird die Membran für 1 h in TBST geschwenkt, dem der primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 zugesetzt wird und die unspezifisch gebundenen Antikörper durch anschließende Waschschrine (x 3 a 10 min) in TBST entfernt. Hiernach wird die Membran für 1h mit HRP-gekoppelten Antikörpern in TBST inkubiert und wiederum 3 x für je 10 min in *Super Signal® Waet Pico Luminol Enhancer* und *Super Signal® Stable Peroxidase Solution* Detektionslösung inkubiert. Die Lichtemission bei der Umsetzung der Detektionslsg durch die Meeretichperoxidase wird durch Auflegen eines Röntgenfilmes visualisiert.

3.19.7. Immunofärbung von PVDF-Membran

Mit Hilfe eines Antikörpersystems sollen spezifisch Proteine auf der PVDF-Membran detektiert werden. Das Prinzip der Immunofärbung beruht darauf, daß ein zweiter, enzymgekoppelter Antikörper den ersten Antikörper erkennt, der an ein antigenes Epitop auf der Membran gebunden hat. Durch Zugabe einer Substratlösung, die das antikörpergebundene Enzym zu einem unlöslichen Farbstoff umsetzt, können die Proteinbanden sichtbar gemacht werden.

Zuerst werden freie Bindungsstellen der PVDF-Membran in 5 % Magermilch-TBST-Puffer für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C abgesättigt, um den Hintergrund zu reduzieren. Alle folgenden Schritte werden bei RT auf dem Wipptisch durchgeführt. Nach dreimaligen Waschen (5 min) mit TBST wird die Membran in dem mit 2 % Magermilch-TBST-Puffer verdünnten Primäantikörper für 1 h inkubiert. Anschließend wird erneut dreimal gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die Inkubation mit dem in 1 % Magermilch-TBST-Puffer verdünnten Sekundäantikörper (*Anti-Mouse IgG Peroxidase Conjugate*, 1:2000 bzw. *Anti-Rabbit IgG Peroxidase*, 1:1000 oder *Anti-guinea pig IgG Peroxidase Conjugate*, 1:1000 von der Fa. Amersham) erfolgt für 45 min. Die Membran wird dreimal mit TBS gewaschen und dann durch Zugabe der *Super Signal West Pico Luminol Enhancer* und *Super Signal Stable Peroxidase Solution* (Chemolumineszenz) – gemischt im Verhältnis 1:1 für 15 min bei RT behandelt, in Folie eingelegt, zur Markierung mit Streifen von *GLOCOSII Autorad Markers* versehen, mit einem Kodakfilm für unterschiedliche Zeiten in die Kammer gelegt und danach entwickelt.

3.19.8. Dialyse

[McPhie, 1971]

Die Dialyse ist ein auf Diffusionsvorgängen beruhendes Verfahren zum Abtrennen von niedermolekularen Molekülen, wie Salzen und kleineren Molekülen, aus wäßrigen Lösungen hochmolekularer Substanzen mit Hilfe einer semipermeablen Membran.

In dieser Arbeit wird sie dazu eingesetzt, um die exprimierten und aufgereinigten Proteine, in einem für die Mikroinjektion nötigen Puffer aufnehmen zu können.

Nach dreimaligem Aufkochen des Dialyseschlauchs in 500 ml Aqua dest. (das erste Mal unter Zusatz von einer Spatelspitze NaHCO₃ und 500 µl 0,5 M EDTA) wird über Nacht bei 4°C gegen den Mikroinjektionspuffer unter Rühren dialysiert. Nach der Dialyse erfolgt die Messung der gewonnen Proteinmenge.

3.19.9. Proteinbestimmung

[Bradford, 1976]

Für die Quantifizierung von Proteinen wird die Bradford-Methode benutzt, bei der Coomassie Brilliantblau mit Proteinen unter Bildung blauer Farbstoffkomplexe reagiert. Diese Komplexe haben im Gegensatz zu ungebundenen Farbstoffmolekülen (465 nm) ihr Absorptionsmaximum im längerwelligen Bereich um 595 nm. Detergenzien nehmen einen hemmenden Einfluß auf den

Verlauf dieser Reaktion. Das Verfahren ermöglicht Proteinmengen im Bereich von 1-10 μg zu bestimmen.

Bradford-Reagenz: 100 mg Coomassie Brilliantblau G250
100 ml 85 % Phosphorsäure
50 ml 96 % Ethanol

Die Proteinbestimmung erfolgt mit dem BIO-RAD Protein-Assay-Protokoll, welches in Anlehnung an die Bradford-Methode entwickelt wurde.

3.20. Mikroinjektion

Eine Injektionsanlage verfügt über ein Mikroskop mit einem Mikroinjektionsarm und einem Transjektor zur Druckerzeugung, die alle mit einem Computer verbunden sind. Somit kann das Mikroinjektionsgeschehen am Bildschirm verfolgt und gesteuert werden. Die Injektion selbst erfolgt durch einen Druckpuls, der vom Transjektor über einen Schlauch an die Kanüle weitergegeben wird. Benötigt wird ein Kompositionsdruck, der verhindert, daß durch die Kapillarkräfte ein Einstrom der Flüssigkeit aus dem Medium in die Kanüle erfolgt. Dieser wird so gewählt, daß aus der Kapillare ein permanenter Ausfluß gewährleistet wird. Der eigentliche Injektionsdruck ist nicht nur höher als der Haltedruck, sondern auch als der Innendruck der zu injizierenden Zelle. Das so eingeschleuste Protein gelangt schnell in die Zelle und kann sofort seine Wirkung entfalten.

Die Injektion erfolgt mit Proteinlösungen, die mit dem Mikroinjektionspuffer verdünnt [max. Konz. bei ca. $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$; sonst zu viskös] und denen eine Markersubstanz zugesetzt ist (Koinjektion mit Ratten-IgG), um das Auffinden injizierter Zellen zu ermöglichen. Anschließend erfolgt noch ein Zentrifugationsschritt bei 4°C , 13000 rpm für 30 min, wodurch Aggregate entfernt werden, die sonst die Mikroinjektionskanüle verstopfen würden. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, auf Eis gelagert. Für die Injektion werden 3 μl der Injektions-Lsg verwendet, in eine Injektionskanüle die (Femtotip: Eppendorf, Deutschland) hineinpipettiert werden. Dieses Femtotip samt Lsg wird in den Arm der Mikroinjektionsanlage montiert. Sofort wird auch in eine Kulturschale (mit 2 ml Kulturmedium), die im Heizring der *Stage* des Mikroskops platziert wurde, das Zellen beherbergende *coverslip* hineingelegt und durch leichten Druck mit der Pinzette fixiert. Zum Injizieren wird die Spitze der Injektionskanüle am Bildschirm auf die Zellebene eingestellt, die Zellen mit der Maus angesteuert und mit einem recht-Klick der Injektionsprozeß (mind. 2x150 Zellen/Experiment) ausgelöst. Nachdem genügend Zellen injiziert werden, sollte das Medium gewechselt werden. nach einer 45 min Inkubationszeit sind die Zellen zu fixieren.

Nach der Injektion können die auf den *coverslips* befindlichen Zellen angefärbt werden, wobei die injizierten Zellen durch Behandlung mit fluoreszierenden Antikörper gegen das koinjizierte Ratten-IgG detektiert werden können.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung einer Podosomen-ähnlichen Aktin-Struktur in HUVEC

Podosomen werden in einer Vielzahl von Zelltypen gefunden, wie in primären humanen Makrophagen (Linder *et al.*, 1999) und Osteoklasten (Marchisio *et al.*, 1984). Sie treten aber auch in Src-transformierten Fibroblasten (Tarone *et al.*, 1985). In all diesen Zelltypen ermöglichen Podosomen tatsächlich die Anheftung der Zellen an das Substrat und üben aufgrund ihrer Komponenten höchstwahrscheinlich einen Einfluß auf Prozesse wie Migration und Adhäsion aus (Linder und Aepfelbacher, 2003).

In dieser Studie sollte deswegen untersucht werden, ob auch Endothelzellen podosomale Adhäsionsstrukturen (konstitutiv) generieren können. Hierzu wählten wir primäre humane Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) als Modellsystem aus. Aufgrund der Tatsache, daß Podosomen aus einem F-Aktinbündel-haltigen Kern bestehen, in dem Aktinregulatoren wie N-WASP (Destaing *et al.*, 2003) und Arp2/3-Komplex gefunden werden (Linder *et al.*, 1999), wurden HUVEC gegen diese und weitere Proteine wie Talin und Vinkulin, die in der Ringstruktur dieser Adhäsionsstruktur vorhanden sind, die den Kern umgibt, in Immunofluoreszenzversuchen angefärbt.

Protein	Funktion	Komponenten der Struktur
Abp1	F-Aktin bindendes Protein, Aktivator des Arp2/3 Komplex	-
CAP-1	G-Aktin bindendes Protein, fördert F-Aktindepolymerisation	-
Caveolin	Strukturprotein von Caveolae	-
Cofilin	Aktin-Depolymerisierung	+
Cortactin	Aktivator des Arp2/3-Komplex, F-Aktin bindendes Protein	-
cSrc	Tyrosinkinase	+
Drebrin	F-Aktin bindendes Protein	+
Dynamin	G-Protein, Clathrin-vermittelte Endozytose, Motorprotein	-
Ezrin	Verbindungsprotein zwischen Plasmamembran und Aktinzytoskelett	-
Fak	Kinase, Adhäsionsregulator	+
F-Aktin	Strukturelement	
GK1 (swap70)	Phosphatidylinositol-3-kinase-abhängiges Protein, interagiert mit der RhoGTPase Rac	-
Integrin β 1	Zell-Matrix-Kontakt	+/-
Integrin α 5 β 3	Zell-Matrix-Kontakt	+
Integrin β 2	Zell-Matrix-Kontakt	+/-
Lamin	Typ-V-Intermediärfilamente, im Zellkern eukaryotischer Zellen	-
Moesin	Verbindungsprotein zwischen Plasmamembran und Aktinzytoskelett, involviert in Zelladhäsion	-
MMP-1	Matrixabbau	+/-
MMP-2	Matrixabbau	+/-
MMP-9	Matrixabbau	+/-
MT1-MMP	Matrixabbau	+
NCK	Adaptorprotein	-
N-WASP	aktiviert Arp2/3-Komplex	+
p41	Komponente des Arp2/3-Komplex, Aktinnukleation	+
Palladin282	Prolin-reiches Protein, Bindungspartner von Profilin	-
Paxillin	Verbindung zwischen Integrinen und Aktin-assoziierten Proteinen	+
Phosphotyrosin	regulatorisches Signal	+
PHOX	NADPH oxidase	-

Profilin	G-Aktin bindendes Protein	-
Pyk2	Tyrosinkinase, Mitglied der FAK-Familie, aktiviert c-Src	-
Talin	Verbindung zwischen Integrinen und Aktin-assoziierten Proteinen	+
VASP	erhöht die Aktivität von N-WASP	+
Vav	GEF (katalysiert Aktivierung von Rac, Rho)	-
VE-Cadherin	Zell-Zell-Adhäsionsregulator	-
Vinkulin	Verbindung zwischen Integrinen und Aktin-assoziierten Proteinen	+
WAVE-1	Rekrutierung und Aktivierung des Arp2/3-Komplexes	-
WAVE-2	Rekrutierung und Aktivierung des Arp2/3-Komplexes	-
WAVEscar	Rekrutierung und Aktivierung des Arp2/3-Komplexes	-

Tabelle 13: Charakterisierung von HUVEC-Podosomen. Dargestellt sind die mit Hilfe der Immunfluoreszenz getesteten Proteine, wobei „+“ eine eindeutige Präsenz desselben in der Struktur wiedergibt, „+/-“, auf ein schwaches Signal des Komponenten hinweist und ein „-“, schließlich das besagte Protein als Komponente ausschließt.

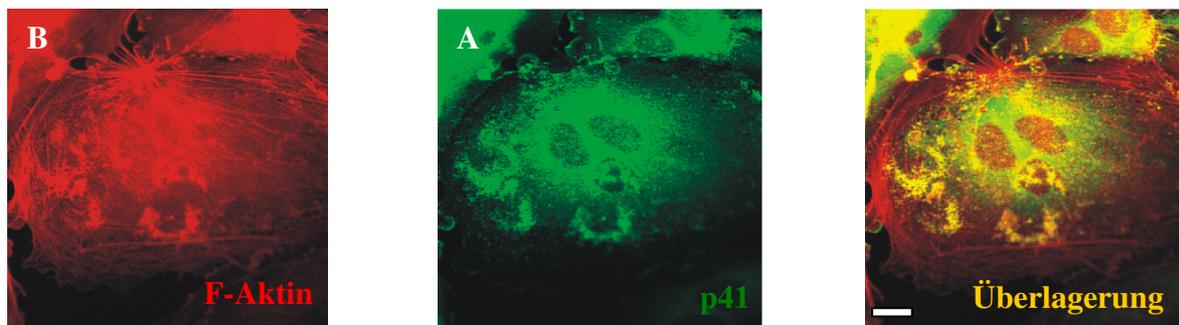


Abbildung 13: Die Ausbildung von HUVEC-Rosetten. Konfokalmikroskopische Aufnahme von HUVEC, die mit einem Antikörper gegen p41 (A), einer Untereinheit des Arp2/3-Komplexes, und mit Alexa-568-Phalloidin gegen F-Aktin (B) angefärbt wurden. C zeigt die Überlagerung von A und B. Weißer Balken: 10 µm

Um diese Strukturen im Verlauf der vorliegenden Doktorarbeit zu charakterisieren, wurden unter Verwendung von indirekter Immunfluoreszenzfärbung zahlreiche Komponenten identifiziert. Die primären humanen Nabelschnurendothelzellen wurden hierbei mit Antikörpern gegen diverse zelluläre Proteine angefärbt, die dann mikroskopisch entweder als Komponenten der HUVEC-Podosomen verifiziert oder ausgeschlossen werden konnten. Da zahlreiche der Komponenten auch in den podosomalen Strukturen der Monozyten vorgefunden werden, wurden diese punktförmigen Formationen als HUVEC-Podosomen genannt. Die durch Fusion zahlreicher Podosomen gebildeten ringförmigen Strukturen wurden in Analogie zu den Rosetten in Src-transformierten Fibroblasten (Tarone *et al.*, 1985) HUVEC-Rosetten oder Superstrukturen genannt (Siehe Abb.12 und 13c).

4.2. HUVEC-Podosomen werden in migratorischen Nabelschnurendothelzellen konstitutiv generiert

Migration und Invasion von Endothelzellen sind sowohl für die Bildung von Gefäßen als auch für die Erhaltung derer Integrität von größter Bedeutung. Bei diesen Prozessen sind die Zellen

auf strikt kontrollierte Remodelierung des Zytoskletts und der Adhäsionsstrukturen angewiesen (Bailly *et al.*, 2003).

Aufgrund solcher Befunde wollten wir die HUVEC-Podosomen und deren Involvierung und/oder Modifikation bei der Motilität überprüfen. Hierbei verwendeten wir anfänglich zur Analyse der Bildung von HUVEC-Podosomen fixierte Präparate, bei denen spezifische Antikörper zur Anfärbung von deren Komponenten eingesetzt wurden.

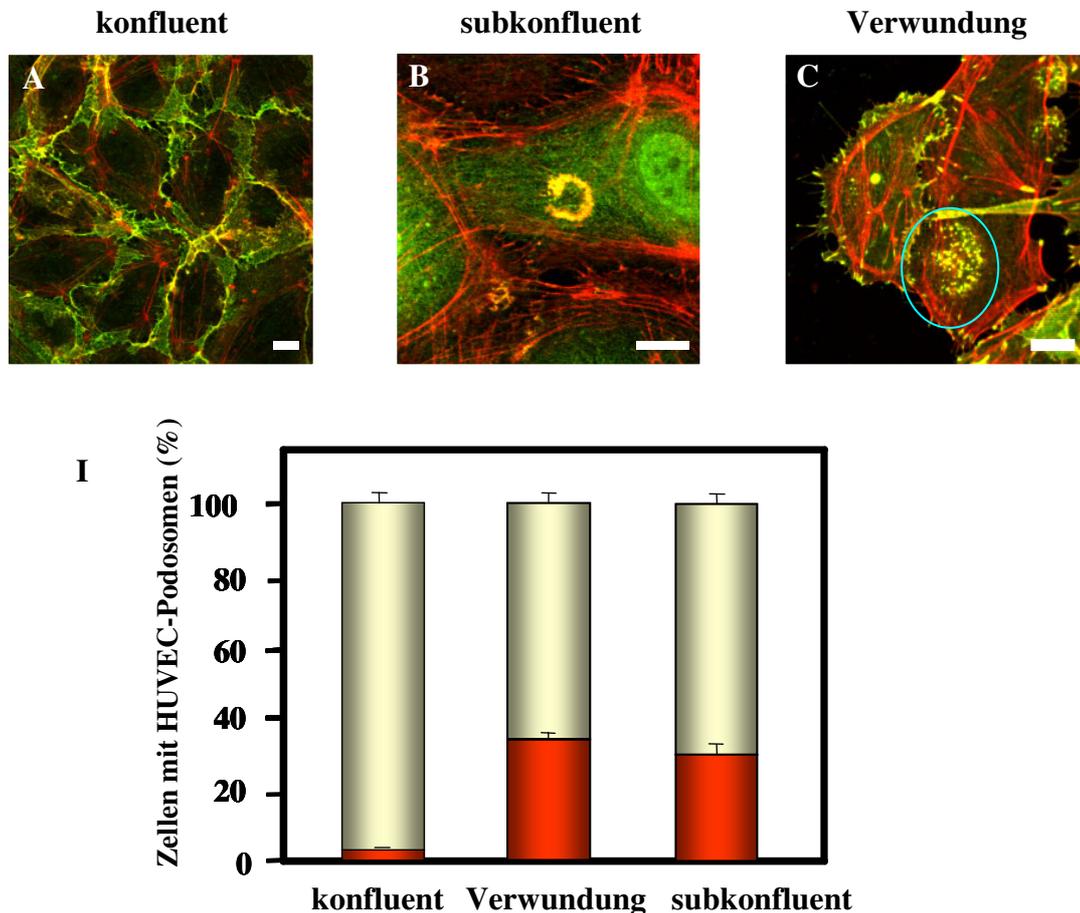


Abbildung 14: HUVEC-Podosomen werden in subkonfluenten HUVEC konstitutiv gebildet. Konfokalmikroskopische Aufnahmen von HUVEC mit ruhigen, konfluenten Monolayer (A), im subkonfluenten Kulturen (B) und nach der Verletzung eines konfluenten Monolayers (C). Aufnahme C zeigt die aus Podosomen bestehende Superstruktur (blauer Kreis). F-Aktin wurde mit Alexa 568-Phalloidin (rot), Phosphotyrosin mit einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper (grün) und die Kolokalisation in gelb dargestellt. Der weiße Balken zeigt 10 µm an. (I) Die Graphik zeigt die Häufigkeitsverteilung von Zellen mit HUVEC-Podosomen (rot) in Prozent aufgetragen gegen Zellen, die diese nicht beinhalten (beige) in Abhängigkeit vom jeweiligen Phänotyp. Die Procentsätze für einzelne Experimente sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt: 2,3%±0,5% bei konfluenten, 35,7%±1,2% bei subkonfluenten, 31,0%±1,4% bei konfluenten Layer nach Verwundung. Für die statistische Auswertung wurden jeweils 6 mal 30 Zellen aus fünf unabhängigen Experimenten einbezogen.

HUVEC wurden im konfluenten und subkonfluenten *layer*-Stadium, aber auch nach Verwundung des Zellrasens analysiert. Bei *wund-assay* Experimenten wurden die HUVEC solange kultiviert bis sie einen ruhigen, konfluenten *layer* bildeten. Anschließend wurden die Zellkulturen sofort bzw. nach der Erzeugung eines Wundkanals fixiert. Bei *wund-assay* Versuchen erfolgte die Fixierung bei einer Nachinkubation zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0-6h).

Während wir in konfluenten Layern nahezu keine Podosomen beobachten konnten, gelang uns dies bei den *wund-assay*-Experimenten. Hier wurden bis zur fünften Zellreihe um den Wundkanal

herum gehäuft Zellen, die Podosomen generierten, visualisiert. Auch in subkonfluenten Kulturen konnte eine gesteigerten Häufung von Zellen detektiert werden, die HUVEC-Podosomen enthielten. Somit können wir zusammenfassend die Aussage treffen, daß Podosomen in subkonfluenten HUVEC aber auch nach Gefäßverletzung konstitutiv generiert werden. Die höchste Präsenz erreicht diese Adhäsionsstruktur jedoch mit Werten von $35,7\% \pm 1,2\%$ in subkonfluenten HUVEC-Layern (siehe Graphik 14. I).

4.3. HUVEC-Podosomen stellen eine Adhäsionsstruktur dar

Nachdem wir die in HUVEC gefundene Strukturen aufgrund ihrer Komponenten als Podosomen-ähnlich charakterisiert hatten, war es entscheidend herauszufinden, welche Rolle diese tatsächlich in den vaskulären Endothelzellen ausüben und ob es sich bei ihr in der Tat um Podosomen handelt.

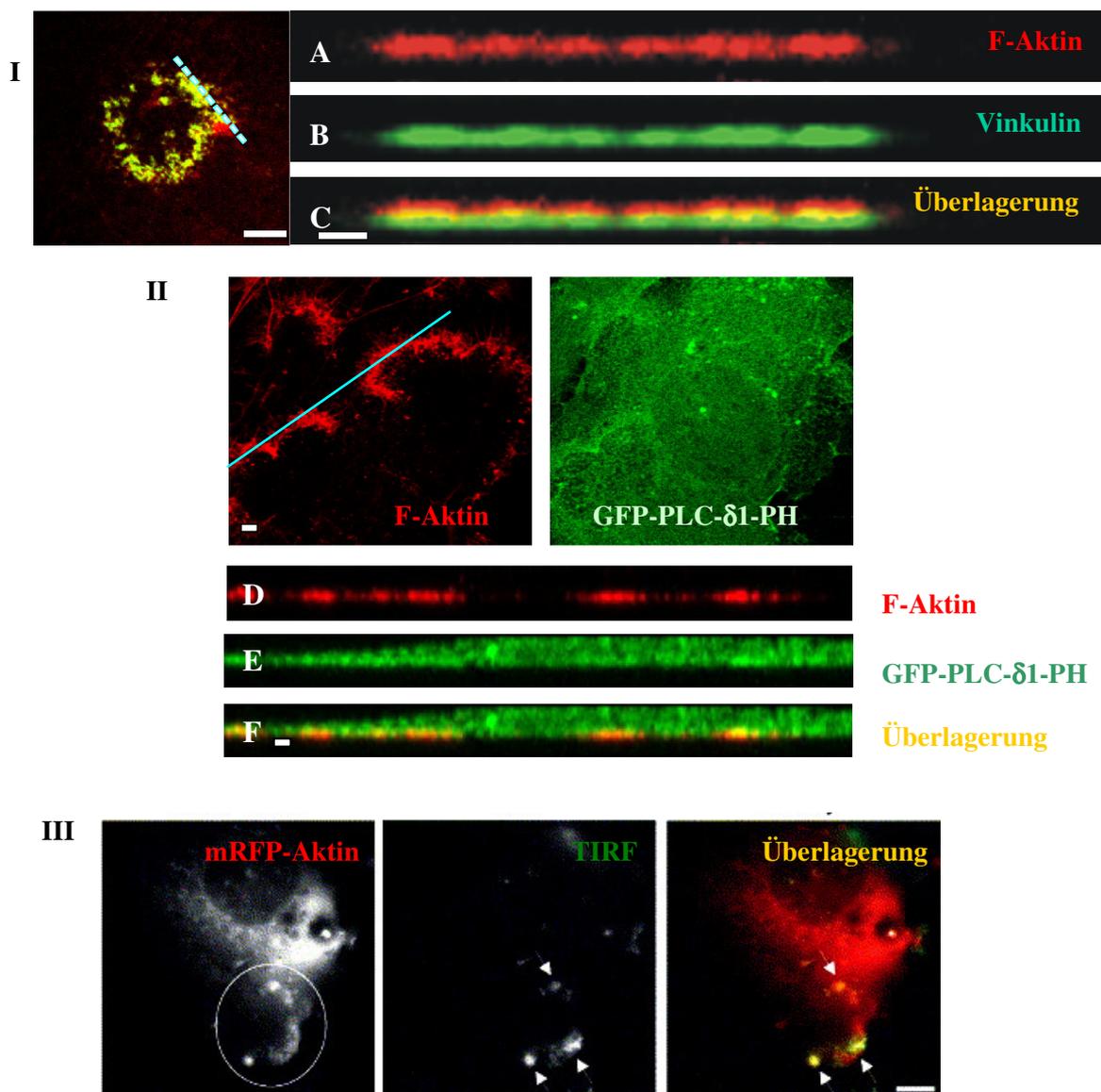


Abbildung 15: Ventrale Lage der HUVEC-Podosomen. (A-C) Konfokalmikroskopische Aufnahme von subkonfluenten HUVEC (I und II) in der xz und xy Ebene nach der Färbung von F-Aktin (A) mit Alexa-568-Phalloidin und Vinkulin (B) bzw. der transienten Transfektion mit PLC δ 1PH-GFP (II). C zeigt anhand der gelben Kolorierung die Überlagerung von beiden Proteinen. Die blaue Linie repräsentiert die virtuelle xz-Achse, die zur Erstellung optischer xz-Schnitte A-C bzw. D-F verwendet wurde. (III)

Konfokalmikroskopische Aufnahme von mRFP-Aktin exprimierenden HUVEC (rot/D; HUVEC-Podosom im Kreis markiert, auf die Adhäsionsstellen ist mit Pfeilen verwiesen) und die korrespondierenden TIRF-Aufnahmen (grün/E). Überlagerung in gelb (F). Weißer Balken: 10 μm und 2 μm bei A-F.

Die Podosomen der hämatopoetischen Zellen, die als Adhäsionsstrukturen fungieren, liegen in der ventralen Substratanheftungsebene (Tarone *et al.*, 1985). Somit mußten wir die Frage klären, ob auch die HUVEC-Podosomen als solche Adhäsionsstrukturen definiert werden können.

Um die Lokalisation der von uns entdeckten Podosomen-artigen Komplexe in HUVEC zu charakterisieren, wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen in xy- und xz-Schnitten von subkonfluenten HUVEC nach indirekter Immunfluoreszenzfärbung gegen Komponenten dieser Strukturen angefertigt. So war es uns möglich die Lage/Tiefe eines jeden der Komponenten innerhalb der Struktur und der Zelle zu bestimmen.

Weiterhin verwendeten wir hierzu ein Fusions-Konstrukt, das PLC- δ 1-PH-GFP, das spezifisch an PtdIns(4,5)P₂ bindet und so u.a. an der Plasmamembran lokalisiert. Dieses wurde transient in subkonfluente HUVEC transfiziert. Im Anschluß an die Transfektion und einer späteren Anfärbung des F-Aktins folgte die mikroskopische Auswertung der Präparate. Dank dieser Experimente gelang es uns zu zeigen, daß HUVEC-Podosomen an der ventralen Seite der Zelle lokalisieren und in einer zweischichtigen Architektur vorliegen. Proteine, die die Adhäsion vermitteln lokalisieren in der unteren, F-Aktin in der oberen Schicht. Zwischen beiden Schichten existiert zudem eine partielle Region der Überlappung (siehe Abb.15: I und II).

Um festzustellen, ob diese Strukturen Kontakt zum Substrat herstellen können, wurde die TIRF (*total internal reflection fluorescence*) Mikroskopie eingesetzt. Die Zellen wurden hierzu mit mRFP- β -Aktin (rot) transient transfiziert. Mit Hilfe der anschließenden Expression des markierten Aktins konnten wir die HUVEC-Podosomen visualisieren. Die Bereiche von markierten Strukturen, die dem Substrat nahe anliegen (< 120 nm Abstand) konnten durch ein korrespondierendes TIRF-Signal (grün) detektiert werden. Anhand der Überlagerung beider Aufnahmen gelang es uns zu zeigen, daß HUVEC-Podosomen Zonen darstellen, die dem Substrat nahe anliegen. Damit repräsentieren sie einen neuen Typ von Adhäsionsstrukturen in HUVEC (siehe Abb. 15. III).

4.4. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) tragen zu proteolytischen Funktionalität der HUVEC-Podosomen bei

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind proteolytische Enzyme mit der Fähigkeit zum Abbau von Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) und spielen so eine wichtige Rolle bei der Wundheilung, beim Wachstum und bei der Migration von gesunden aber auch von Karzinomzellen (Guenzi *et al.*, 2003; Holmbeck *et al.*, 2003). Auch Makrophagen produzieren diese wichtige Gruppe von Endopeptidasen, die in den Podosomen lokalisiert sind (Sato *et al.*, 1997).

Es war von großer Bedeutung zu evaluieren, ob auch die von uns beschriebenen HUVEC-Podosomen die MMPs als Komponenten beinhalten, und ob diese Enzyme hier ihre proteolytische Aktivität ausüben können. Hierzu wurde die Expression von MMP-2, -9 und MT1-MMP über das indirekte Immunfluoreszenzfärbung ermittelt. Die getesteten Matrix-Metalloproteinasen wurden als Komponenten der HUVEC-Podosomen charakterisiert (Siehe Tabelle 13). Tendenziell konnte eine höhere Präsenz von MMPs verzeichnet werden, nachdem die humanen Nabelschnurendothelzellen nicht auf Kollagen sondern auf Fibronectin ausgesät wurden.

Um die proteolytische Aktivität der podosomal Strukturen zu analysieren, wurde Alexa-488-gelabeltes Fibronectin zum *coat* der *coverslips* verwendet. Anschließend wurden auf den so behandelten *coverslips* HUVEC ausgesät, nach Ablauf von 1-2 d fixiert und die Degradierung mittels der indirekten Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Wie die von uns angefertigten

konfokalen Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen, kolokalisieren Podosomen mit den Bereichen des Abbaus des gelabelten Fibronektins und hinterlassen Löcher, die mit der Größe und Form der jeweiligen Podosomen übereinstimmen (Siehe Abb. 16). Demnach stellen HUVEC-Podosomen Zonen des Abbaus der ECM dar. Der Abbau geschieht wahrscheinlich durch die MMPs.

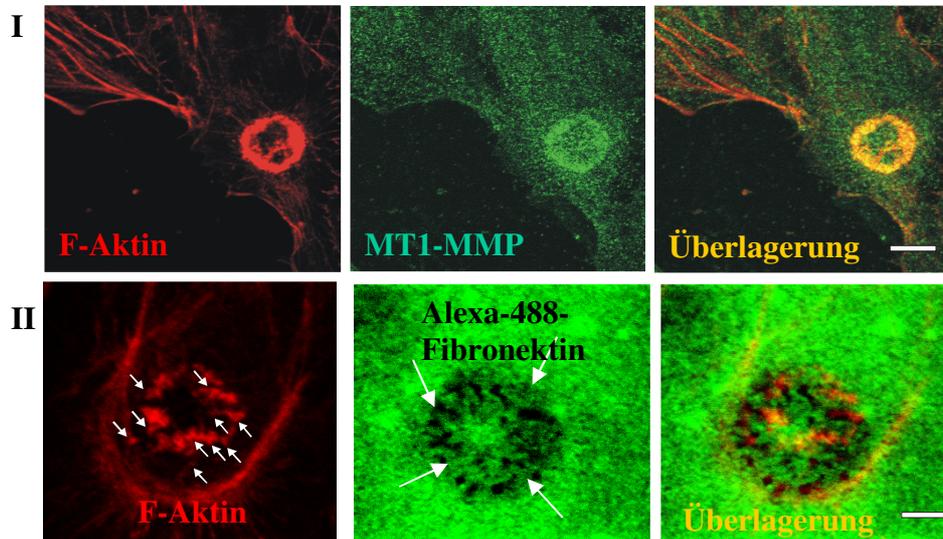


Abbildung 16: HUVEC-Podosomen enthalten MT1-MMP und degradieren die ECM. Konfokalmikroskopische Aufnahme von subkonfluenten HUVEC, bei denen MT1-MMP (grün/A), F-Aktin (rot/B) mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung dargestellt wurde. Die gelbe Farbe (C) zeigt die Kolokalisation an. (II) Matrixdegradationsaktivität von Podosomen wird durch den Verlust der grün gelabelten Matrix, die sich in den schwarzen Stellen offenbart, deutlich. Die weißen Pfeile (groß) verweisen auf die Überlappung der proteolytischen Aktivität mit dem durch F-Aktin markierten HUVEC-Podosomen (weiße Pfeile klein). Der weiße Balken stellt die Länge von 10 µm dar.

4.5. Intrazelluläre Verteilung von HUVEC-Podosomen

Im Verlauf unserer Analysen von HUVEC-Podosomen an fixierten Präparaten wurde deutlich, daß diese Strukturen innerhalb einer Zelle eine unterschiedliche Häufigkeitsverteilung haben. Die meisten dieser Adhäsionsstrukturen waren an der Zellperipherie lokalisiert. Um dies zu untermauern, wurden *live cell imaging*-Experimenten durchgeführt. Hierzu wurden HUVEC transient mit Konstrukten wie eGFP-C1-Drebrin (Siehe Punkt 4.12) oder mRFP-Aktin transfiziert (Siehe Punkt 2.6). Da diese Konstrukte Komponenten der Podosomen darstellen, konnten sie zu deren Markierung dienen. Anhand dieser Versuche gelang es uns zu zeigen, daß diese Adhäsionen tatsächlich motil sind und auf die Zellperipherie zuwandern. Bei sich bewegenden HUVEC-Podosomen konnte zudem beobachtet werden wie sie sich scheinbar in unterschiedliche Einheiten teilen und mit diesen bzw. mit der Zellperipherie fusionierten.

Insgesamt handelt es sich bei diesen Adhäsionsstrukturen um extrem dynamische Konformationen mit periodischen Zyklen vom rapiden Aufkommen und Verschwinden. Die Lebensdauer der HUVEC-Podosomen beträgt eine Zeitspanne von 15 sek bis zu über mehrere Minuten. Wir konnten aber auch Strukturen beobachten, die auch länger bestehen bleiben konnten (Siehe dazu Filme im Anhang).

Unser weiteres Interesse richtete sich darauf herauszufinden ab welchem Zeitpunkt nach der Herstellung des Kontaktes zur ECM HUVEC Podosomen generieren können. Hierzu wurden HUVEC in einer Menge ausgesät, die zur Bildung eines subkonfluenten *layers* notwendig ist. Anschließend wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert, angefärbt und mikroskopisch ausgewertet.

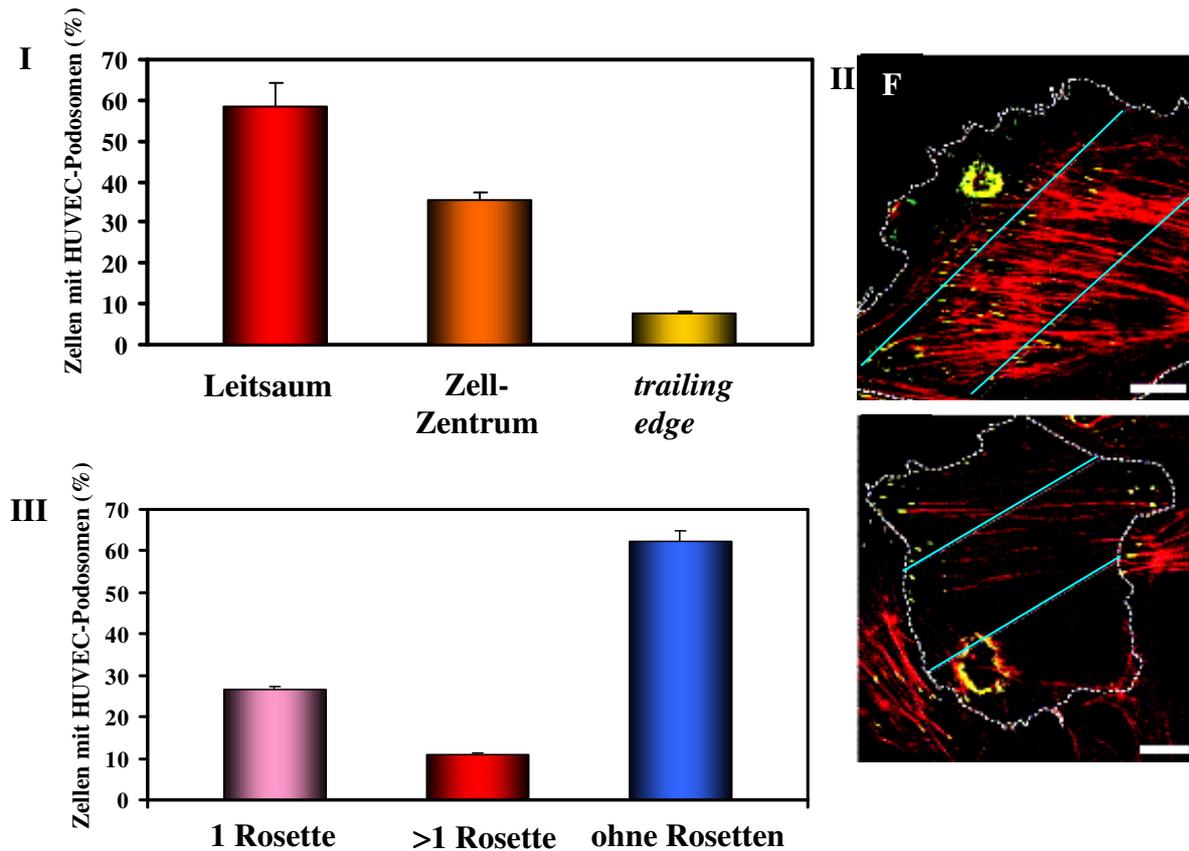


Abbildung 17: Positionelle Verteilung der HUVEC-Podosomen in migrierenden HUVEC. Die Graphik (I) zeigt die Häufigkeitsverteilung von Endothelzellen die HUVEC-Podosomen ausbilden in Abhängigkeit von der Position innerhalb der Zelle. Die Prozentsätze für einzelne Experimente sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt: 58,3% \pm 10,3% am Leitsaum, 35,7% \pm 4,2% im zentralen Bereich der Zelle, 7,8% \pm 6,2% am *trailing edge*. Für jeden Wert dieser Statistik wurden in drei unabhängigen Versuchen 6x30 Zellen ausgewertet. Konfokalmikroskopischen Aufnahmen (II) eines subkonfluenten *layers* der HUVEC zeigt diese nach der Durchführung einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung wobei Phosphotyrosin grün und F-Aktin rot, die Überlagerung gelb dargestellt sind. Die blauen Linien dienen zur Verdeutlichung der Auswertung und Aufstellung der Statistik. Zur besseren Visualisierung sind die Umrisse der Zellen als weiße, gestrichelte Linie angedeutet. (III) Quantifizierung der generierten HUVEC-Rosetten pro Zelle: Die Prozentsätze für einzelne Experimente sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt: 26,7% \pm 2,9% für Zellen mit nur einer Rosette, 10,9% \pm 3,1% bei Zellen mit mehr als einer Rosette, 62,4% \pm 4,2% am *trailing edge*. Hierfür wurden in drei unabhängigen Experimenten 6x30 Zellen analysiert. Der weiße Balken zeigt 10 μ m an.

Schon eine Stunde nachdem die HUVEC ausgesät worden sind, wurden HUVEC-Podosomen detektiert. Die Zahl der Zellen, die diese Adhäsionsstruktur generierten, war eine Stunde nach dem Aussäen bei einem Wert von ca. 20% und stieg nach vier Stunden lediglich auf 26,2% an. Schon in der fünften Stunde konnte jedoch 35,4% der HUVEC Podosomen bilden. Dieser Wert steigt auch nach ein bis zwei Tagen nicht merklich an. Diese Daten verweisen, zusammen mit *live cell imaging* Experimenten (Siehe Filme im Anhang), darauf hin, daß diese Strukturen eine hohe Dynamik und schnelle Bildungsrate aufweisen.

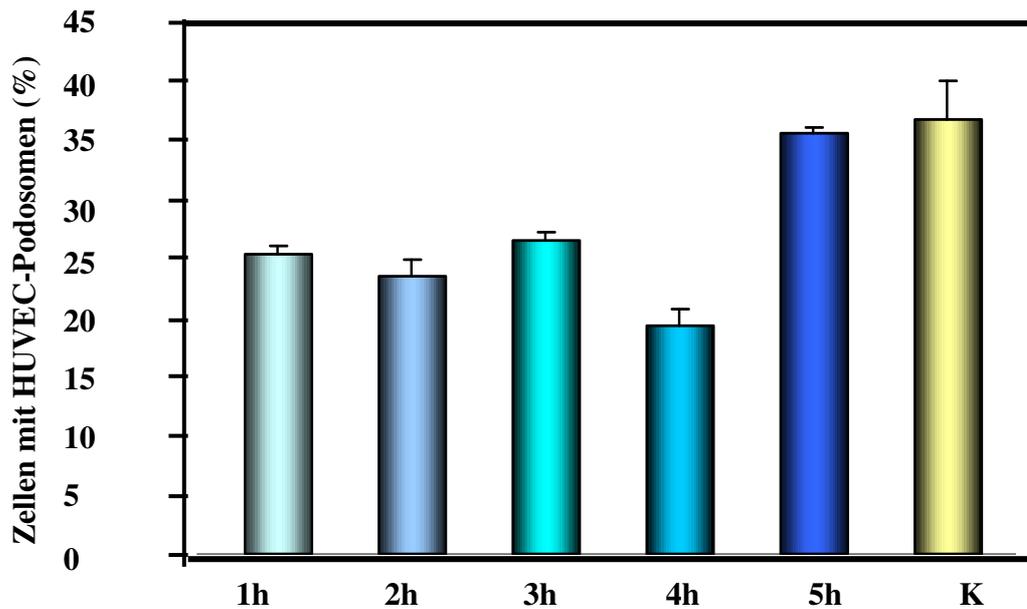


Abbildung 18: HUVEC-Podosomen werden schnell und in einer konstanten Anzahl generiert. Die Graphik zeigt Zellen, die Podosome ausbilden in Abhängigkeit von der Zeit der Fixierung nach dem Aussäen. Die Werte stehen im Vergleich zur Kontrolle (gelb), die den subkonfluenten Zustand der Zellen nach ein bis zwei Tagen nach dem Aussäen darstellt. Die Prozentsätze für einzelne Experimente sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt: 24,7% \pm 1,6% 1 h, 22,7% \pm 2,3% 2 h, 26,2% \pm 1,7% 3 h, 19,4% \pm 2,4% 4 h und 35,4% \pm 1,1% 5 h nach dem Aussäen; Kontrolle 36,9% \pm 2,8%. Für die statistische Auswertung wurden jeweils 6 mal 30 Zellen aus fünf unabhängigen Experimenten einbezogen.

4.6. Die Bildung von HUVEC-Podosomen ist abhängig von der *de novo*-Proteinbiosynthese

Podosomen der Monozyten weisen eine hohe Dynamik auf und sind nicht auf *de novo*-Proteinsynthese angewiesen (Tarone *et al.*, 1984). In Anlehnung an diesen Sachverhalt wurde auch die Abhängigkeit der Proteinbiosynthese für die Bildung von HUVEC-Podosomen analysiert. Hierzu wurde die Proteinbiosynthese mit Hilfe von Cycloheximid gehemmt. Nach einer einstündigen Inkubation der HUVEC im Medium mit Cycloheximid, der Durchführung eines *wound-assays* und einer weiteren Inkubation für vier Stunden im Medium mit Cycloheximid-Zusatz, war die Zahl der Zellen, die HUVEC-Podosomen ausbilden deutlich reduziert verglichen mit den Kontrollwerten.

Auch beim Wachstum von Zellen in serumdepriviertem Medium konnte eine ebenso deutliche Reduktion von der Anzahl an HUVEC beobachtet werden, die Podosome generieren konnten. Die Entstehung dieser Adhäsionsstrukturen bedarf also im Gegensatz zu den klassischen Podosome einer intakten *de novo* Proteinbiosynthese und einer Versorgung mit Nährstoffen beziehungsweise extrazellulären Botenstoffen aus der Umgebung.

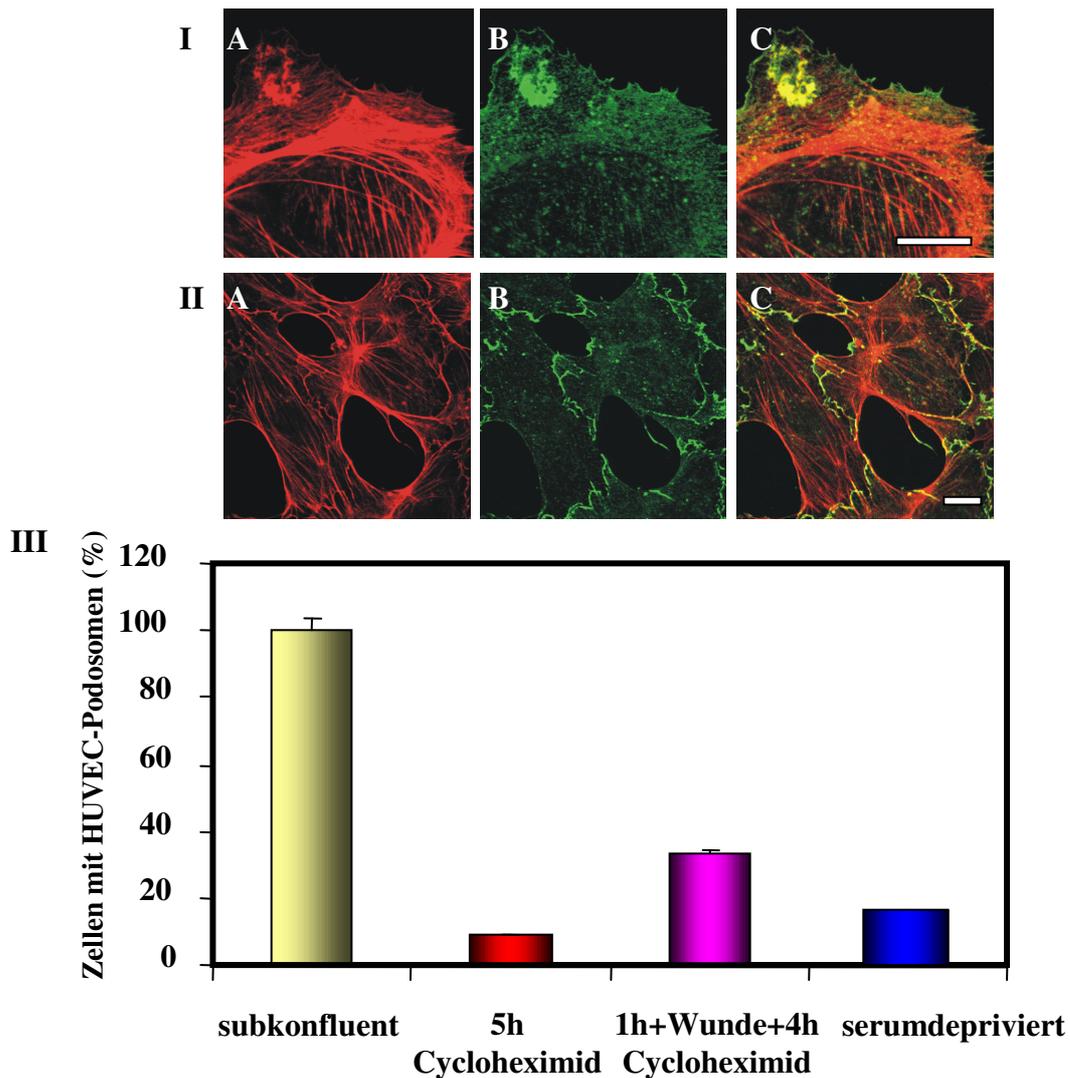


Abbildung 19: Für die Bildung von HUVEC-Podosomen ist eine intakte Proteinbiosynthese notwendig. Konfokalmikroskopische Aufnahme von HUVEC nach einer 1h Inkubation mit Cycloheximid anschließender Verwundung und 4h Nachinkubation im Medium, welches den Inhibitor enthält (I), wie auch nach einer fünfstündigen Inkubation mit Cycloheximid (II). Färbung von F-Aktin (rot) und Drebrin (grün). C zeigt die Überlagerung von A und B. Weißer Balken: 10 μm . Die Graphik (III) stellt die Häufigkeitsverteilung von Zellen mit Podosomen in Abhängigkeit von der Behandlung mit Cycloheximid und Serumdeprivation dar. Die Prozentsätze für einzelne Experimente sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Die subkonfluenten HUVEC fungieren als Kontrolle deren Werte auf 100% gesetzt und die restlichen Werte dementsprechend umgerechnet wurden. Für die statistische Auswertung wurden jeweils 6 mal 30 Zellen aus fünf unabhängigen Experimenten einbezogen.

4.7. Src-Kinase Abhängigkeit der HUVEC-Podosomen

Nach der Transfektion von Fibroblasten mit der onkogenen Proteintyrosinkinase v-src, konnten zum ersten mal Podosomen entdeckt werden. Dies war auch ein Hinweis darauf, daß dieses Protein eine zentrale Rolle bei dieser Struktur ausübte (Tarone *et al.*, 1985; Marchisio *et al.*, 1987). Wie schon von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte, ist die Src-Kinase tatsächlich ein zentraler Regulator der Podosomen (Marchisio *et al.*, 1987; Tarone *et al.*, 1985). Aber auch die Substrate dieser Kinase, wie die Pyk2 (*Prolin-reiche Tyrosin Kinase 2*) üben eine zentrale Rolle in der Podosomenbildung aus (Chellaiah *et al.*, 1998; Lakkakorpi *et al.*, 1999).

Um festzustellen ob auch HUVEC-Podosomen-Bildung von der Involvierung der Src-Kinase abhängig ist, wurde diese mit Hilfe des spezifischen Inhibitors, PP2, gehemmt. Hierbei konnten wir wie schon bei den Podosomen der Monozyten beschrieben, eine reversible Zerstörung von HUVEC-Podosomen detektieren (Linder *et al.*, 2000). Nach Auswaschung von PP2 und einer einstündigen Nachinkubation im PP2-freien Medium werden beide podosomalen Strukturen, erneut gebildet. Somit sind auch die in den primären humanen Nabelschnurendothelzellen sich bildenden HUVEC-Podosomen in ihrer Entstehung von der Src-Kinase abhängig.

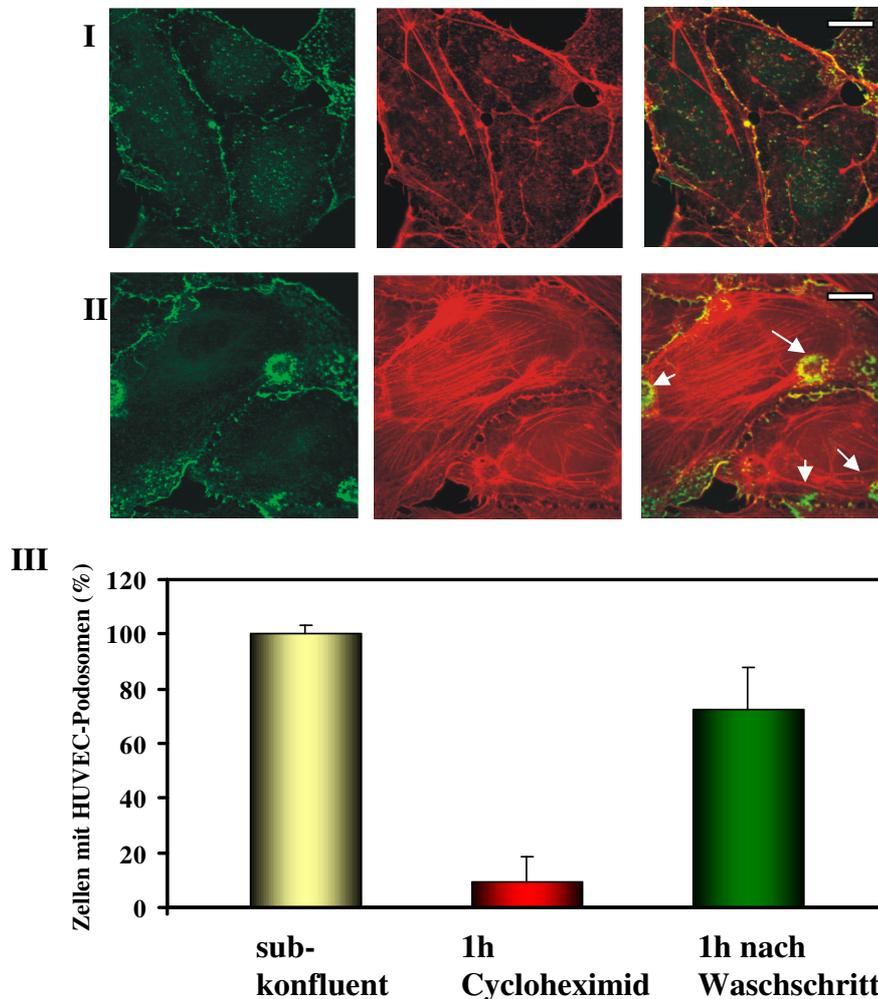


Abbildung 20: Src-Tyrosinkinase hat einen Einfluß auf die Bildung von HUVEC-Podosomen. Konfokalmikroskopische Aufnahmen von HUVEC nach einer 1h Inkubation mit PP2, und nach einer 1h Inkubation mit anschließender Auswaschung von PP2 und einer weiteren Stunde Inkubation im HUVEC-Medium ohne PP2 (II). Färbung von F-Aktin (rot) und Phosphotyrosin (grün). C zeigt die Überlagerung von A und B wobei die Pfeile auf die Podosomen hindeuten. (III) Die graphische Darstellung spiegelt die Häufigkeit von Zellen, die Podosomen enthalten, in Abhängigkeit von der Behandlung mit PP2 wieder. Die prozentuale Darstellung ergibt sich, indem die HUVEC-Podosomen-haltigen Zellen im subkonfluenten Layern auf 100% (Kontrolle) gesetzt und die restlichen Werte darauf bezogen wurden. Die Prozentsätze für einzelne Experimente sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt: $9,2\% \pm 9,2\%$ bei PP2-behandelten Zellen, $72,2\% \pm 21,8\%$ 1h nach dem Waschschrift. Für jeden Wert dieser Statistik wurden in drei unabhängigen Versuchen 10x30 Zellen ausgewertet. Weißer Balken: 10 μ m.

4.8. Die Rolle von RhoGTPasen bei der Bildung von HUVEC-Podosomen

Die Reorganisation des Zytoskeletts durch diverse RhoGTPasen ist von entscheidender Bedeutung für migratorische Prozesse wie die Extension und Polarisierung der Zelle in die

Richtung der Migration, die Kontraktion der Zelle und die Ablösung des hinteren Zellteiles von der ECM. Hinzu kommt, daß die RhoGTPasen auch andere zelluläre Prozesse wie Proliferation, Apoptose, Endozytose aber auch die Organisation und Generierung von Zell-Zell-Kontakte beeinflussen (Aspenström *et al.*, 1999; Hall *et al.*, 1998). Die Rho-GTPasen, die zur Ras-Superfamilie der GTPasen zählen, sind zentrale Schaltstellen bei der dynamischen Regulation des Aktinzytoskeletts. Sie sind auch entscheidend an der Kontrolle von Podosomen beteiligt, die die prominenteste Aktin-Struktur der primären humanen Makrophagen darstellen (Linder *et al.*, 1999).

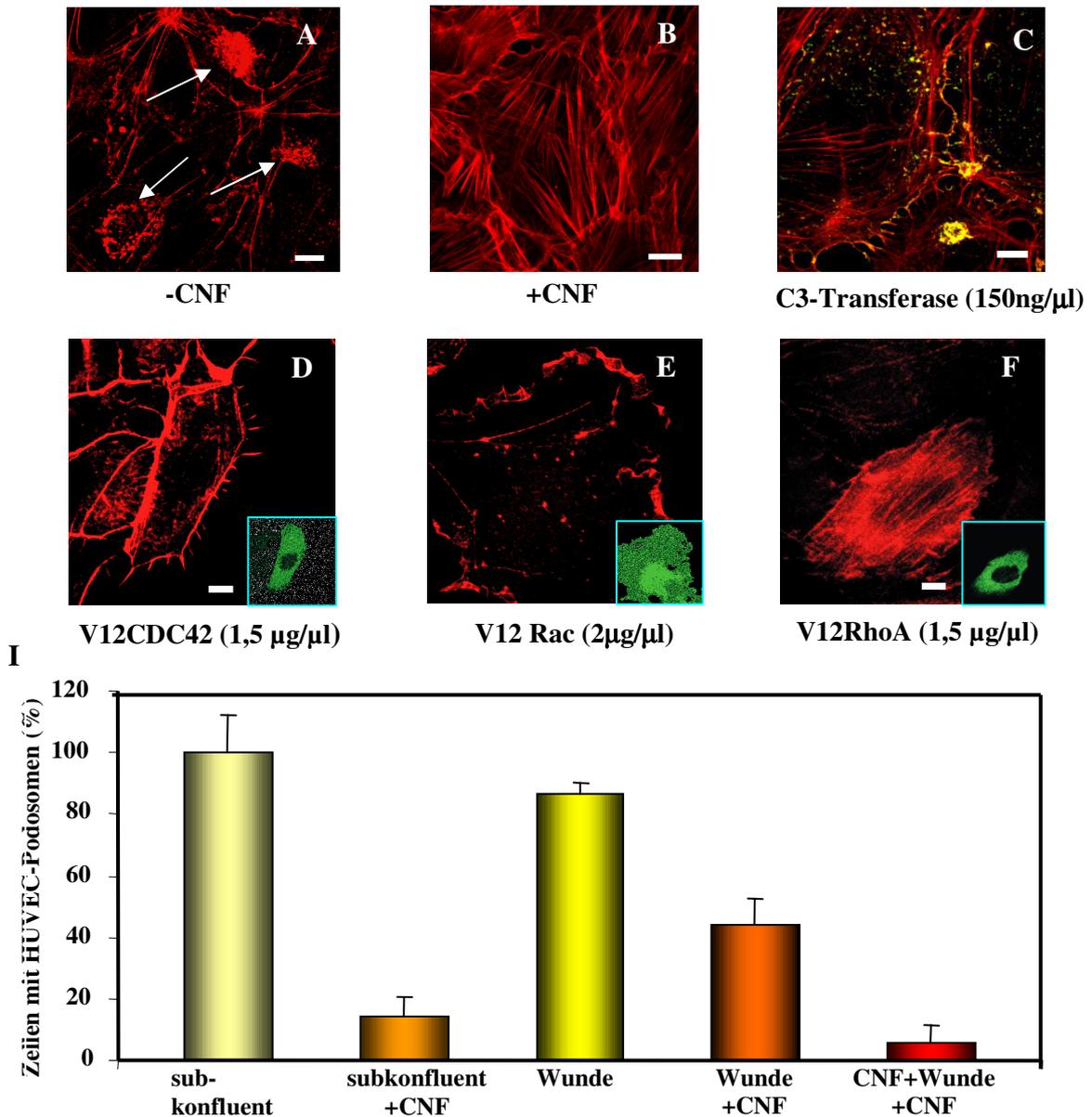


Bild 21: RhoGTPasen kontrollieren die Bildung von HUVEC-Podosomen. Konfokalmikroskopische Aufnahme von subkonfluenten HUVEC bei denen F-Aktin rot dargestellt ist. (A) Kontrolle, (B) CNF-1 behandelte Zellen: die weißen Pfeile verweisen auf HUVEC-Podosomen in unbehandelten Zellen, (C) Kolokalisation (gelb) von F-Aktin (rot) mit Drebrin (grün) nach C3-Zugabe. Aufnahmen von D-F zeigen mikroinjizierte Zellen mit konstitutiv aktiven Konstrukten von GTPase-Mutanten. Die *Insets* belegen die erfolgreiche Injektion anhand der Co-Injektion von Ratten-IgG (Injektionsmarker) und dessen anschließender Anfärbung. (I) Generierung von Podosomen in CNF-1 (2 μg/ml) behandelten Zellen. Die Bildung von Podosomen in unbehandelten subkonfluenten Zellen wurde auf 100% gesetzt (Kontrolle). Die Prozentsätze für einzelne Experimente sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt: 14,1%±10,3% bei CNF-1-behandelten subkonfluenten Zellen,

86,8%±3,9% nach Verwundung, 43,7%±12,7% bei CNF-1-behandelten Zellen nach Verwundung, 5,6%±6,9% in CNF-1-behandelten Zellen vor und nach Verwundung.

Deswegen untersuchte unsere Arbeitsgruppe die Bedeutung dieser Familie von Proteinen in Bezug auf ihre Relevanz auf die HUVEC-Podosomen. Hierzu inkubierten wir subkonfluente, konfluente und nach der Durchführung des *wound-assays* verletzte HUVEC mit bakteriellen Toxinen wie C3 und CNF-1, die die RhoGTPasen modifizieren. Mit Hilfe von *cytotoxic necrotizing factor* (CNF-1) einem Toxin aus *Escherichia coli* sollten RhoGTPasen aktiviert werden. Zu seinen Substraten zählen GTPasen Rho, Rac und Cdc42. CNF-1 katalysiert eine Deamidierung an Glutamin 63, das sich in GTP-gebundenen GTPasen in unmittelbarer Nähe des γ -Phosphates befindet, der Switch II-Region des Proteins, die an der GTP-Hydrolyse beteiligt ist. Das deamidiert Protein zeigt daraufhin eine herabgesetzte intrinsische und eine blockierte p50Gap-stimulierte GTPase Aktivität (Schmidt *et al.*, 1997).

Das andere von uns verwendete Toxin *Clostridium botulinum* Exoenzym C3, ist eine Rho-spezifische ADP-Ribosyltransferase, die zur Inaktivierung der Rho-GTPasen durch spezifische Übertragung eines ADPRiboserestes auf Asparagin 41 von RhoA führt (Chardin *et al.*, 1989). Durch die ADP-Ribosylierung kommt es zur Hemmung der GEF-induzierten Aktivierung der Rho-Proteine. Zudem injizierten wir konstitutiv aktive (RhoA^{V14}, Rac1^{V12}, Cdc42^{V12}) und inaktive Konstrukte (Rac1^{N17}, Cdc42^{N17}) von RhoGTPasen in subkonfluente Layer von humanen Nabelschnurendothelzellen.

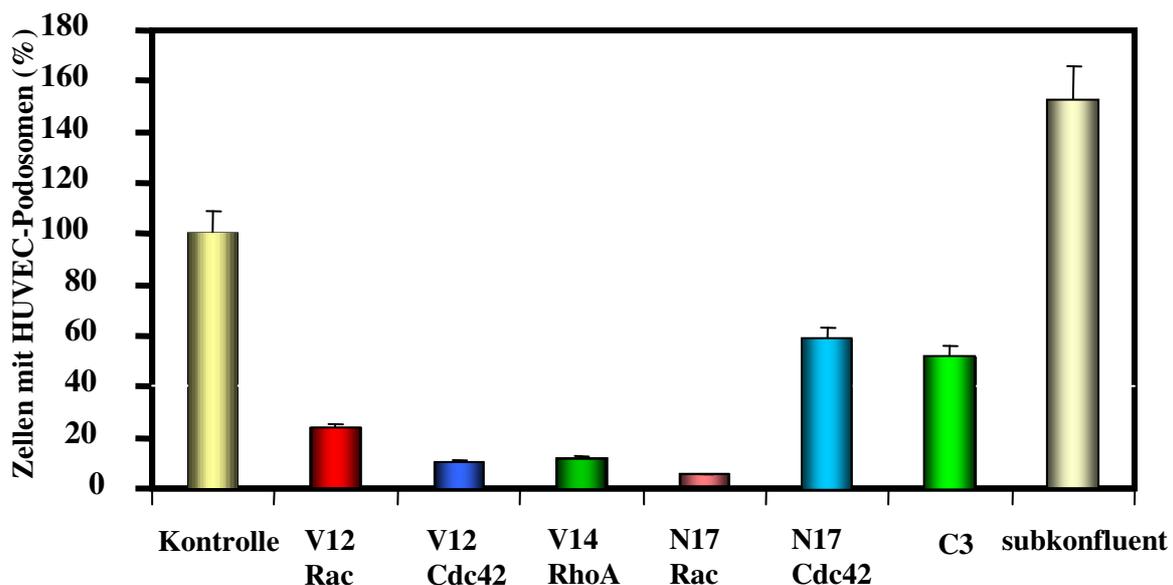


Bild 22: RhoGTPasen kontrollieren die Bildung von HUVEC-Podosomen. Podosenbildung in subkonfluenten HUVEC mikroinjiziert mit RhoGTPase-Mutanten oder inkubiert mit C3-Transferase. Podosenbildung nach der Injektion mit GST wurde auf 100% gesetzt (Kontrolle). Die Prozentsätze für einzelne Experimente sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt:

Rac1 ^{V12}	Cdc42 ^{V12}	RhoA ^{V14}	Rac1 ^{N17}	Cdc42 ^{N17}	C3
17,9%±11,5%	10,1%±7,8%	7,7%±12,8%	7,7%±8,4%	63,9%±17,9%	51,1%±15,8%

Für die statistische Auswertung wurden jeweils 6 mal 30 Zellen aus fünf unabhängigen Experimenten einbezogen. Zur Quantifizierung aller Versuche wurden jeweils in drei unabhängigen Experimenten 6x30 Zellen ausgewertet.

Um diese Ergebnisse zu untermauern und um ausschließen zu können, daß die Mikroinjektion selbst dazu beitrug, daß die HUVEC-Podosomen nicht mehr gebildet werden konnten, wurden Kontrollen injiziert, wobei nur der Injektionsmarker und -puffer verwendet wurde.

Gleichgültig ob RhoGTPasen durch die Inkubation mit CNF-1 aktiviert (Abb. 21) oder mit C3 inhibiert wurden, sank die Zahl der in HUVEC vorhandenen Podosomen stark ab. Die nach diesen Inkubationen generierten Adhäsionsstrukturen waren kleiner und kompakter ausgebildet, als solche in unbehandelten, subkonfluenten Zellen. Durch die Injektion konstitutiv aktiver aber auch inhibierender RhoGTPase-Mutanten wurde die Anzahl der gebildeten HUVEC-Podosomen stark reduziert. Die Inhibition von Rac1 löste die stärkste Reduktion in deren Anzahl aus. Die Inhibition von Cdc42 und Rho reduzierte auch die Bildung von Podosomen um ca. die Hälfte verglichen mit der Kontrolle. Jede von uns eingeführte Imbalance im Zyklus der RhoGTPasen führte demnach zu einer verringerten Bildung von HUVEC-Podosomen (Abb 22).

4.9. Arp2/3-Komplex vermittelte Aktinnukleation und ihre Bedeutung für die Bildung von HUVEC-Podosomen

Für zahlreiche zelluläre Prozesse ist die kontinuierliche Polymerisation und Depolymerisation von F-Aktin von großer Bedeutung. Diese Phänomene werden über diverse Signalkaskaden reguliert bei denen zum einen RhoGTPasen eine zentrale Rolle einnehmen, zum anderen aber. WASP-Proteine, die Effektoren für RhoGTPasen repräsentieren. Sie aktivieren zudem den Arp2/3-Komplex, wobei N-WASP den stärksten, WAVEs den schwächsten Aktivator darstellen (Aspenström *et al.*, 1999).

In den podosomal Strukturen der Makrophagen kolokalisieren Cdc42, WASP und Arp2/3-Komplex und sind entscheidend an der Regulation dieser Adhäsionsstrukturen involviert (Linder *et al.*, 2000). Unser Interesse richtete sich nun darauf herauszufinden, ob ein solcher Mechanismus auch die HUVEC-Podosomen reguliert. Die Anreicherung von RhoGTPase-Effektoren und Aktinregulatoren wie N-WASP, Arp2/3-Komplex in HUVEC-Podosomen deuten auf deren Rolle bei der Aktinnukleation hin (Siehe Tabelle 13).

Infolgedessen wurden HUVEC im subkonfluenten Zustand mit GST-A mikroinjiziert, immunhistologisch angefärbt und mikroskopisch ausgewertet. GST-A, enthält die *acidic* Region (A) von N-WASP, die eine hochaffine Bindungsstelle für den Arp2/3-Komplex darstellt (Hüfner *et al.*, 2001). Nach der Injektion der GST-A Domäne, die den zellulären Arp2/3-Komplex kompetitiv inhibiert, konnte die Zahl der Zellen die HUVEC-Podosomen bildeten auf $25,7\% \pm 12,6\%$ im Vergleich zur Kontrolle (Injektion von GST) reduziert werden.

Um den Einfluß von N-WASP zu überprüfen, wurden HUVEC zudem mit Wiskostatin ($2,5 \mu\text{M}$, 30 minutigen Inkubationszeit) behandelt. Wiskostatin interagiert mit der GTPase-bindenden Domäne von N-WASP und induziert oder stabilisiert die native, autoinhibitorische Konformation dieses Proteins. Auch nach der Inkubation mit diesem Inhibitor konnte eine dramatische Reduktion in der Zahl von Zellen beobachtet werden, die HUVEC-Podosomen ausbildeten, auf Werte von $1,0\% \pm 1,3\%$. Insgesamt lassen unsere Experimente die Schlußfolgerung zu, daß zum einen N-WASP und der Arp2/3 Komplex wichtige Regulatoren der HUVEC-Podosomen darstellen und zum anderen, daß sie diese Funktion wahrscheinlich über die Signalkaskade: RhoGTPasen-N-WASP-Arp2/3 Komplex ausüben, die die Aktinnukleation induziert.

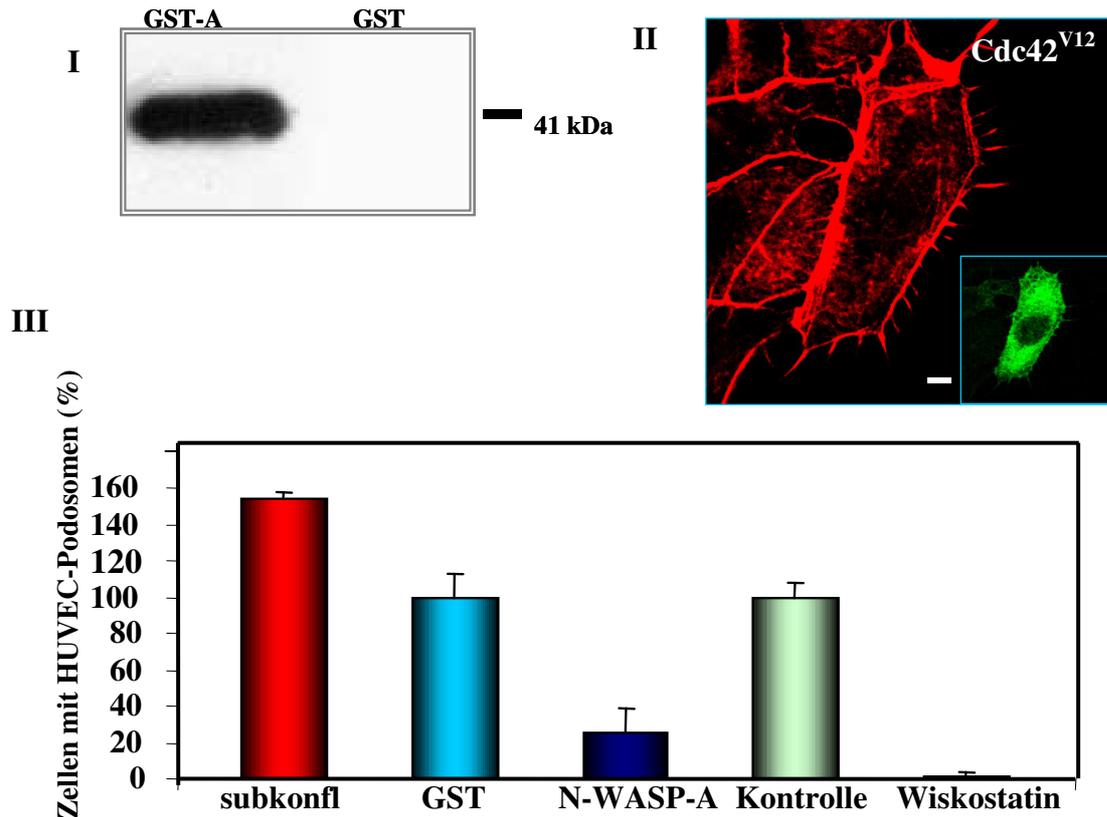


Abbildung 23: Arp2/3-Komplex vermittelte Aktinnukleation und N-WASP-Aktivität beeinflussen die Bildung von HUVEC-Podosomen. (A) Western blot: GST-pull down assay, N-WASP-A und GST als Kontrolle, entwickelt mit einem anti-ARPC1 (Arp2/3-Komplex Untereinheit)-spezifischen Antikörper. (B) Konfokalmikroskopische Aufnahme von subkonfluenten HUVEC nach der Mikroinjektion mit Cdc42^{V12}, Färbung von F-Aktin (rot) mit Hilfe von Alexa-568-Phalloidin und des co-injizierten Injektionsmarkers Ratten-IgG (grün, Inset) unter Verwendung des sek. anti-Ratten Antikörpers. Weißer Balken: 10 µm. (C) Bildung von HUVEC-Podosomen nach Mikroinjektion mit N-WASP-A oder der Inkubation mit den N-WASP-Inhibitor Wiskostatin (2,5 µM). Die Zahl von Zellen, die HUVEC-Podosomen ausbilden können nach der Injektion von GST und die von unbehandelten Zellen wurde auf 100% gesetzt. Die Prozentsätze für einzelne Experimente sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt: 25,7%±12,6% bei N-WASP-injizierten Zellen, 1,0%±1,3% bei Wiskostatin-behandelten Zellen. Für die statistische Auswertung wurden jeweils 6 mal 30 Zellen aus fünf unabhängigen Experimenten einbezogen.

4.10. Einfluß von Zytokinen auf die Bildung von Podosomen

Zytokine werden von Immunzellen, aber auch von nicht immunologischen Zellen gebildet, freigesetzt und fungieren als "Botenstoffe", die die Kommunikation zwischen diversen Zellen ermöglichen und unterschiedliche Signalkaskaden induzieren. So sezernieren zum Beispiel Makrophagen und Thrombozyten den pro-inflammatorischen Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), die u.a. in Abhängigkeit von extrazellulären Stimuli in der Lage sind sowohl die Induktion als auch die Inhibition von Matrixmolekülen und MMPs auszulösen. Zudem können Zytokine wie auch die MMPs die Mitogenese fördern und sind so wichtig bei der Wundheilung, der Angiogenese und Revaskularisierung (Wojciak-Stothard *et al.*, 1998; Rousseau *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003; Persaud *et al.*, 2004).

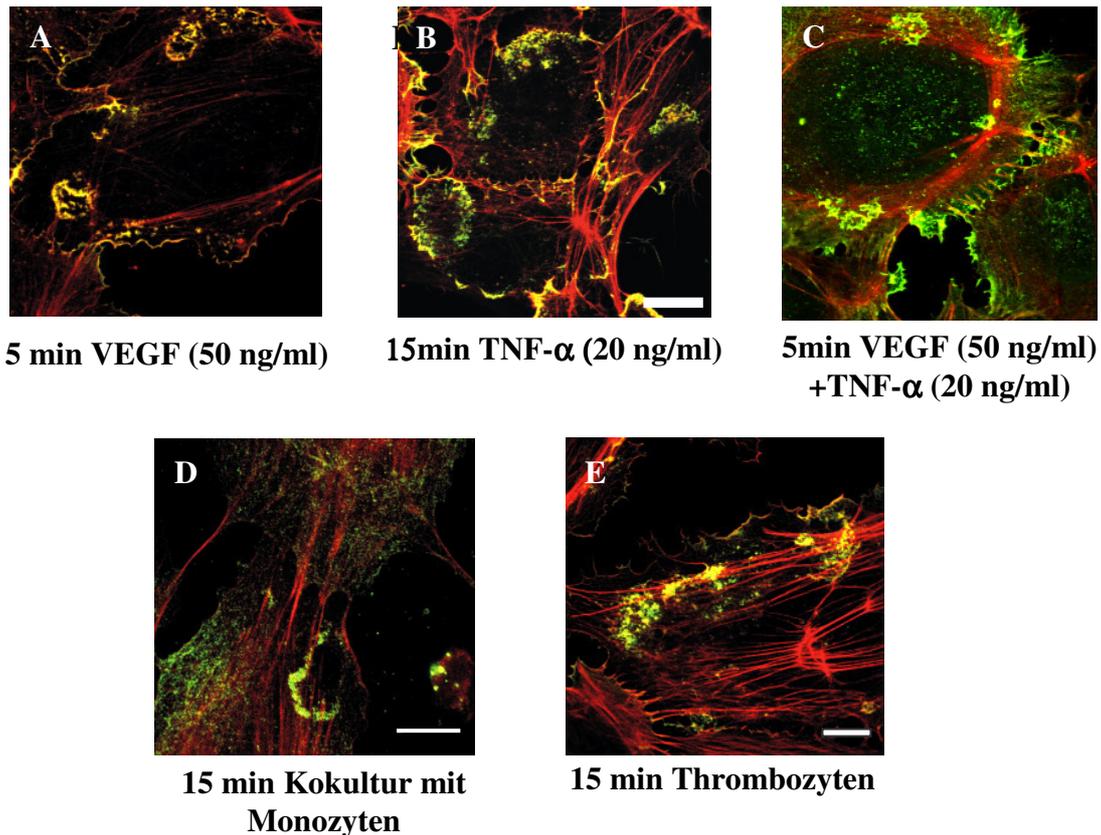


Abbildung 24: Einfluß von Zytokinen und Monozyten auf die Bildung von HUVEC-Podosomen. (A-E) Konfokalmikroskopische Aufnahme von subkonfluenten HUVEC kultiviert unter serumdeprivierten Bedingungen und der Inkubation dieser mit den oben angeführten Zytokinen bzw. nach der Kokultivierung dieser mit Monozyten oder Thrombozyten. Die angeführten Bilder zeigen jeweils die Überlagerungen von F-Aktin (Alexa-568-Phalloidin/rot) und Drebrin (anti-Drebrin-Antikörper/grün). Weißer Balken: 10 μ m.

Da wir in unserer Forschungsarbeit neben konfluenten auch an subkonfluenten oder verwundeten Zellschichten arbeiteten, d.h. mit Zellen, die über einen migratorischen Phänotyp verfügen, auf die Zytokine einen starken Einfluß ausüben, wollten wir deren mögliche Involvement an der Generierung von HUVEC-Podosomen untersuchen. Daneben bedingte die Serumdepletion eine Reduktion der Anzahl von HUVEC-Podosomen bildenden Zellen. Dies spricht dafür, daß in dem Medium enthaltene Faktoren – womöglich Zytokine - auf diese Adhäsionsstruktur Einfluß nehmen könnten (unter Serumdepletion $10,6\% \pm 3,9\%$ im Vergleich zu Experimenten mit serumhaltigen Medium gesetzt auf 100%) (Siehe Abbildung 26). Verstärkt wurde unser Interesse diesbezüglich, da diese Adhäsionsstrukturen MMPs als Komponenten enthalten, die wiederum von Zytokinen reguliert werden.

So wurden Zytokine (TNF- α : 10 ng oder 20 ng; VEGF 50 ng) einzeln oder in Kombination zu Serumdeprivierten-HUVEC-Medium zugesetzt bzw. eine Kokultur mit Zytokin-sezernierenden Zellen wie Thrombozyten oder Makrophagen durchgeführt. Die Generierung von HUVEC-Podosomen nach der jeweiligen Behandlung wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt. Es wurde deutlich, daß die Behandlung der subkonfluenten Zellen mit Zytokinen in allen Fällen zu einer gesteigerten Bildung von HUVEC-Podosomen führt (Siehe Abbildung 25). Bei der Inkubation mit VEGF wurde 5 min nach der Zugabe die höchste Bildungsrate an HUVEC-Podosomen beobachtet ($41,1\% \pm 6,8\%$), während dies bei der Behandlung mit TNF- α erst nach 15 min der Fall war ($39,4\% \pm 10,2\%$). Beide Werte entsprechen einer dreifachen Erhöhung der Bildung von HUVEC-Podosomen im Vergleich zur Kontrolle.

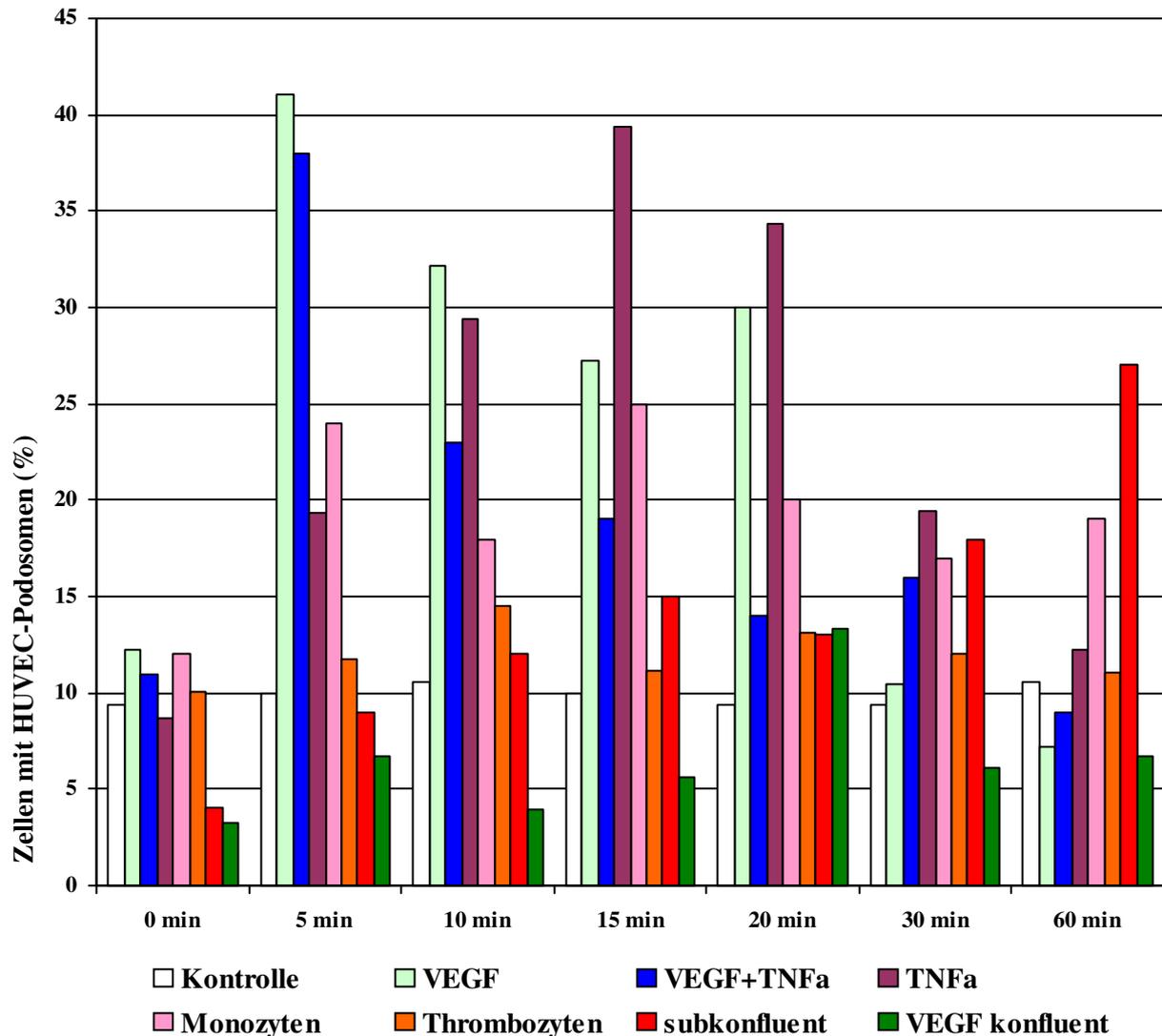


Abbildung 25: Zytokine und Monozyten erhöhen die Bildung von HUVEC-Podosomen. (I) Das Diagramm zeigt den zeitlichen Verlauf der Bildung von Podosomen in konfluenten und subkonfluenten HUVEC nach Zugabe der Zytokine VEGF und TNF α einzeln oder in Kombination, so wie nach der Kokultivierung mit Monozyten oder Thrombozyten im Vergleich zu den Kontrollwerten von unbehandelten subkonfluenten Zellen unter serumdeprivierten Bedingungen. (II) Die Graphik stellt zur besseren Visualisierung die Maxima der HUVEC-Podosomenbildung nach Zugabe von den aufgelisteten Zytokinen mit folgenden Konzentrationen dar: VEGF, VEGF+TNF- α , TNF- α , sowie von der Kokultur von HUVEC mit jeweils Monozyten, Thrombozyten in dem angegebenen Verhältnis; in subkonfluenten primären humanen Nabelschnurendothelzellen unter serumdeprivierten Bedingungen. Die Prozentsätze sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. *: $p < 0.02$: 10,6% \pm 3,9% Kontrolle, 41,1% \pm 6,8% für Zellen, die 5 min mit VEGF, 39,4% \pm 10,2% für Zellen, die 15 min mit TNF α , 23,9% \pm 4,5% für Zellen, 15 min nach der Zugabe von Monozyten, 11,1% \pm 5,3% für Zellen 15 min nach der Zugabe von Thrombozyten.

Die gesteigerte Bildung von HUVEC-Podosomen ausgelöst durch die Zugabe von Zytokinen zeigt eine Dosis-Abhängigkeit, denn eine geringere Konzentration führt zur geringeren Steigerung in der Zahl von Zellen mit HUVEC-Podosomen. Bei konfluenten HUVEC-layer erfolgt nach der Zugabe von den Faktoren TNF- α und VEGF keine signifikante Steigerung in der Anzahl von Zellen, die HUVEC-Podosomen ausbilden.

Da Thrombozyten und Monozyten Zytokin-produzierende Zellen darstellen, wurden auch sie in unsere experimentelle Reihe aufgenommen. In Kokulturen von Monozyten mit HUVEC kam es zur signifikanten Erhöhung der HUVEC-Podosomen-ausbildenden Endothelzellen. Bei Kultivierungszeiten von mehr als 24 Stunden trat jedoch ein anderes Phänomen zutage, die Zellen lösten ihre Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen auf, das Aktinzytoskelett wurde zerstört und apoptotische Zellen konnten vermehrt beobachtet werden. Bei der Kokultivierung von HUVEC mit gleichzeitiger Zugabe von Zytokinen konnten diese Phänomene ebenso beobachtet werden. In Kokulturen von Thrombozyten mit HUVEC konnte nur eine geringe Veränderung in der Anzahl von Endothelzellen beobachtet werden, die Podosomen ausbilden konnten.

Zusätzlich untersuchten wir, welche Stellung HUVEC-Podosomen-Regulatoren wie RhoGTPasen und Zytokine innerhalb der Kaskade, die ihre Bildung kontrolliert, einnehmen. Hierzu behandelten wir HUVEC mit dem Rho-Inhibitor C3-Transferase. Die Generierung von HUVEC-Podosomen in unbehandelten subkonfluenten Zellen (Serum-haltiges Medium) wurde auf 100% gesetzt. Die Inkubation mit der C3 Transferase reduziert die Zahl der Zellen, die Podosomen ausbilden können dramatisch ($5,4\% \pm 9,0\%$). Verglichen mit den Serumdeprivierten Bedingungen ist dieser Wert stärker reduziert. Dieses Unvermögen von den HUVEC die Adhäsionsstrukturen zu generieren kann weder mit der Zugabe von VEGF ($5,4\% \pm 8,0\%$; 50 ng/ml, 5 min nach der Zugabe) noch $\text{TNF}\alpha$ ($9,0\% \pm 7,4\%$; 20 ng/ml, 15 min nach der Zugabe) behoben werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß Rho als ein *downstream* Effektor von Signalkaskaden der Zytokine bei der Bildung von HUVEC-Podosomen agiert.

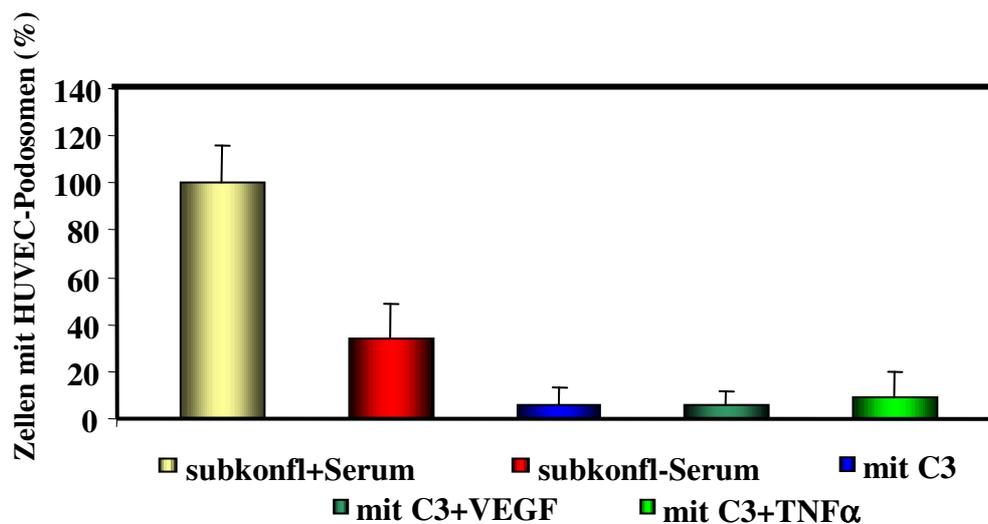


Abbildung 26: Zytokine erhöhen die Bildung von HUVEC-Podosomen. Podosomenbildung bei HUVEC nach der Zugabe von C3 Transferase. Podosomenbildung in unbehandelten Zellen in Serumhaltigen Medium wurde auf 100% gesetzt. Die Prozentsätze sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt: $33,6\% \pm 15,3\%$ bei serumdeprivierten HUVEC, $5,4\% \pm 9,0\%$ bei C3, $5,4\% \pm 8,0\%$ bei C3 und VEGF (50 ng/ml, 5 min nach der Zugabe) behandelten Zellen und $9,0\% \pm 7\%$ bei HUVEC nach Addition von C3 und $\text{TNF}\alpha$ (20 ng/ml, 15 min nach Zugabe). Für jede der Statistiken wurden in drei unabhängigen Versuchen 6×20 Zellen ausgewertet.

4.11. PI3-Kinase ist an der Signalkaskade involviert, die die Generierung von HUVEC-Podosomen induziert

Die PI3-Kinase ist an einer Vielzahl von zellulären Schlüsselfunktionen regulatorisch involviert, wie zum Beispiel bei der Proliferation, Migration, Apoptose, Zelladhäsion und der Ausbildung von Podosomen (Wheeler *et al.*, 2006). Wegen der Involvierung der PI3-Kinase in diesen zellulären Vorgängen und ihrer Verbindung zu den in den HUVEC-Podosomen enthaltenen Proteinen, wurde ihr Einfluß auf diese Adhäsionsstruktur analysiert.

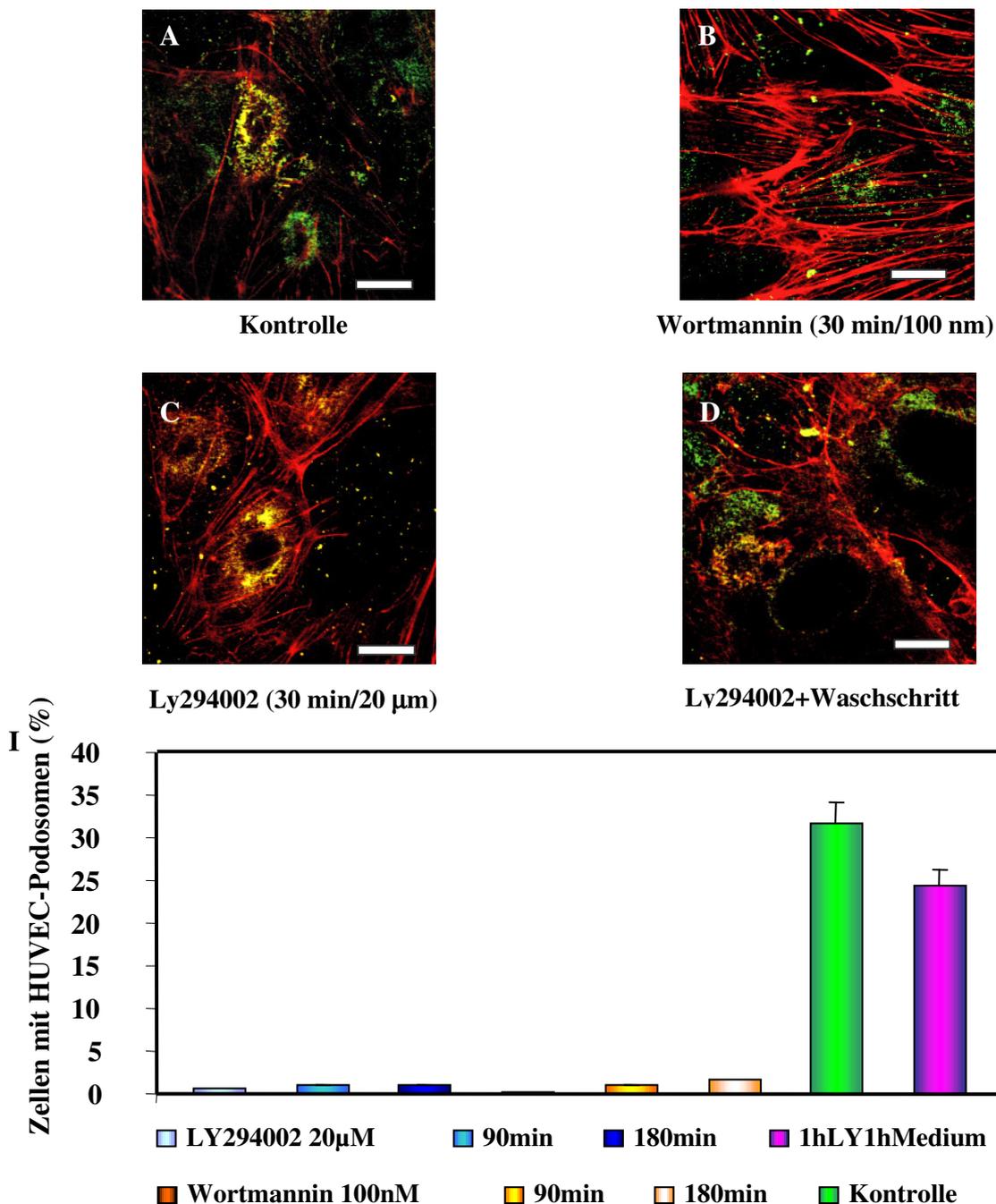


Abbildung 27: PI3-Kinase Inhibierung bewirkt eine Reduktion in der Zahl von Zellen die HUVEC-Podosomen bilden können. (A-D) Konfokalmikroskopische Aufnahme von subkonfluenten HUVEC nach der Behandlung mit den reversiblen (LY294002) oder irreversiblen (Wortmannin) Inhibitoren der PI3-Kinase im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Bilder zeigen jeweils die Überlagerungen von F-Aktin (rot) und Drebrin (grün). Weißer Balken: 10 µm. (I) Die Graphik gibt die

Häufigkeitsverteilung der Zellen, die HUVEC-Podosomen enthalten, in Abhängigkeit von den jeweils durchgeführten Inkubationsbedingungen (LY294004 und Wortmannin) an. Die Kontrolle stellt subkonfluente, unbehandelte HUVEC dar. Für jeden Wert wurden jeweils 6x30 Zellen in drei unabhängigen Versuchsreihen ausgewertet. Die Prozentsätze für die einzelnen Kategorien sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt: 32% \pm 8% bei Kontrolle; 1% \pm 1% bei 30 min, 1% \pm 1% bei 90 min, 1% \pm 1% bei 180 min LY294002-Inkubation und 24% \pm 8% bei 60 min LY294002-Zugabe, einem Waschschrift und erneuter Inkubation im HUVEC-Medium; 0,6% \pm 0,6% bei 30 min, 1% \pm 2% bei 90 min und 2% \pm 3% bei 180 min Wortmannin-Behandlung.

Hierzu wurde die PI3-Kinase entweder irreversibel durch den spezifischen Inhibitor der katalytischen Untereinheit p110, Wortmannin (20 μ M), einem Pilzgift aus *Penicillium wortmannii*, oder reversibel mittels des synthetischen Hemmstoffs LY294002 (100 nM), als kompetitiver Inhibitor der ATP-Bindungsstelle der PI3-Kinase (Vlahos *et al.*, 1994) blockiert. Tatsächlich führte die Behandlung von subkonfluenten HUVEC mit den Inhibitoren der PI3-Kinase zu einer dramatischen Reduktion in der Anzahl von Zellen, die über HUVEC-Podosomen verfügen (unter 2% im Vergleich zur Kontrolle von 32%). Somit ist eine intakte Funktionsweise der PI3-Kinase zur Bildung von HUVEC-Podosomen notwendig. Nachdem der Inhibitor LY294002 ausgewaschen und die Zellen 30 min nachinkubiert wurden, konnten erneut HUVEC-Podosomen beobachtet werden, was zeigt, dass dieser Prozeß reversibel ist.

4.12. Drebrin nimmt eine zentrale Rolle bei der Generierung von HUVEC-Podosomen ein

Während das Aktin-Zytoskelett zahlreiche zelluläre Funktionen beeinflusst, wird es selbst wiederum von diversen Aktin-bindenden Proteinen reguliert. Eines dieser Proteine, das Drebrin, reguliert und kontrolliert die Bildung von Protrusionen, Zell-Zell- wie auch Zell-Matrix-Verbindungen. Drebrin reduziert durch kompetitive Bindung an ein und derselben Proteinbindungsstelle an F-Aktin dabei dessen Assoziation mit α -Aktinin und Tropomyosin (Hayashi *et al.*, 1999; Mammoto *et al.*, 1998; Peitsch *et al.*, 2001). An F-Aktin gebunden verleiht Drebrin diesem Flexibilität, die zur Formation und Retraktion der Protrusionen und der Aktin-basierenden zytoskelettalen Veränderungen notwendig ist (Peitsch *et al.*, 1999 und 2001; Shirao *et al.*, 1994). Der genau molekulare Mechanismus für diese Regulation ist jedoch noch unbekannt. Die Identifizierung von HUVEC-Podosomen mit F-Aktin war vor dem zellulären Hintergrund problematisch, da dieses in zahlreichen Strukturen nachgewiesen werden kann. Infolgedessen suchten wir nach einem Markerprotein zur besseren Visualisierung von Podosomen. Eines dieser Proteine war Drebrin, da es dafür bekannt ist, daß es mit F-Aktin kolokalisiert und in Adhäsionsplaques detektiert werden kann (Asada *et al.*, 1994). Im Rahmen einer Kooperation mit Dr. W.Peitsch wurden uns zahlreiche Antikörper gegen dieses Protein zur Verfügung gestellt. Drebrin konnte anschließend mit Hilfe von indirekter Immunfluoreszenzfärbung nicht nur als eines der Komponenten, sondern auch als ein Markerprotein dieser Strukturen, charakterisiert werden, da es u. a. spezifisch in Podosomen angereichert wird. Es ist in Podosomen in der oberen F-Aktin-reichen Schicht. Eine Kotransfektion von GFP-DrebrinE2 und mRFP-Aktin verifizierte, daß Drebrin tatsächlich mit F-Aktin in diesen Adhäsionsstrukturen kolokalisiert. Zusätzlich konnte Drebrin auch in der Zellperipherie detektiert werden, an der Protrusionen ausgebildet wurden (Siehe Abb. 24, 28, 32 und Videos im Anhang).

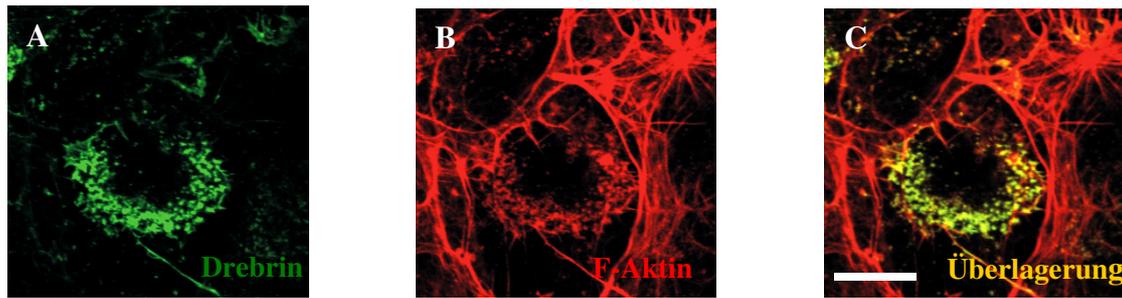


Abbildung 28: Drebrin kolokalisiert in HUVEC-Podosomen mit F-Aktin. Drebrin lokalisiert in den HUVEC-Podosomen an Bezirken, die protrusive Aktivität aufweisen und stellt zugleich das Markerprotein dieser Strukturen dar. Konfokalmikroskopische Aufnahme von HUVEC, die mit DrebrinE2/A2 (A) einen Antikörper zur Detektion vom Drebrin-Protein und mit Alexa-568-Phalloidin (B) gegen F-Aktin angefärbt wurden. C zeigt die Überlagerung von A und B. Weißer Balken: 10 μm

4.13. Drebrin ist essentiell für die Bildung von HUVEC-Podosomen

Um die Rolle von Drebrin bei der Bildung von Podosomen zu überprüfen, transfizierten wir zwei siRNA gegen unterschiedliche Regionen von Drebrin in HUVEC. Wir erhielten diese Konstrukte von unserer Kooperationspartnerin W.Peitsch. Eine der siRNAs reduzierte den Level an zytosolischen Drebrin effizient 24h nach der Transfektion und hielt den Zustand des *knock outs* für weitere drei Tage stabil, während die Menge an vorhandenem β -Aktin gleichblieb (Siehe Abb. 29 I).

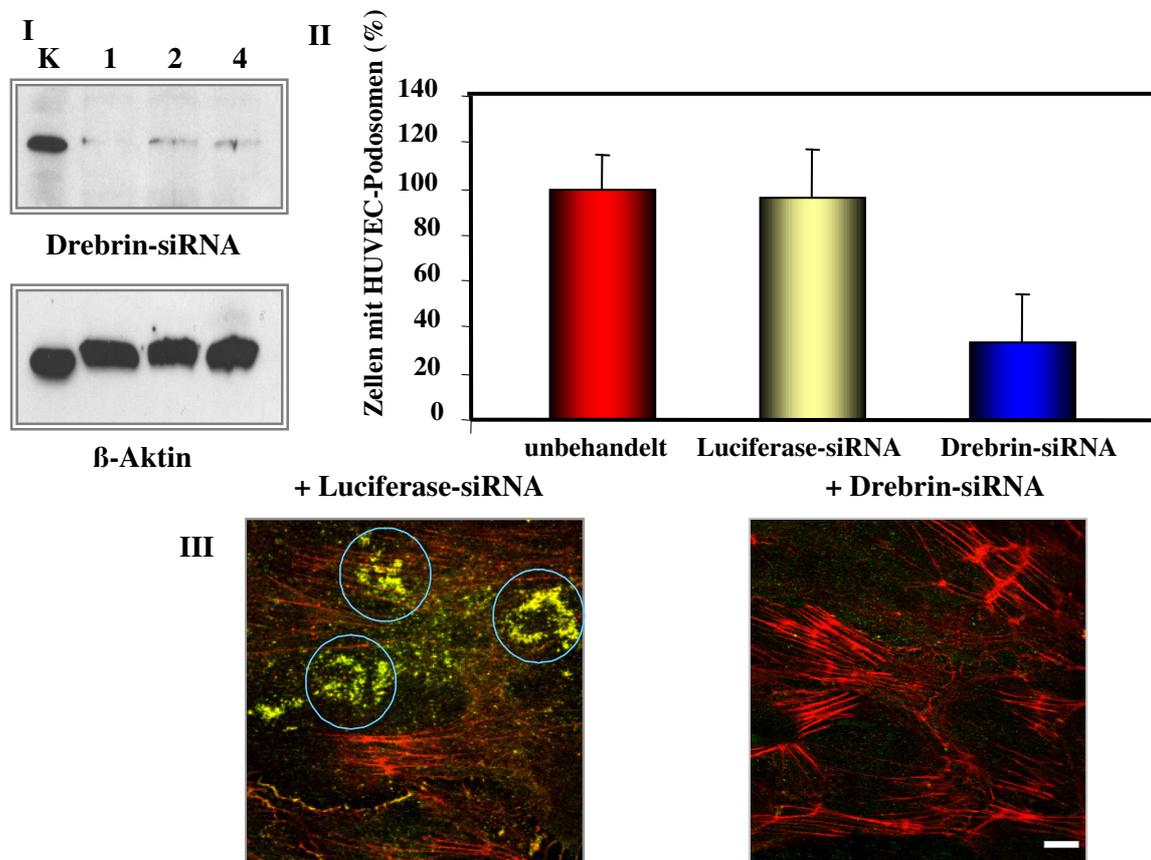


Abbildung 29: Drebrin-siRNA reduziert die Zahl an Zellen, die HUVEC-Podosomen enthalten. (I) Western blot nach der Transfektion von HUVEC mit Drebrin-siRNA. Die Zellen wurden jeweils ein und drei Tagen nach der Transfektion ausgewertet. Als Kontrolle dienten untransfizierte HUVEC und der

Nachweis der Expression vom Haushaltsgen β -Aktin. In allen vier Spuren wurden gleiche Proteinmengen auf ein 12,5 % SDS-Gel geladen. Die Expression von Drebrin wurde mit anti-Drebrin-Antikörper nachgewiesen. Der obere Teil der Abbildung zeigt die durch die Targetsequenz hervorgerufene Reduktion der Expression. Der untere Teil der Abbildung zeigt anhand der Detektion von β -Aktin mittels anti- β -Aktin-Antikörper die gleiche Proteinmengen. (II) Die Graphik zeigt die Zahl an HUVEC, die Podosomen generieren in Abhängigkeit von der transfizierten Substanz. Als Kontrolle dienten HUVEC, die mit Luciferase-siRNA transfiziert wurden bzw. untransfiziert blieben. (III) Konfokalmikroskopische Aufnahme von HUVEC, die mit Luciferase-siRNA oder Drebrin-siRNA transfiziert wurden. F-Aktin (rot) wurde mit Alexa-568-Phalloidin und Drebrin (grün) angefärbt. Weißer Balken: 10 μ m.

Zudem war die Anzahl der HUVEC-Podosomen nach der Transfektion von Drebrin-si-RNA dramatisch reduziert. Vereinzelt konnten geringe Ansammlungen von zytosolischem Drebrin beobachtet werden. Demnach verlieren HUVEC nach der Depletion vom Drebrin-Protein die Fähigkeit HUVEC-Podosomen auszubilden, was die zentrale Rolle dieses Protein bei der Regulation und Bildung von diesen Adhäsionsstrukturen untermauert. Als Kontrollen wurde einerseits unbehandelte subkonfluente Zellen und andererseits siRNA gegen Luciferase als unspezifische siRNA für einen möglichen Einfluß der Transfektion *per se* auf die Podosomenbildung eingesetzt. Wie anhand der Werte in Tabelle II deutlich wird, hatte die Transfektion keinen deutlichen Einfluß auf die Bildung von Podosomen in HUVEC.

4.14. Drebrin nimmt eine zentrale Rolle bei der Generierung von HUVEC-Podosomen ein

Über Drebrin ist bekannt, daß es Einfluß auf die Morphogenese wie auch auf Zelladhäsionen und Zell-Zell-Kontakten ausübt (Butkevich *et al.*, 2004; Hayashi *et al.*, 1999; Peitsch *et al.*, 1999).

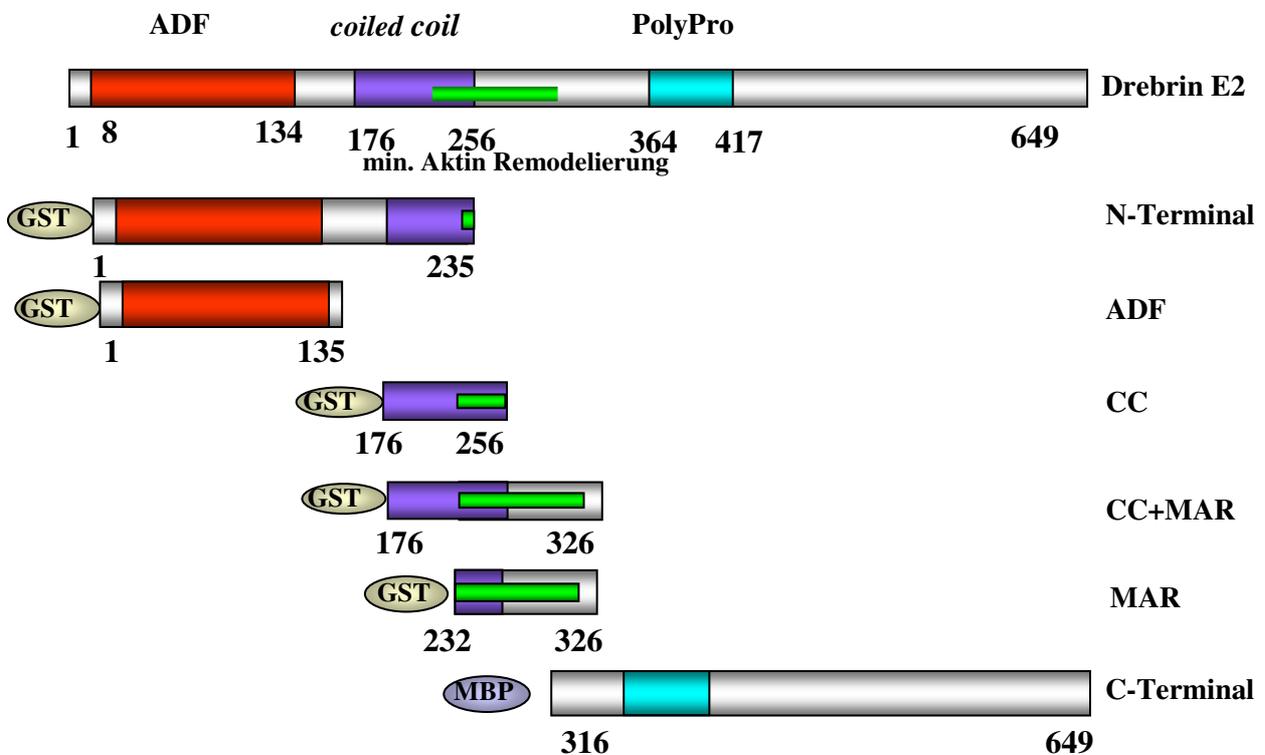


Abbildung 30: Domänenstruktur von DrebrinE2 (Volllänge) und der in dieser Studie konstruierten und verwendeten GST- bzw. MBP-Fusionsproteine. ADF-H *actin depolymerization factor*-homology domain Interagiert mit Aktin, *coiled coil* (blau): Zusammenlagerung mehrerer Sekundärstrukturelemente (α Helices) aneinander, die zu einem oder mehreren Proteinen gehören können und die Bildung von homo- oder

heterooligomerer Proteinkomplexe vermitteln wodurch sie von zentraler Bedeutung für viele zelluläre Prozesse sind und oft zu Dimerisierung führen, *actin remodeling*-Region (grün) und Poly-Pro (hellblau): Polyprolin-reiche Sequenz bindet oft an SH3- und WW-Motive wie Src-Tyrosinkinasen. Die Zahlen in der Abbildung bezeichnen die erste und letzte Aminosäure des Proteins oder des Fusionsproteins bzw. markieren das Ende und den Anfang der einzelnen Domänen.

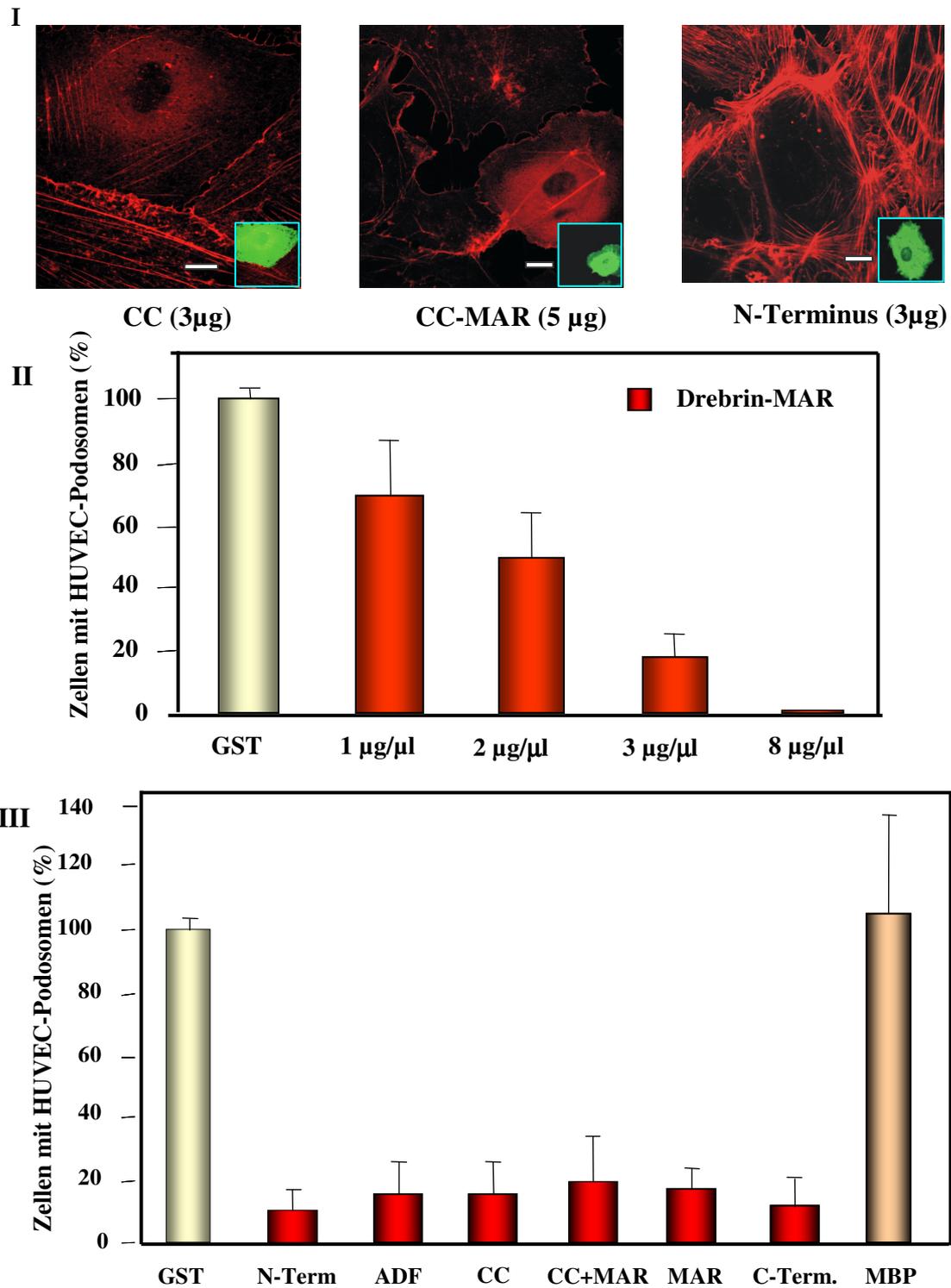


Abbildung 31: Verschiedene Drebrin-Domänen beeinflussen die Bildung von HUVEC-Podosomen. (I) Konfokalmikroskopische Aufnahme von subkonfluenten HUVEC nach der Injektion von GST-Fusionsproteinen wie CC- (3 µg), CC-MAR- (5 µg) N-Term (2 µg). F-Aktin (rot) wurde mit Alexa-568-Phalloidin angefärbt. Insets zeigen injizierte Zellen nach Anfärbung des Injektionsmarkers

(Ratten-IgG/grün). Weißer Balken: 10 μm . (II) Die Graphik zeigt Anzahl der Zellen, die nach Injektion des Drebrin-MAR-GST-Fusionsproteins Dosis-abhängig Podosomen generierten. Die Zahl an Zellen, die nach GST-Mikroinjektion Podosomen ausbildeten wurde auf 100% gesetzt. Die Prozentsätze für die einzelnen Kategorien sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt: 70,36% \pm 17,0% für 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 51,1% \pm 14,4% für 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 17,9% \pm 5,7% für 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und 0,0% \pm 0,0% für 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Für jeden Wert wurden jeweils 6x30 Zellen in drei unabhängigen Versuchsreihen ausgewertet. (III) Die Graphik zeigt die Anzahl der Zellen, die in Abhängigkeit von injizierten Drebrin-Konstrukten Podosomen generierten (3-5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Die Bildung von HUVEC-Podosomen in GST-injizierten Zellen wurde auf 100% gesetzt. Die Prozentsätze für die einzelnen Kategorien sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt: 10,2% \pm 7,9% für N-Terminal, 15,2% \pm 11,6% für ADF, 15,2% \pm 11,6% für CC, 19,7% \pm 15,8% für CC+MAR, 17,9% \pm 5,7% für MAR, 10,9% \pm 10,7% für C-Terminal und 105% \pm 30,0% für MBP-Kontrolle. Für jeden Wert wurden jeweils 6x30 Zellen in drei unabhängigen Versuchsreihen ausgewertet.

Die zentrale Region dieses Proteins ist notwendig für die Bindung an und die Remodulierung des Aktin-Zytoskeletts, jedoch eine darin enthaltene 85 AS lange Sequenz (233-317) reicht dafür schon aus. Die publizierten Daten zeigten, daß die Aktin-Bindungs-Domäne und die Aktin-Remodelierende-Domäne überlappen und sich im zentralen Anteil des Drebrins befinden (Hayashi *et al.*, 1999). Zudem enthält Drebrin eine ADF-H-Domäne (*actin-depolymerizing factor-homology domain*) (Lappalainen *et al.*, 1998). Es wurde aufgrund dessen in die Abp1-Familie von Proteinen eingeordnet, obwohl es im Gegensatz zu den übrigen Mitgliedern nicht über eine C-terminale SH3-Domäne verfügt (Fucini *et al.*, 2002).

Um Auswirkungen des Drebrins auf die HUVEC-Podosomen zu charakterisieren, haben wir die aufgeführten Konstrukte hergestellt (Siehe Abb. 30), die jeweils Teile oder vollständige Domänen des Proteins beinhalten, und sie in subkonfluente HUVEC injiziert. Alle Mikroinjektionsexperimente hatten gemeinsam, daß durch die Einbringung dieser Drebrin-Teilkonstrukte, die Zahl an Zellen reduziert wurde, die HUVEC-Podosomen generiert hat. Dieser Effekt war Dosis-abhängig, wie wir es am Beispiel der Injektion vom MAR-Konstrukt zeigen konnten. Diese Ergebnisse untermauern, daß Drebrin ein zentraler Regulator von HUVEC-Podosomen ist und zeigen desweiteren, daß es diese Funktion durch viele seiner Domänen ausübt.

4.15. Drebrin trägt zur Ausbildung von HUVEC Netzwerken bei

Drebrin fungiert hauptsächlich bei der Modulation des Aktinszytoskeletts und so hat es auch eine zentrale Rolle bei der Zellmotilität. W.Peitsch konnte in ihren Untersuchungen feststellen, eine kritische Konzentration von Drebrin zur Bildung hoch-verzweigter Protrusionen, und damit auch zum migratorischen Verhalten von Zellen, erforderlich ist (Peitsch *et al.*, 1999). Ein Mangel an Drebrin unterdrückt das Aufkommen dieser Phänomene. Weiterhin konnte bewiesen werden, daß Drebrin mit α - und β -Catenin interagieren kann, die Aktin-Mikrofilamente in Zell-Zell-Kontakte verankern. Es gibt eine Colokalisation an *Zonula* und *fasciae adhaerens* und zudem ein Vorkommen einzeln an Zellgrenzen. Möglicherweise liegt deswegen die Funktion von Drebrin u.a. bei dem Zustandekommen von Zell-Zell-Verbindungen (Butkevich *et al.*, 2004; Ikeda *et al.*, 1996; Peitsch *et al.*, 1999; Sasaki *et al.*, 1996).

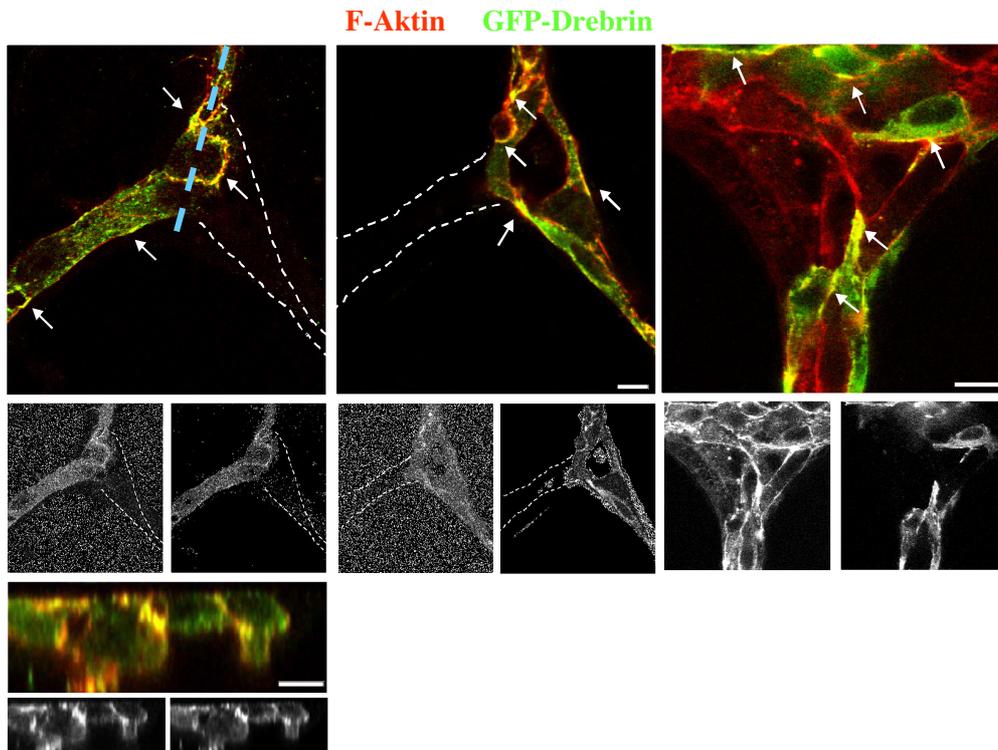


Abbildung 32: Drebrin lokalisiert in kapillaren Netzwerken an den Zell-Grenzen. Konfokalmikroskopische Aufnahme von untransfizierten HUVEC, auf Matrigel kultiviert, gegen F-Aktin (rot) und zelluläres Drebrin (grün) gefärbt wurden (A, B). Dargestellt sind Überlagerungen beider Färbungen und die Kolokalisation in gelb. Wie die weißen gestrichelten Linien verdeutlichen, handelt es sich hierbei um Aufnahmen von zwei Ebenen jeweils eines Verzweigungspunktes. Die blaue gestrichelte Linie in A zeigt die virtuelle Z-Achse für die Schnitte in D. (C) HUVEC wurden mit GFP-Drebrin transfiziert (grün) sowie gegen F-Aktin gefärbt (rot). Kolokalisation dargestellt in gelb. Die Pfeile zeigen die Drebrin-positiven Signale, die an den Zellgrenzen lokalisiert sind. Weißer Balken: 10 μm .

Wie zuvor anhand der von uns durchgeführten Experimente deutlich wurde, sind die HUVEC-Podosomen nicht nur Adhäsionsstrukturen, sondern auch dynamische Strukturen, die oft mit dem Lamellipodium fusionieren und hierbei zu einer erhöhten Bildung von Protrusionen führen (Siehe Punkt 4.5 und 4.6). Es eröffnet zudem eine weitere Möglichkeit, daß Drebrin nämlich auch an der Bildung von Zell-Zell-Kontakten involviert sein könnte. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte diese putative Involvierung von Drebrin bei der Bildung von Zell-Zell-Kontakten erörtert werden (Peitsch *et al.*, 1999). Um diesen Sachverhalt nachzugehen, bedienten wir uns des Matrigels, auf dem HUVEC nach dem Aussäen Zell-Zell-Kontakte und so schließlich verzweigte Netzwerke ausbilden, was ein Model für Angiogenese darstellt. Für alle diese Experimente wurden jeweils 50.000 HUVEC mit Luciferase-, Drebrin-siRNA und pDrebrinE2-eGFP-C1 transfiziert, auf Matrigel ausgesät und nach jeweils einem Tag ausgewertet. Eine semiquantitative Analyse erfolgte anhand digitaler Aufnahmen. Zur Standardisierung wurden die Aufnahmen stets bei gleicher Vergrößerung (20 x) angefertigt. Anschließend wurde dank der erstellten Aufnahmen das Zellbild ausgewertet (ImageJ, Media Cybernetics) und die jeweilige Anzahl von Verzweigungspunkten und Verzweigungen statistisch errechnet (Lakka *et al.*, 2004).

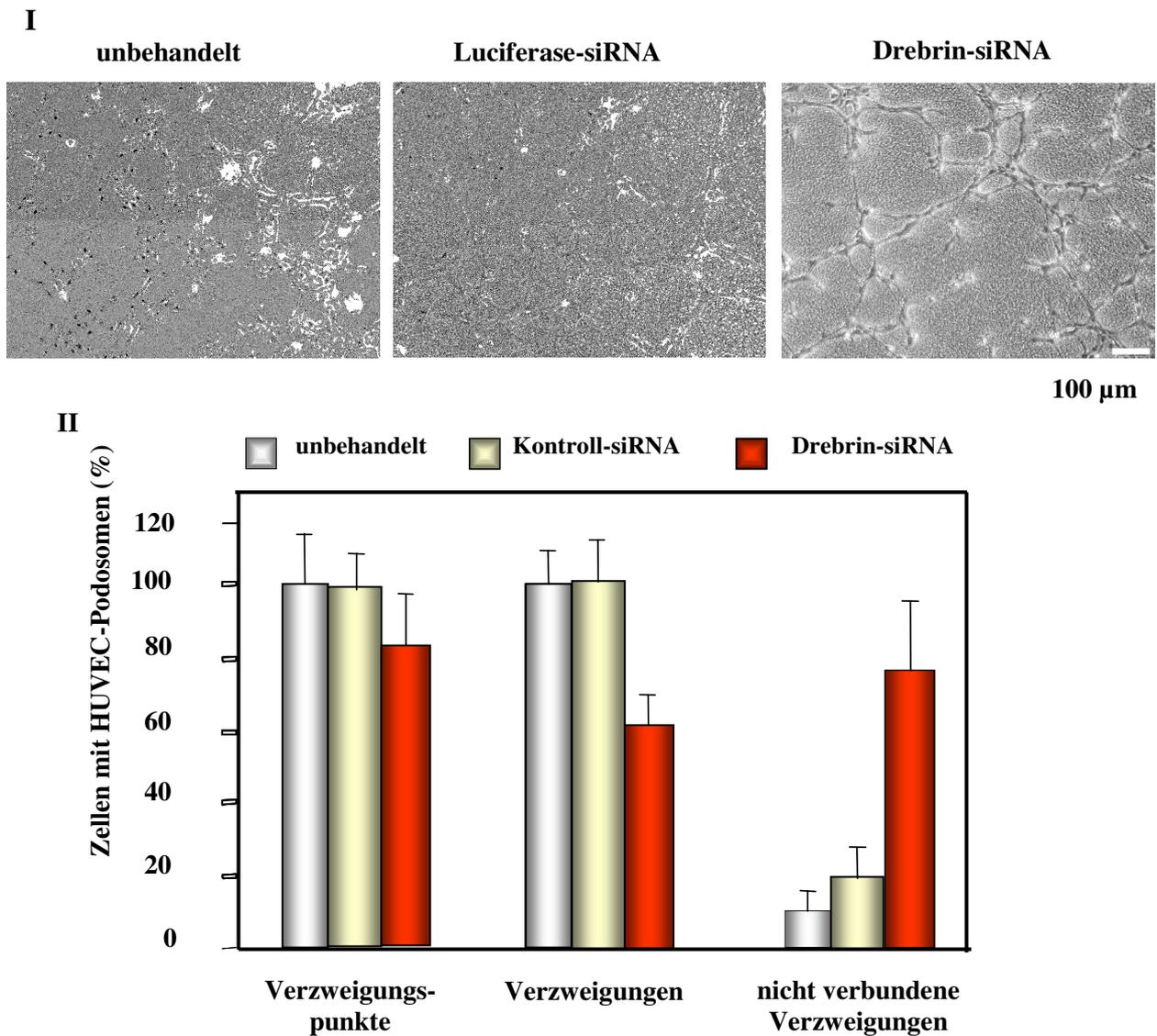


Abbildung 33: Ein Mangel an Drebrin führt zur Reduktion der Netzwerkbildung in HUVEC-Kulturen. (I) Hellfeldaufnahmen von HUVEC nach jeweils einem Tag nach Durchführung des Experiments. Die unbehandelten und mit Luciferase-siRNA transfizierten Zellen dienen als Kontrolle gegenüber der Transfektion der Zellen mit Drebrin-siRNA. Weißer Balken: 10 μ m. (II) Die graphische Darstellung spiegelt die Anzahl der Verzweigungspunkte, der Verzweigungen und nicht erfolgte Verbindungen zwischen Verzweigungen in den neu gebildeten Netzwerken nach der Transfektion der Zellen von Drebrin- oder Luciferase-siRNA bzw. von unbehandelten Zellen.

Drebrin lokalisiert in den verzweigten Zellreihen an F-Aktin-reiche Regionen und an Zell-Zell-Verbindungen (Siehe Abb. 24 und 32). Nach 24h waren mehr als 80% der unbehandelten, subkonfluent ausgesäten HUVEC in Zellreihen organisiert, so daß sich ein Netzwerk aus langgestreckten Einzelzellreihen entwickelte. Dabei entwickelten sich aus den Strängen, die zunächst aus Einzelzellreihen bestanden oft mehrreihige Gebilde. Auch bei den mit Luciferase-siRNA transfizierten Zellen konnte ein vergleichbares Bild beobachtet werden. Nach der Transfektion mit Drebrin-siRNA nahm die Bildung von zellulären Netzwerken deutlich ab. Zudem war die Anzahl der gebildeten Verzweigungen und Verzweigungspunkte im Vergleich zu den Kontrollen dramatisch reduziert (Siehe Abb. 33). Ein Mangel an Drebrin führt demnach zu mangelhafter Bildung zellulärer Netzwerke und legt dessen Rolle in der Angiogenese nahe.

4.16. Bindungspartner des Drebrin-Proteins

Für die weitere Charakterisierung von HUVEC-Podosomen war es wichtig Bindungspartner des zentralen Regulator-Proteins dieser Strukturen, des Drebrins, herauszufinden. Wie die Arbeitsgruppe von W.Peitsch veröffentlichte, kann Drebrin in subkonfluenten Zellen als ein 4S Monomer, in konfluenten Zellen aber auch als 8S Dimer, detektiert werden. Trimere und Oligomere von Drebrin lagen hier in der 13S und vereinzelt in der 20S Form vor. In all diesen Arrangements zeigte Drebrin jedoch keine Komplexierung mit anderen Proteinen (Peitsch *et al.*, 1999 und 2001). Um herauszufinden mit welchen Proteinen Drebrin außer mit F-Aktin oder sich selbst interagieren kann, wurden weitere Analysen mit Drebrin-Domänen-Teilkonstrukten durchgeführt. Anhand der Sequenzen dieser Regionen wurde offensichtlich, daß Drebrin viele putative Protein-Interaktionsdomänen enthält, die alle in die Regulation der HUVEC-Podosomen eingreifen können (Siehe 4. 14 und 1.10). Um mögliche Interaktionen zu detektieren, wurden mit allen Konstrukten IPs (Immunoprecipitation) und *pull down assays* gegen Proteine durchgeführt, die Komponenten von HUVEC-Podosomen darstellen (Tabelle 13). Zusätzlich wurden nach Überexpression von GFP-gelabeltem Drebrin GFP-IPs durchgeführt und anschließend Banden ausgewählt, die eventuell Proteine darstellen könnten, die mit Drebrin interagieren könnten mit Hilfe von MALDI-TOF identifiziert. Wir konnten jedoch keinen Interaktionspartner für Drebrin nachweisen. Zur Identifizierung von Proteinen, die mit Drebrin interagieren können, sind weiterführende Versuche nötig, die Gegenstand zukünftiger Experimente sein werden.

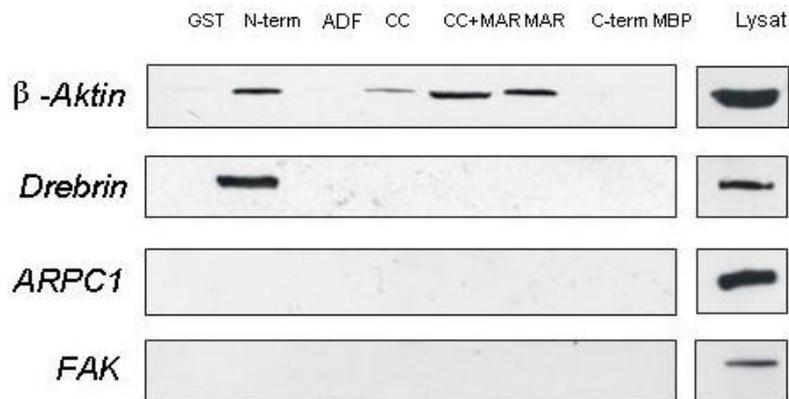


Abbildung 34: Interaktionen von Proteinen mit den Drebrin-Domänenteilkonstrukten. Western blots von GST- und MBP- (für C-term Konstrukt) *pull down assays*. Erste Spur von rechts: GST-Kontrolle, anschließend die Drebrin-Domänen-Teilkonstrukte: N-term, ADF, CC, CC+MAR, MAR, C-term, die zweite Spur von rechts: MBP-Kontrolle und das HUVEC-Lysat. Die Antikörperspezifität ist links angezeigt.

Bei den von uns angefertigten Experimenten konnten wir jedoch zeigen, daß das N-terminale-, CC-, CC+MAR- und MAR-Konstrukt Aktin aus dem HUVEC-Lysat pelletieren. Weiterhin bindet das C-terminale Konstrukt zelluläres Drebrin, was auf die Fähigkeit dieser Domäne verweist Oligomerisation zu induzieren. So scheint es, daß die hauptsächlichen Bindungspartner des Drebrin Aktin und Drebrin selbst darstellen.

5. Diskussion

5.1. Migratorische humane Nabelschnurendothelzellen bilden podosomale Adhäsionsstrukturen

Bisherige Forschungsergebnisse dokumentieren, daß in einigen Zelltypen, wie den dendritischen Zellen und Makrophagen, die Anheftung an ein gegebenes Substrat über aktinreiche Strukturen, die Podosomen, erfolgt (Lehto *et al.*, 1982; Linder *et al.*, 1999; Burns *et al.*, 2001). Zu unterscheiden sind diese von anderen Adhäsionsstrukturen vor allem durch Komponenten, wie den Aktin-regulatorischen Proteinen N-WASP und Arp2/3-Komplex (Tarone *et al.*, 1985; Marchisio *et al.*, 1987), eine hohe Dynamik, Unabhängigkeit von der *de novo*-Proteinbiosynthese und eine zentrale Rolle bei der Modifizierung der ECM. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde in primären humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) eine neue Podosomen-ähnliche Struktur entdeckt und näher charakterisiert. Es ist uns in diesem Zusammenhang gelungen zu zeigen, daß auch primäre humane Nabelschnurendothelzellen in der Lage sind, Aktin-reiche Adhäsionsstrukturen, im folgenden HUVEC-Podosomen genannt, zu bilden.

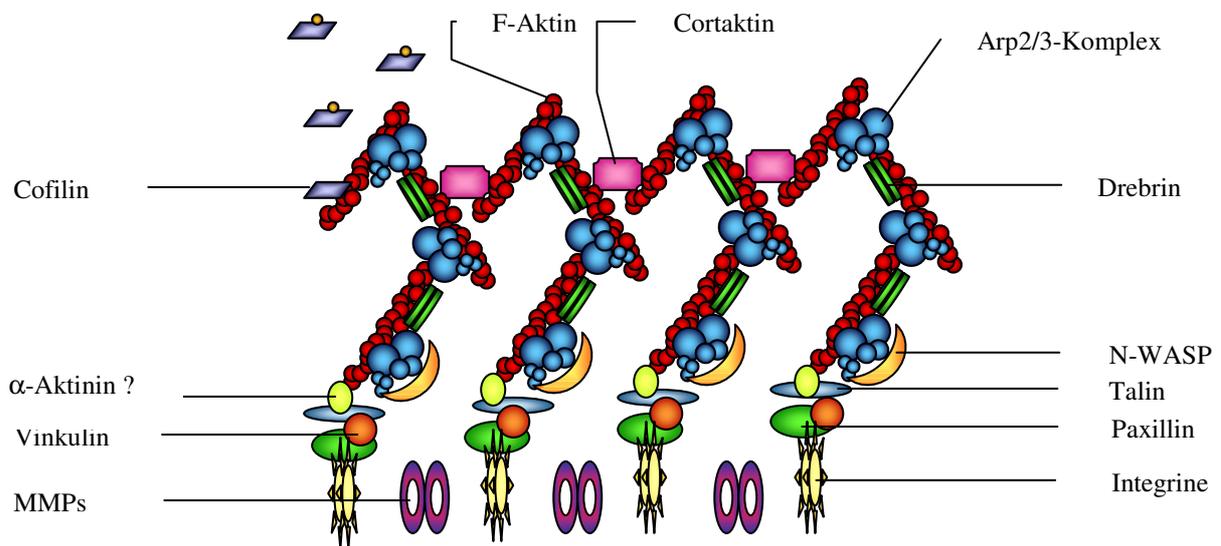


Abbildung 35: Modell der Architektur von HUVEC-Podosomen. Die Graphik liefert eine putative Darstellung eines HUVEC-Podosoms im Querschnitt senkrecht zum Substrat. Die Integrine vermitteln die Bindung an die ECM, während Adhäsionsmediatoren wie Paxillin, Talin und Vinkulin den unteren Teil der HUVEC-Podosomen darstellen. Hier liegen auch die MMPs, die eine definierte ECM-Degradation regulieren. Der obere Teil enthält Cortaktin, kurze Aktinfilamente, nukleiert durch N-WASP und Arp2/3-Komplex, und ist wohl durch Proteine wie α -Aktinin mit der unteren Schicht verbunden. Drebrin liegt höchstwahrscheinlich in oligomerer Form vor und ist an F-Aktin gebunden.

Wie wir anhand von Immunfluoreszenzfärbungen gegen diverse Proteine, wie auch durch Transfektionen mit GFP- und mRFP-markierten Protein-Konstrukten, nachweisen konnten, sind neben F-Aktin auch Aktinregulatoren wie N-WASP, Arp2/3-Komplex, Cortaktin und Cofilin Komponenten der von uns beschriebenen HUVEC-Podosomen. Desweiteren sind aber auch Adhäsionsmediatoren, wie Integrine, Paxillin und Vinkulin, Kinasen und MMPs als Bausteine dieser Strukturen von uns nachgewiesen worden. All diese Proteine sind auch Komponenten von monozytären Podosomen (Tarone *et al.*, 1985).

Die Zusammensetzung (Tabelle 13) dieser von uns entdeckten Struktur erinnert, wie bereits dargelegt, stark an die von Podosomen in Monozyten oder von Invadopodien in transformierten

Fibroblasten (Linder und Aepfelbacher 2003; Buccione *et al.*, 2004). Aus diesem Grunde wurden die vorgefundenen Proteinkonformationen in HUVEC von uns auch als HUVEC-Podosomen bezeichnet. Nichtsdestotrotz bestehen jedoch auch Unterschiede zu klassischen Podosomen, die vor allem in der Architektur begründet sind. Die Podosomen der Monozyten haben eine charakteristische Kernstruktur aus F-Aktin mit einem sie umgebenden Ring, der Adhäsionsmoleküle wie Vinkulin, Paxillin und Talin beinhaltet (Tarone *et al.*, 1985; Zambonin-Zallone *et al.*, 1989; Linder *et al.*, 2003). Ring und Kern sind untereinander durch Moleküle wie α -Aktinin verbunden. Der Aufbau der HUVEC-Podosomen hingegen zeigt eine zweischichtige Architektur (Siehe Abbildung 4.3.). Die untere, dem Substrat näher anliegende Schicht, enthält Adhäsionsmediatoren wie Paxillin, Talin und Vinkulin. Integrine führen möglicherweise zur Bildung von Komplexen, die aus c-Src, FAK und Paxillin bestehen. Paxillin verbindet höchstwahrscheinlich Integrine, die die Adhäsion mit Aktin-assoziierten Molekülen wie Tyrosinkinase und Vinkulin vermitteln. Wiederum vermag aber gerade Vinkulin an weitere Komponenten der HUVEC-Podosomen wie Talin zu binden. Aktin-Filamente, nukleiert durch N-WASP und den Arp2/3-Komplex, werden wohl durch Moleküle wie möglicherweise Cortactin verbunden und liegen in der oberen Schicht dieser Struktur.

Daneben teilen HUVEC-Podosomen aber charakteristische Merkmale mit anderen zellulären Aktin-reichen Strukturen, wie den Aktin-*fins* in Fibroblasten, die auch Arp2/3-Komplex als Komponente enthalten (Schafer *et al.*, 1998). Daraufhin mußten wir die Frage klären, ob die von uns entdeckten Podosomen tatsächlich Adhäsionsstrukturen darstellen. Hierzu analysierten wir die HUVEC nach Immunfluoreszenzfärbung und Transfektion mit Hilfe von Serien von xz- und xy-Schnitten am konfokalen Mikroskop sowie auch der TIRF-Mikroskopie (Detektion von Strukturen mit einem Abstand von < 120 nm zum Substrat). Die HUVEC-Podosomen lokalisieren, wie unsere Analysen belegen, ventral, an dem Substrat-anhaftenden Teil der Zelle. Im Gegensatz zu den von uns entdeckten HUVEC-Podosomen werden *fins* nicht ventral sondern apikal generiert. Weiterhin unterbleibt ihre Bildung, wenn die Fibroblasten den migratorischen Phänotypen ausbilden. Bei HUVEC-Podosomen erfolgt deren Bildung jedoch erst in diesem Stadium. Mit diesen Experimenten konnten wir die von uns entdeckte Struktur von anderen F-Aktin-reichen zellulären Strukturen abgrenzen. Vor allem gelang uns aber so der deutliche Beweis, daß es sich bei den HUVEC-Podosomen tatsächlich um Adhäsionsstrukturen handelt.

Wir konnten zuerst an fixierten Präparaten und später auch bei *live-cell-imaging*-Experimenten beobachten, daß einzelne HUVEC-Podosomen die Tendenz haben zu Superstrukturen, den Rosetten, zu fusionieren. Wir bezeichneten diese Superstrukturen als Rosetten in Anlehnung an die in Osteoklasten beobachteten Formierungen (Akisaka *et al.*, 2001). Neben dem allgemeinen Aufbau ist so die Größe und Anzahl zwischen den podosomal Strukturen der HUVEC und Monozyten unterschiedlicher Natur. Dementsprechend haben zwar klassische Podosomen, wie auch die in HUVEC gebildeten Podosomen, einen Durchmesser von $0,5 - 1 \mu\text{m}$ (Destaing *et al.*, 2003), jedoch liegt dieser bei den HUVEC-Podosomen nach der Fusion zu Rosetten, bei bis zu $20 \mu\text{m}$. Weiterhin liegt ein Unterschied in der Anzahl der generierten Adhäsionsstrukturen pro Zelle und einem gegebenen Zeitrahmen vor. So können in den Monozyten oft zwischen 50 - 100 Podosomen beobachtet werden, während in den HUVEC auch die gleiche Anzahl gebildet wird, jedoch nie mehr als fünf der Superstrukturen, detektiert werden konnten.

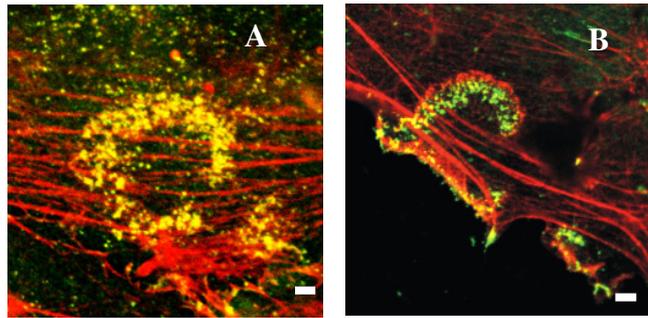


Abbildung 36: HUVEC-Podosomen fusionieren zu Superstrukturen, den Rosetten. Konfokalmikroskopische Aufnahme von HUVEC nach Immunfluoreszenzfärbung gegen F-Aktin (rot) und Drebrin (grün). Überlagerung ist in gelb dargestellt. Gezeigt sind die durch Fusion von HUVEC-Podosomen gebildeten Rosetten, die hier nicht mehr vollständig geschlossen sind. Der weiße Balken zeigt 10 µm an.

Wie aus unseren Untersuchungen unter Gebrauch von *live cell imaging* und konfokalen Immunfluoreszenzaufnahmen hervorgeht, können HUVEC-Podosomen in konfluenten Kulturen von Nabelschnurendothelzellen in einer geringen Anzahl beobachtet werden. Hier bilden ca 1% aller Zellen diese Strukturen aus. Die Anzahl der Zellen, die HUVEC-Podosomen generieren können, wurde jedoch auf einen Wert von über 30% gesteigert, nachdem wir die Zellen unter subkonfluenten Bedingungen untersuchten. Auch nach der Durchführung eines *wund-assays* sind mehr als 30% der HUVEC in der Lage, diese Strukturen bis zur fünften Zellreihe vom künstlich erzeugten Wundrand her zu generieren. Zudem werden HUVEC-Podosomen hauptsächlich am Leitsaum einer Zelle beobachtet. Anhand dieser Ergebnisse wurde deutlich, daß HUVEC-Podosomen für den migratorischen Phänotyp charakteristisch sind. Im Vergleich zu den kürzlich in porcinen Aortenendothelzellen durch Überexpression von konstitutiv aktivem Cdc42V12 induzierten podosomal Strukturen (Moreau *et al.*, 2003), werden die von uns beschriebenen HUVEC-Podosomen auch ohne jegliche Induktoren in gänzlich unbehandelten, migratorischen HUVEC generiert. Wie wir aber in weiterem Verlauf der Analysen zeigen konnten, kann die Anzahl an Zellen, die HUVEC-Podosomen generieren durch Zugabe von Zytokinen gesteigert werden (Siehe Punkt 4.3.).

Die Bildung von HUVEC-Podosomen ist im Gegensatz zu klassischen Podosomen auf die *de novo* Proteinsynthese angewiesen, wie dies unsere Experimente unter Verwendung von Cycloheximid zeigen. Nach Inhibierung der Proteinbiosynthese kommt es zur dramatischen Depletion der Anzahl von Zellen, die HUVEC-Podosomen ausbilden können. Dieses Ergebnis konnten wir auch mit den unter serumdeprivierten Bedingungen kultivierten HUVEC bestätigen. Das deutet darauf hin, daß extrazellulären Schlüsselsignale und eine intakte Proteinbiosynthese einen entscheidenden Einfluß auf die Bildung von Podosomen in HUVEC haben. Weitere Analysen befaßten sich darauf hin mit der Klärung der Frage, um welche Signalmoleküle es sich dabei handeln könnte, und wie sie im Einzelnen auf HUVEC-Podosomen wirken.

5.2. HUVEC-Podosomen fungieren als Adhäsionsstrukturen, die Orte einer lokalen Matrixdegradierung darstellen

Die den Endothelzellen zugrundeliegenden Mechanismen der Adhäsion und Matrixdegradierung sind von Bedeutung bei der Angiogenese und der Wundheilung. Diese beiden Aktivitäten werden daher strikt räumlich und zeitlich reguliert und benötigen die Aktivität zahlreicher Proteine wie z B. der MMPs. Es ist uns gelungen MMPs wie MMP-1, -2 und MT1-MMP, als Komponenten von HUVEC-Podosomen nachzuweisen (Tabelle 13). MMPs stellen eine Familie von Zn^{2+} -abhängigen Endoproteasen dar, die eine zentrale Rolle während der Invasion bei physiologischen

und pathologischen Prozessen ausüben, wie auch der Morphogenese, Differenzierung, Zellmigration, Apoptose, Gewebereparatur und Neo-Angiogenese. Die weite Substratspezifität, die von der Remodellierung der Komponenten der ECM, der Zytokine bis zu anderen Proteinkinasen reicht, macht die MMPs zum multifunktionellen Werkzeug der gegebenen Zellen. Diese Funktion üben sie durch Degradierung von Komponenten der ECM, aber auch der Proteine von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen aus (Redondo-Munoz *et al.*, 2000).

Im Verlauf dieser Dissertation konnten wir mit Hilfe von FITC-markiertem Fibronectin zeigen, daß HUVEC-Podosomen Stellen lokalisierter Degradierung der extrazellulären Matrix darstellen. HUVEC-Podosomen kolokalisieren mit Bereichen des Abbaus der ECM und hinterlassen Löcher, die hinsichtlich der Größe und Form mit den entsprechenden podosomal Strukturen übereinstimmen. Da MMPs Komponenten der HUVEC-Podosomen darstellen und in Zellen Degradierung der extrazellulären Matrix induzieren, könnten sie auch bei dieser Struktur zu diesem Vorgang beitragen, wie schon im Zusammenhang mit Invadopodien gezeigt wurde (Nakahara *et al.*, 1997). So verfügen HUVEC-Podosomen, wie die klassischen Podosomen (Linder *et al.*, 2003), über migratorisches und invasives Potential. Zum einen können die Zellen dank diesen Strukturen an die sie umgebende Matrix adhären, was deren stabile Positionierung bedingen würde, zum anderen können sie durch die zyklische Generierung und Auflösung dieser Adhäsionsstrukturen die Migration auslösen (Genersch *et al.*, 2000).

MT1-MMP ist z. B. in die Anreicherung und Aktivität von weiteren MMPs in zelluläre Strukturen, so auch womöglich in den HUVEC-Podosomen, involviert. So bedingt die Aktivierung von MT1-MMP durch inflammatorische Mediatoren wie TNF- α in einer proteolytischen Kaskade die Aktivierung von MMP-2 (Will *et al.*, 1996). Solche Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Signalwegen von MMPs und Zytokinen, könnten HUVEC-Podosomen eine Art Autonomie hinsichtlich ihrer Funktionalität vorweisen. Daher können HUVEC-Podosomen, die Proteine wie die MMPs beinhalten, weitere Kaskaden induzieren (wie z.B. MT1-MMP, das MMP-2 aktivieren kann), die die Funktion von diesen podosomal Adhäsionsstrukturen modulieren und diese sogar verstärken könnten, da immer mehr Moleküle dieser Kaskaden durch die *downstream*-liegenden Signalproteine aktiviert werden (Parks W. *et al.*, 2004; Seiki M. *et al.*, 2003). Das bedeutet wiederum, daß extrazelluläre Signale die Menge der eingebauten Komponenten und dadurch das Ausmaß ihrer Aktivität beeinflussen könnten. Hierdurch würden sie dann wiederum durch HUVEC-Podosomen regulatorisch auf das Zellgeschehen einwirken.

5.3. Zytokine und Monozyten stimulieren die Bildung von HUVEC-Podosomen

Angiogenese und Inflammation sind invasive und proliferative Prozesse, bei welchen die koordinierte Aktivierung von Endothelzellen durch inflammatorische Zytokine wie IL-1 β , TNF- α , INF- γ und angiogene Wachstumsfaktoren, wie bFGF und VEGF, erfolgt und zur Bildung neuer Gefäße, wie auch zur Extravasation von Leukozyten ins Gewebe führt. MMPs können hierbei die Funktion der Endothelzellen direkt und indirekt durch die Aktivierung von Zytokinen regulieren, indem sie nämlich membrangebundene Zielproteine, matrixgebundene Wachstumsfaktoren oder die Generierung bioaktiver Neopeptide induzieren (Jeong *et al.*, 1999). Insbesondere sind bei diesen Phänomenen die Migration der Endothelzellen und ihr invasives Verhalten, bedingt durch MMPs, von größter Bedeutung.

In unseren Experimenten konnten wir demonstrieren, daß nach Serumdeprivierung von subkonfluenten HUVEC eine dramatische Reduktion in der Anzahl von Zellen beobachtet werden kann, die Podosomen herstellen können. Dies weist auf einen starken Einfluß von im Serum enthaltenen Komponenten als Signalquellen zur Induktion der Bildung von HUVEC-Podosomen hin. Da es sich bei diesen Signalquellen eventuell um Zytokine handeln könnte, haben wir deren Einfluß auf die HUVEC-Podosomen getestet.

Nach Zugabe von Zytokinen zu konfluenten Zellen kommt es zu keinem Anstieg der Generierung von HUVEC-Podosomen. Jedoch erfolgt bei der Zugabe von Zytokinen, wie TNF- α und VEGF, zu serumdeprivierten, subkonfluenten HUVEC, eine dynamische (5 min nach Zugabe) Ausbildung dieser Adhäsionsstrukturen in einer höheren Anzahl (subkonfluent $10,6\% \pm 3,9\%$ im Vergleich zu $41,1\% \pm 6,8\%$ nach Zytokinzugabe). Hieraus wird deutlich, daß die Induktion der HUVEC-Podosomen durch die Signalkaskade der Zytokine reguliert wird. Weiterhin konnten wir nach Zugabe geringer Konzentration von Zytokinen zu subkonfluenten Zellen eine reduzierte Anzahl von Podosomen beobachten. Hingegen wurde bei Gabe einer erhöhten Konzentration desselben Zytokins, eine dramatisch erhöhte Anzahl an Zellen wahrgenommen, die HUVEC-Podosomen ausbilden konnten. Die Bildung von HUVEC-Podosomen bei der Zugabe von Zytokinen weist demnach eine Dosis-Abhängigkeit auf.

Auch wurde anhand unserer Experimente ersichtlich, daß nach Zugabe von Zytokinen zuerst eine schnelle Generierung von HUVEC-Podosomen induziert und nach einiger Zeit die Anzahl dieser Strukturen reduziert wird. Die Werte, die hierbei beobachtet werden können, sinken in Bereiche, die den Grundwerten von HUVEC mit podosomal Strukturen entsprechen, die in serumdepriviertem Medium kultiviert wurden. Dies stellt einen interessanten Unterschied zu den kontinuierlich generierten Podosomen in HUVEC mit serumhaltigem Medium dar. Die Anzahl von Zellen, die Podosomen generieren bleibt hier annähernd konstant. Eine mögliche Erklärung dieser Phänomene ist, daß Zytokine nur transient die Podosomen-induzierbaren Signalwege aktivieren könnten. Eine andere Möglichkeit ist, daß Zytokine Kaskaden aktivieren, die letztlich zur Reduktion der Anzahl an Zellen, die HUVEC-Podosomen beinhalten, führen. Solch ein negativer Regelkreis in Endothelzellen ist bekannt, denn VEGF kann hier einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom induzieren (Cross *et al.*, 2003). Durch eine hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wird jedoch die Bildung von podosomal Strukturen inhibiert (Teti *et al.*, 1989). In serumhaltigem Medium hingegen könnten auch andere Faktoren sicherstellen, daß die inhibitorischen Wege nicht aktiviert werden oder daß diesen Effekten auf HUVEC-Podosomen entgegengearbeitet wird.

So konnten wir im Rahmen dieser Arbeit zeigen, daß die Bildung von podosomal Strukturen in subkonfluenten HUVEC stark von dem Einfluß der Zytokine abhängt und daß diese sowohl notwendig, als auch ausreichend sind, um HUVEC-Podosomenbildung zu induzieren. Dies zeigt eine klare Übereinstimmung mit der Tatsache, daß Zytokine auch über die Fähigkeit verfügen Aktinreorganisation in HUVEC zu induzieren. VEGF beeinflusst durch Aktivierung der Src-Kinase die Migration der HUVEC, aber auch die Phosphorylierung und Aktivierung von deren Substraten wie FAK aber auch Paxillin. Dies stimmt mit der von uns nachgewiesenen generellen Abhängigkeit der Podosomen von den Src-Kinasen überein, da bei der Zugabe von PP2 die Anzahl der HUVEC-Podosomen stark reduziert wird. All die soeben erwähnten Proteine stellen integrale Komponenten von Podosomen dar und so putative Ziele von VEGF involvierten-Signalkaskaden bei der Regulation und Generierung von HUVEC-Podosomen.

Diverse hämatopoetische Zellen, wie Monozyten und Thrombozyten, kontaktieren Endothelzellen. In der Tat hat die Interaktion der HUVEC mit beiden Zelltypen in zahlreichen Experimenten gezeigt, daß sie zu Morphogenese des Zytoskeletts oder verstärkter Matrixdegradierung führen (Iwaki *et al.*, 1997). Wie in unseren Experimenten deutlich wird, stimuliert die Co-Kultur von Monozyten mit subkonfluenten HUVEC die Bildung von HUVEC-Podosomen (Bildung erhöht auf $23,9\% \pm 4,5\%$ im Vergleich zu Kontrolle $10,6\% \pm 3,9\%$). Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die wir nach Zugabe von Monozyten erhielten, verändert eine Co-Kultivierung von subkonfluenten HUVEC mit Thrombozyten nicht den Grad an Zellen, die HUVEC-Podosomen generieren können. Auch durch eine kombinierte Gabe von Zytokinen und Thrombozyten oder Monozyten zu den subkonfluenten HUVEC konnte die Anzahl an HUVEC, die Podosomen generieren, nicht gesteigert werden. Eine zu hohe Menge an zugegebenen Monozyten bzw. Thrombozyten, wie auch eine zu lange Co-Kultivierungszeit (ab 12 h), führten zur Schädigung des Aktinzytoskeletts und einer Störung bei der Kontraktion und Adhäsion der HUVEC. Die Steigerung der Anzahl an generierten podosomal Strukturen könnte zu einem

dadurch bedingt sein, daß Monozyten Wachstumsfaktoren sezernieren und deren Expression steigern, z.B.: TNF- α , und diese, wie schon in unseren vorherigen Experimenten gezeigt, die Bildung von HUVEC-Podosomen induzieren. Andererseits könnten Monozyten spezifische Rezeptoren auf ihren Oberflächen tragen, die einmal an HUVEC gebunden, Signalkaskaden auslösen, die zu einer erhöhten Bildung von HUVEC-Podosomen führen. Eine Interaktion von aktivierten Thrombozyten mit HUVEC induziert normalerweise die Expression und/oder Sezernierung von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und führt zur Erhöhung der chemotaktischen und adhäsiven endothelialen Aktivität (May *et al.*, 2002). Es wurde jedoch keine Steigerung bei der Bildung von HUVEC-Podosomen beobachtet. Dies könnte daran liegen, daß wir nicht das optimale Verhältnis der jeweiligen Zellen zueinander fanden bzw. die experimentellen Gegebenheiten insgesamt weiter optimiert werden müßten.

Dadurch daß HUVEC-Podosomen in subkonfluenten Zellen schon eine Stunde nach dem Aussäen bzw. in verwundeten Zellschichten, aber vor allem nach der Zugabe von Zytokinen (5 min) und Monozyten (15 min), generiert werden, handelt es sich bei der Bildung dieser Adhäsionsstrukturen, um einen Mechanismus, der schnell induziert werden kann. Dies würde es Endothelzellen ermöglichen, bei Verletzungen sofort zu reagieren und so die Homöostase des Organismus zu wahren. Zudem deutet die Involvierung der Monozyten als Donor von Signalen (z.B. Zytokine), die die Bildung von HUVEC-Podosomen induzieren, darauf hin, daß diese Strukturen in gleichen Bereichen wie auch die Monozyten ihre Funktion erfüllen könnten. Monozyten spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungen und Wundheilung, somit könnten auch die von ihnen regulierten HUVEC-Podosomen in diese Prozesse involviert sein. Anhand der von uns durchgeführten Wundheilungsversuche, bei denen Zytokine hinzugegeben wurden, können wir hierzu unterstützend zeigen, daß diese eine gesteigerte Bildung dieser Adhäsionen induzieren, aber auch, daß der Wundverschluß in der Hälfte der sonst verzeichneten Zeit abgeschlossen ist (Siehe Punkt 4.10.).

Einem Modell zufolge beeinflussen MMPs die Aktivität verschiedener Zytokine, wie VEGF, EGF, TGF- α , positiv bzw. negativ. Daraufhin üben die Zytokine bei der Inflammation und bei Reparaturprozessen eine aktivierende bzw. hemmende Funktion aus. Zudem können Zytokine *vice versa* Einfluß auf die Funktion und Expression der MMPs ausüben (Parks *et al.*, 2004). Damit erfüllen MMPs wie auch die Zytokine eine duale Rolle bei der inflammatorischen Aktivität. Die duale Rolle beider Proteinfamilien, aber auch die Wechselwirkungen zwischen ihren Signalwegen, könnten den anfänglichen Schub bei der Generierung von HUVEC-Podosomen nach Zugabe von Zytokinen und dessen anschließenden Rückgang erklären. Auf unsere Ergebnisse übertragen bedeutet dies, daß wir durch die Zugabe von Zytokinen eine erhöhte Expression und Sezernierung von MMPs beobachten müßten, was noch gezeigt werden muß. Diese würde dann verstärkt zur Migration und Matrixdegradierung beitragen, was wir anhand unserer Ergebnisse belegen können. Wie bereits erwähnt kommt es aufgrund dessen zur Generierung einer höheren Anzahl von HUVEC-Podosomen pro Zelle. Andererseits müßten genau diese von den Zytokinen ausgehenden Impulse über eine lange Zeit, bzw. die Zugabe von Zytokinen in einer höheren Konzentration das Gegenteil hervorrufen und die Zellen in einem Apoptose-nahen Zustand treiben. Dies können wir dann auch tatsächlich beobachten. Eine starke Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts bis zu seiner Zerstörung war die erste Veränderung während des Absterbens der gegebenen Zelle, die wir dokumentieren konnten. Die Zellen waren zudem stark kontrahiert und verloren die Anheftung zum Substrat. Interessanterweise berichten andere Arbeitsgruppen, daß sowohl der Entzug (TNF) wie auch die Zugabe (IL-4) von bestimmten Zytokinen oder auch eine Überdosierung dieser, die Induktion von Apoptose vermitteln (Schmidt *et al.*, 2000). Diese Untersuchungen untermauern somit unsere Ergebnisse.

5.4. RhoGTPasen kontrollieren die Bildung von HUVEC-Podosomen

Podosomen können in porcinen Aortenendothelzellen durch Überexpression von konstitutiv aktiven Cdc42^{V12} induziert werden (Moreau *et al.*, 2003). Im Rahmen dieser Dissertation können wir darlegen, daß auch unbehandelte (migratorische) humane Endothelzellen in der Lage sind, konstitutiv Podosomen *downstream* von den Signalkaskaden der Zytokine und RhoGTPasen zu generieren.

Die Behandlung der HUVEC mit CNF-1 (zytotoxischer Nekrosefaktor), aus *E.coli*, der Rho, Rac und CDC42 aktiviert, zeigte die generelle Bedeutung der RhoGTPasen bei der Generierung von HUVEC-Podosomen. Die mit CNF-1 behandelten HUVEC erhöhen die Formation von Protrusionen und Streßfasern, erniedrigen jedoch parallel dazu die Anzahl der ausgebildeten HUVEC-Podosomen. Demnach belegen unsere Untersuchungen, daß RhoGTPasen entscheidend an der Regulation/Entstehung dieser Adhäsionsstrukturen beteiligt sind.

Um den Einfluß der einzelnen RhoGTPasen bei der Generierung von HUVEC-Podosomen exakter zu analysieren, wurden subkonfluente HUVEC mit GST-Fusionsproteinen von entweder konstitutiv aktivem RhoA^{V14}, Rac1^{V12}, CDC42^{V12} oder inaktivem Rac1^{N17}, Cdc42^{N17} mikroinjiziert oder mit C3-Transferase aus *E.coli*, einem Inhibitor der Rho-Aktivität, inkubiert. Die von uns durchgeführten Mikroinjektionsversuche von spezifischen GTPase-Mutanten ergaben, daß sowohl Aktivierung als auch Inaktivierung jeder untersuchten RhoGTPase die Bildung von Podosomen beeinflusst. Die Bildung von HUVEC-Podosomen ist daher von der balancierten Aktivität von Rho, Rac1 und Cdc42 abhängig. Die Mikroinjektion dieser GTPase-Mutanten führt wahrscheinlich zum Verlust der zeitlich und räumlich lokalisierten Information von Aktivierung und Inaktivierung der jeweiligen GTPasen und so zu einer Inbalance des GTPase-Zyklus. Diese Inbalance führt schlußendlich zu einem Unvermögen der so behandelten Zellen, weitere HUVEC-Podosomen ausbilden zu können.

In Übereinstimmung mit unseren hier dargelegten Ergebnissen konnte auch Chellaiah *et al.* bereits im Jahr 2000 feststellen, daß GTPasen wie Cdc42, Rho und Rac bei der Podosomenregulation entscheidend beteiligt sind. Oft bedingt eine Überexpression vom dominant aktiven Cdc42^{V12} eine erhöhte Bildung von Podosomen der Aortenendothelzellen oder HeLa-Zellen. Jedoch verhalten sich Podosomen der Monozyten und HUVEC-Podosomen abweichend von diesen Ergebnissen. So konnten wir zeigen, daß Agenzien wie CNF-1 oder Cdc42^{V12}, die in anderen Zellsystemen Podosomen induzieren, zu einer abnehmenden Menge an generierten HUVEC-Podosomen führen (Moreau *et al.*, 2003). RhoGTPasen wie Cdc42, Rho und Rac sind für den Podosomenumsatz nötig, wobei sie in verschiedenen Zelltypen einen unterschiedlichen Einfluß auf diesen haben. So hängt die Bildung von Podosomen in porcinen Aortenendothelzellen von der Aktivierung von Cdc42 und Inaktivierung von Rho ab (Moreau *et al.*, 2003). In HUVEC konnten wir jedoch zeigen, daß sowohl Cdc42 als auch Rho und Rac an der Generierung dieser Strukturen beteiligt sind. Zudem wurde beschrieben, daß in porcinen Aortenendothelzellen Rac nicht *downstream* von Cdc42 wirkt, während dies in HUVEC der Fall ist (Andor *et al.*, 2001). Endotheliale Zellen in verschiedenen Gefäßen vermögen variierende Kaskaden zu induzieren um RhoGTPasen zu aktivieren, wodurch eine unterschiedliche Abhängigkeit der podosomalen Strukturen von individuellen RhoGTPasen beobachtet werden kann. Es läßt sich jedoch ein allgemeines Fazit ziehen, daß HUVEC-Podosomen von einem strikt geregelten und balancierten Level an RhoGTPasen abhängig sind.

Eine Möglichkeit, wie die RhoGTPasen ihren Einfluß auf die Entwicklung von HUVEC-Podosomen ausüben könnten, ist in den aktinregulatorischen Signalkaskaden begründet. Die von uns durchgeführten konfokalmikroskopischen und *live cell imaging* Untersuchungen zeigen, daß N-WASP und der Arp2/3-Komplex in den von uns entdeckten HUVEC-Podosomen lokalisiert sind. Aufgrund dieser Komponenten könnten RhoGTPasen ihren Einfluß auf die Ausbildung von HUVEC-Podosomen durch Aktin-regulatorische Signalkaskaden ausüben, worauf in Kapitel 5.5. eingegangen wird. Rho, Rac1 und Cdc42 regulieren die Dynamik der Podosomen durch deren Involvierung in den Aktinumsatz eventuell *via* Cofilin, das ebenfalls in den von uns

definierten Strukturen lokalisiert ist (Linder und Aepfelbacher 2003). Außerdem regulieren Rho und Rac (Rottner *et al.*, 1999) auch Adhäsionskomplexe. Diese Aussagen können wohl mit dem von uns gewonnenen Ergebnissen in bezug auf die HUVEC-Podosomen, die auch als Adhäsionsstrukturen fungieren, erweitert werden.

Wie wir in vorhergehenden Untersuchungen nachweisen konnten, sind RhoGTPasen in die Regulation der HUVEC-Podosomen involviert. Nun wollten wir analysieren, ob die RhoGTPasen einen Einfluß auf die Bildung von diesen *downstream* von Zytokinen ausüben. Anhand der Behandlung von HUVEC mit C3-Transferase, einem Inhibitor von Rho, wurde die Zytokin-induzierte Podosomenbildung experimentell analysiert. Während unbehandelte Zellen unter Serum-deprivierten Bedingungen Standard-Level (30%) an Podosomen zeigen, senkt sich deren Anzahl nach der Behandlung mit der C3-Transferase. Rho wirkt demnach als ein *downstream* Effektor von Zytokinen bei der Generierung von HUVEC-Podosomen.

5.5. PI3- und Src-Kinasen beeinflussen die Bildung von HUVEC-Podosomen

Hemmung von Tyrosinkinase durch den Inhibitor PP2 führt in Makrophagen zur Zerstörung von podosomal Strukturen, eine Inhibition von Tyrosinphosphatasen durch Vanadat zu deren erhöhter Bildung (Linder *et al.*, 2000). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass Src-Kinasen und ihre Substrate nicht nur Bestandteile podosomaler Strukturen, sondern auch essentiell für die Bildung und den Umsatz von Podosomen der Monozyten sind (Lakkakorpi *et al.*, 1999). Diesen Sachverhalt haben wir im Verlauf dieser Dissertation auch bei den podosomalen Strukturen der HUVEC analysiert.

Wie wir nachweisen konnten, sind die Src-Kinasen nicht nur Komponenten von klassischen, sondern auch von den in HUVEC generierten Podosomen. Zugabe des spezifischen Src-Kinase-Inhibitors PP2 reduziert die Anzahl der Zellen, die HUVEC-Podosomen generieren können, dramatisch. Dieser Effekt ist reversibel, da nach einer Nachinkubation im HUVEC-Medium die Anzahl der gebildeten Podosomen, wie zuvor, bei über 30% liegt. Diese Daten zeigen einen entscheidenden Einfluß von den Src-Kinase-Signaltransduktionswegen in Bezug auf die Bildung von Podosomen in HUVEC. Diese könnte bei der Aktivierung von Integrinen nach der Anheftung der HUVEC an einem Substrat erfolgen. Anschließend würden diese über PKC eine Aktivierung von Src-Kinasen auslösen, die dann PIK3 und/oder Pyk2/FAK aktivieren könnten. Über PIK3 könnte es zur Bildung von Phosphatidylinositolen kommen, die auch von RhoGTPasen beeinflusst werden dürfte (Linder und Kopp, 2005).

Die Aktin-Filamente der oberen Schicht von HUVEC-Podosomen könnten durch ein Multidomänen-Protein, das Cortactin, verbunden sein, das auch an den Arp2/3-Komplex binden kann, und ein relevantes Substrat von Tyrosinkinase wie Src darstellt. Wenn Cortactin durch die Src-Kinasen phosphoryliert wird, ist seine kreuz-vernetzende Aktivität von Aktin-Filamenten reduziert (McNiven *et al.*, 2004). Hiermit wäre die Architektur der HUVEC-Podosomen negativ beeinflusst und die Generierung dieser Struktur verhindert, was durch die von uns erzielten Ergebnisse bestätigt werden kann. Auch die Erhaltung des F-Aktinkerns von monozytären Podosomen ist unter anderem von Src-Kinasen abhängig, wie Tanaka *et al.* bereits 1995 publizierten, was unsere Hypothese untermauert. Schließlich können mehrere Src-Kinasen an die Polyprolinomäne von WASP binden, das als zentrales Molekül bei der Weiterschaltung von Phosphotyrosinkinase fungiert (Banin *et al.*, 1996; Lakkakorpi *et al.*, 1999). Wie Tu *et al.* 2003 feststellten, kann die Src-Kinase auch die Funktion von Cdc42 beeinflussen, während die RhoGTPasen ihrerseits die intrazelluläre Lokalisierung der Src-Kinase bestimmen (Timpson *et al.*, 2001). So ist auch möglich, daß eine Kombination zwischen den RhoGTPasen- und der Src-Kinase-Signalkaskadewegen bei der Regulation der HUVEC-Podosomen zustande kommt.

Aber auch die PI3K hat, wie unsere Experimente belegen, modulatorische Eigenschaften auf die Generierung von HUVEC-Podosomen. Die Behandlung subkonfluenter HUVEC mit reversiblen und irreversiblen PI3-Kinase-Inhibitoren führt zur Reduktion der Anzahl von Zellen,

die HUVEC-Podosomen ausbilden können. Im übrigen verhindert eine Inhibierung der katalytischen Untereinheit p110 der PI3K durch Wortmannin, die Aktivierung von Rac1 und Cdc42 in Epithelzellen und Fibroblasten, was zeigt daß PI3K *upstream* von Rac1 und Cdc42 wirken muß (Fukata *et al.*, 2003). Da die Verwendung dieses Inhibitors in unseren Experimenten zur Depletion von HUVEC-Podosomen führte, könnte diese Kaskade an der Regulation von HUVEC-Podosomen beteiligt sein. Ein von uns zusätzlich verwendeter, reversibler Inhibitor der ATP-Bindungsstelle der PI3K, LY294002, führt auch zu starker Reduktion der Anzahl von Zellen, die HUVEC-Podosomen ausbilden können. Nach Auswaschung von LY294002, dem reversiblen Inhibitor, kommt es zur erneuten Bildung dieser Adhäsionsstruktur bei Werten um 30%. Somit ist der Einfluß der PI3K auf die Regulation von der von uns entdeckten Adhäsionsstruktur eindeutig verifiziert. Der von dieser Kinase ausgehende Einfluß könnte auch zur möglichen Funktion der HUVEC-Podosomen bei der Regulierung von Zell-Zell-Verbindungen beitragen (Siehe Punkt 4.7.). Wie andere Arbeitsgruppen zeigen, interagiert die PI3K nämlich mit E-Cadherin und β -Catenin und aktiviert Rac1, das zuerst an Stellen der Zell-Zell-Kontakten rekrutiert werden muß (Fukata *et al.*, 2001), doch dieses muß in weiteren Experimenten analysiert werden.

Wie andere Arbeitsgruppen publizierten, führt die Expression von konstitutiv aktiven RhoGTPase-Mutanten zu gesteigerter Proliferation und fördert die Motilität und invasives Verhalten durch einen *pathway*, bei dem die Aktivierung der PI3K essentiell ist (Aspenström *et al.*, 1999). Im allgemeinen werden die PI3-Kinase und die RhoGTPase Cdc42 für eine optimalen Migrationsgeschwindigkeit benötigt. Hierbei wirkt während der Zellpolarisation und der Chemotaxis die PI3K *upstream* von Rac. PI3K fördert die Bildung von Pseudopodien, *ruffles* aber auch Lamellipodien und bedingt so die persistente Richtung der Migration. Desweiteren stimulieren Rac und Cdc42 aber auch die PI3K, wodurch die daraus resultierenden 3'-phosphorylierten Lipide an Rac-GEFs binden und diese stimulieren (Manneville *et al.*, 2002 und 2003). Hierdurch arrangieren sie einen positiven Rückkopplungseffekt, der die Zellmigration aufrechterhält. Diese Rolle könnte die PI3-Kinase auch in den von uns charakterisierten Adhäsionsstrukturen ausüben und zur Funktion dieser bei der Migration beitragen.

5.6. Arp2/3-Komplex-vermittelte Aktinnukleation beeinflusst die Generierung von HUVEC-Podosomen

Im Rahmen dieser Dissertation konnten wir eine Anreicherung von Aktinregulatoren wie N-WASP und Arp2/3-Komplex in HUVEC-Podosomen nachweisen. Die Involvierung dieser Proteine bei der Regulation von podosomal Strukturen der Monozyten, ließ uns ihre Rolle in den HUVEC-Podosomen analysieren. Zur Regulation monozytärer Podosomen tragen zahlreiche N-WASP-Domänen durch differentielle Rekrutierung und/oder Aktivierung von verschiedenen Interaktionspartnern bei. So binden die V- und C-Region von N-WASP monomeres Aktin und die A-Region den Arp2/3-Komplex. Die VCA-Region bindet nicht nur an den Arp2/3-Komplex sondern fördert auch die Arp2/3-Komplex-vermittelten Aktinpolymerisation, da die VC-Region diesen aktivieren kann, während die CA-Region die *priming* Aktivität vermittelt (Badour *et al.*, 2003; Huefner *et al.*, 2001).

Hierzu wurden von uns Mikroinjektionsexperimente des Arp2/3-Komplex-bindenden GST-A Fusionsproteins durchgeführt, welches die *acidic region* von N-WASP beinhaltet, und durch kompetitive Bindung die Rekrutierung von Arp2/3-Komplex an N-WASP verhindert (Hüfner *et al.*, 2001). Diese Injektion führte anschließend zur dramatischen Verminderung in der Anzahl von Zellen, die HUVEC-Podosomen ausbilden können. So konnten wir zeigen, daß die Arp2/3 Komplex-abhängige Aktinnukleation einen entscheidenden Einfluß auf die Erzeugung von HUVEC-Podosomen hat.

Zudem zeigte ein Experiment bei dem die HUVEC mit Wiskostatin, einem spezifischen Inhibitor von N-WASP behandelt wurden, daß N-WASP auf die Bildung von HUVEC-

Podosomen regulatorisch einwirkt. Im Gegensatz zu der in Mikroinjektion durchgeführten Inhibierung der N-WASP-abhängigen-Aktinnukleation durch kompetitive Hemmung vom Arp2/3-Komplex, handelt es sich bei der mit Verwendung von Wiskostatin um eine Methode zur direkten Inhibierung von N-WASP. Nach Zugabe von Wiskostatin zum HUVEC-Medium, können nur wenige Zellen beobachtet werden, die HUVEC-Podosomen enthalten ($1,0\% \pm 1,3\%$ im Vergleich zu Kontrolle ca 30%). Diese Ergebnisse verweisen deutlich auf die zentrale Rolle von N-WASP und Arp2/3-Komplex bei der Generierung von HUVEC-Podosomen. Insgesamt deuten unsere Ergebnisse auf eine mögliche Involvierung der RhoGTPasen an der Regulation der HUVEC-Podosomen durch Cdc42- und N-WASP-abhängige Stimulation des Arp2/3 Komplexes hin, die die Aktinnukleation induziert.

Dennoch muß noch ein zweiter Weg für die Bildung der HUVEC-Podosomen-Generierung vorhanden sein, denn nach der Inhibierung des Cdc42-N-WASP-Arp2/3-Komplex-Signalweges, können immer noch beinahe 1/3 dieser Strukturen gebildet werden. Hierzu wäre es einerseits möglich, daß Arp2/3-Komplex in dieser Adhäsionsstruktur als Komponente geschützt gelagert wird, indem z.B. andere Proteinkomponenten daran binden und es so maskieren. Andererseits könnte die zur Entwicklung von HUVEC-Podosomen notwendige Aktinnukleation unabhängig vom Arp2/3-Komplex mit Hilfe von weiteren Proteinen erfolgen, wie z. B. Forminen (Zigmond *et al.*, 2003). Beide Hypothesen müßten in folgenden Experimenten weiter untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, daß HUVEC-Podosomen, die wir nach der Zugabe von Zytokinen oder Monozyten beobachtet haben, weder funktionell (Degradation/Migration/Adhäsion) noch anhand der Erscheinungsform und der Architektur von den konstitutiv auftretenden Strukturen zu unterscheiden waren. Wie wir nachweisen konnten, wird die Bildung von HUVEC-Podosomen außer in subkonfluenten Layern auch durch Verursachung einer Verwundung, Zugabe von Monozyten oder Zytokinen dramatisch induziert. Die hierzu notwendigen Signale bedingen die Aktivierung von Signalwegen, die durch RhoGTPasen und Src-Kinasen reguliert werden. Die Cdc42-N-WASP- Arp2/3 Komplex Signalkaskade ist der hauptsächliche Weg zur Initiierung der Bildung von HUVEC-Podosomen, während Rho und Rac am Aktinumsatz möglicherweise durch die Involvierung von Cofilin beteiligt sind (Siehe Abb.37).

5.7. Drebrin stellt einen Marker von HUVEC-Podosomen dar und kontrolliert die Bildung dieser Strukturen

HUVEC-Podosomen sind vor dem Hintergrund zahlreicher anderer F-Aktin-reicher Strukturen in Endothelzellen sehr schwer zu erkennen. Deswegen haben wir einen spezifischen Marker dieser Adhäsionsstruktur gesucht, der es ermöglichen würde, sie besser zu visualisieren. Drebrin konnte wegen seiner Kolokalisation in Adhäsionsplaques und als F-Aktin-bindendes Protein als Kandidat für solch ein Markerprotein fungieren (Asada *et al.*, 1994).

Die Lokalisation von Drebrin in HUVEC-Podosomen wurde anhand zahlreicher Antikörper, die gegen verschiedene Domänen dieses Proteins gerichtet sind, als auch durch C- oder N-Terminal GFP-markierte Konstrukte dieses Proteins verifiziert. Im Gegensatz hierzu kann Drebrin nicht in klassischen Podosomen vorgefunden werden, bzw. nur vereinzelt. Die genaue Bedeutung dieses Proteins in podosomal Strukturen sollte weiter analysiert werden.

Nachdem konfokale Aufnahmen die Kolokalisation von Drebrin in HUVEC-Podosomen bewiesen, wurden von diesen xz-Schnitte angefertigt. Hierdurch war es uns möglich zu zeigen, daß Drebrin an die F-Aktin-haltige obere Schicht der Podosomen lokalisiert. Zudem kann Drebrin in der Zellperipherie und an protrusiven Zellkompartimenten beobachtet werden.

Um den möglichen Einfluß von Drebrin auf die Bildung von HUVEC-Podosomen zu analysieren, wurden diverse Domänen dieses Proteins als GST-Fusionsproteine bzw mit MBP-tag generiert (Siehe Abb. 30). Das N-terminale Konstrukt enthält die ADF-Domäne und ein Teil der *coiled coil* Sequenz, während das CC-Fusionsprotein die gesamte *coiled coil*-Domäne beinhaltet. Das

Konstrukt CC+MAR enthält die *coiled coil*-Domäne und die vollständige Aktin-regulatorische Region. Im Fusionsprotein MAR ist die minimale Aktin-regulatorische Region und im C-terminalen Konstrukt die Polyprolin-Domäne vorhanden. Die von uns durchgeführten Mikroinjektionsexperimente, bei denen diese Drebrindomänen-Konstrukte eingesetzt wurden, führten zu einer dramatischen Reduktion der Anzahl von Zellen, die HUVEC-Podosomen generieren. Dieser Effekt war Dosis-abhängig. Somit lassen unsere Experimente die Schlußfolgerung ziehen, daß die Involvierung des Drebrins bei der Generierung von HUVEC-Podosomen eine zentrale Rolle spielt. Seine Funktionen übt das Drebrin in HUVEC mit all seinen Domänen aus. Anhand der von uns erzielten Ergebnisse könnte Drebrin durch seine Fähigkeit F-Aktin zu binden regulatorisch auf die Bildung von HUVEC-Podosomen einwirken. Zum einen könnte es so Aktinfilamente kurz und dynamisch halten, indem es Aktin-stabilisierende Proteine verdrängt, was sich positiv auf das migratorische Verhalten auswirkt, zum anderen für Interaktionen mit weiteren Proteinen sorgen, die zur Bildung von HUVEC-Podosomen führen.

Um die zentrale Rolle des Drebrins für HUVEC-Podosomen zu bestätigen, wurden zwei siRNAs gegen verschiedenen Regionen des Proteins generiert und in HUVEC transfiziert. Die Effizienz von Drebrin siRNAs (I und II) wurde anhand von *western blots* und Immunfluoreszenz-Experimenten getestet, wobei nur das Drebrin-Signal bei siRNA-I schon nach 24 Stunden ausblieb und dieser Mangel die nächsten drei Tage anhielt. Dieser Sachverhalt spricht für einen hohen Umsatz des zellulären Drebrins und deutet auch darauf hin, daß die Zellen über einen spezifische und schnell induzierbare Fähigkeit verfügen müssen, die den zytoplasmatischen Drebrin-Level ausbalanciert. Die Transfektion von HUVEC mit Drebrin siRNA führte zur Reduktion der Anzahl an HUVEC, die Podosomen generieren können. Diese Experimente unterstreichen auch die zentrale Rolle des Drebrins bei der Bildung und der Regulation von HUVEC-Podosomen. Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Modell der putativen Signalkaskade, die die Bildung von HUVEC-Podosomen induziert, erstellt werden (Siehe Punkt 5.9.).

5.8. Drebrin kontrolliert die Bildung und Dynamik von HUVEC-Podosomen

In dieser Dissertation können wir zeigen, daß Drebrin womöglich in HUVEC-Podosomen migratorische und adhäsive Prozesse regulieren könnte. Diese Strukturen sind, wie *live cell* – Experimente belegen, hochdynamisch und breiten sich innerhalb der Zelle vorwiegend wellenartig aus. Bei den HUVEC-Podosomen könnte man spekulieren, daß die dort beobachtete Dynamik durch die spezifische Rekrutierung des Drebrins ermöglicht wird. Man nimmt nämlich an, daß Drebrin Aktinfilamente kurz, ungebündelt und deswegen dynamisch hält (Hayashi *et al.*, 1999).

In vorhergehenden Analysen wurde deutlich, daß der migratorische Phänotyp der HUVEC nach der Transfektion dieser mit Drebrin-siRNA nicht voll ausgebildet werden kann, da die Zellen nur wenige und kurze Protrusionen generierten und auch nicht mehr in der Lage waren zelluläre Netzwerke voll auszubilden. Auch andere Gruppen demonstrieren in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen, daß ein verringerter Level an Drebrin-Protein, durch die Verwendung von Drebrin-siRNA, zu reduzierter Generierung zellulärer Protrusionen führt (Shirao *et al.*, 1994).

Aufgrund solcher Ergebnisse führten wir *live cell* - Experimente durch. Wir konnten hierbei oft eine Fusion der HUVEC-Podosomen mit der Zellmembran beobachten. In der Region dieser Fusion wurde zudem ein Anstieg an gebildeten Filopodien und Lamillipodien und/oder *ruffles* beobachtet. Unsere Beobachtungen werden durch die der Arbeitsgruppe von Shirao *et al.* im Jahre 1994 untermauert, denn dort konnte bei einer Drebrin-Überexpression ein Anstieg in der Generierung von Protrusionen wahrgenommen werden (Shirao *et al.*, 1994). Auch die Publikation von W.Peitsch im Jahr 2001 bestätigt dies, da sie zeigt, daß Drebrin womöglich an der Ausbildung von zellulären Protrusionen beteiligt ist. Weiterhin fand W.Peitsch heraus, daß

Drebrin an diesen Protrusionen lokalisiert ist und parallel dazu auch die Adhäsion von Zellen reguliert.

Unsere Experimente legen nahe, daß HUVEC-Podosomen in erster Linie als Orte der Adhäsion von Zellen an die ECM betrachtet werden können. Insgesamt werden unsere Ergebnisse auch von früheren Publikationen der Arbeitsgruppe von Ikeda *et al.* vom Jahre 1995 untermauert, die zeigen, daß Überexpression von Drebrin zur Bildung von Adhäsionsplaques führt. Anhand von *live cell imaging* Aufnahmen können wir ein Modell der Entstehung von HUVEC-Podosomen aufstellen. In der ersten Phase, der Phase der Induktion migratorischen Verhaltens, werden Podosomen generiert. Die einzelnen Podosomen fusionieren zu Rosetten, die in einer Art wellenförmiger Ausbreitung durch die Zelle zu wandern. Im Vergleich zu klassischen Podosomen verfügen HUVEC-Rosetten, wie wir zeigen können, über einen viel größeren Bewegungsradius. Hierbei ist die Lauffront der migrierenden Zelle auch die bevorzugte Richtung für die Ausbreitung dieser Strukturen. Als multifunktionelles Organell könnten HUVEC-Podosomen dann nicht nur als Adhäsionsstrukturen, die zudem auch die ECM degradieren können, sondern auch als eine migrierende Protein-Speicher-Struktur fungieren. Die Rosetten könnten ihre Komponenten an die Membran rekrutieren indem sie mit ihr fusionieren. So könnten diese Proteine an der Membran zum Aufbau von Protrusionen beitragen. All diese Funktionen (Adhäsion/Degradierung/Induktion von Protrusionen) würden zu motilen Prozessen der jeweiligen Zelle beitragen. Komponenten der Podosomen könnten nach einer solchen Fusion mit der Membran aber u. a. auch zur Generierung neuer Zell-Zell-Kontakte beitragen, da z. B. Drebrin durch HUVEC-Podosomen an die Peripherie rekrutiert wird (Siehe Video im Anhang). Es gibt tatsächlich eine Publikation, die die Funktionalität und Lokalisation von Drebrin an den Zell-Zell-Kontakten bestätigt (Butkevich *et al.*, 2004).

Die Dynamik der durch HUVEC-Podosomen induzierten Motilität ähnelt der von *adhesion waves*, die bei *Dictyostelium discoideum* von Bretschneider *et al.* im Jahre 2004 beschrieben wurden. Bei beiden Strukturen enthalten die F-Aktin-reichen Regionen den Arp2/3-Komplex an der den Substrat zugewandten Seite der Zellen und bewegen sich in einer wellenartigen Art und Weise in Richtung der Zellperipherie fort. Dieser wellenartige Charakter wird, wie die von uns aufgenommenen Filme belegen, durch deren Fähigkeit zur Interpenetration unterstreichen (Siehe Video im Anhang). Es wird angenommen, daß die hohe Plastizität des Zellkortex die Aktinwellen in *Dictyostelium discoideum* bedingt (Bretschneider *et al.*, 2004). Möglicherweise kann auch Drebrin zu einer erhöhten Plastizität des Zellkortex führen und so zur Generierung von HUVEC-Podosomen beitragen. Hingegen ist das dynamische Verhalten zwischen monozytären Podosomen und HUVEC-Podosomen von unterschiedlicher Natur. Klassische Podosomen fusionieren nicht mit der Zellperipherie und verbleiben mehr oder weniger im stationären Zustand. Während die Halbwertszeit von Podosomen 2-12 Minuten beträgt, ist sie bei HUVEC-Podosomen äußerst variabel.

Ein Fazit aus den bisherigen Untersuchungen ist, daß HUVEC-Podosomen als multifunktionelle Organellen fungieren könnten. Sie sind Adhäsionsstrukturen (TIRF/Siehe Punkt 4.3.) und auch invasive (ECM-Verdau/Siehe Punkt 4.4.) Strukturen, die den Endothelzellen die Fähigkeit zu Adhäsion, Migration und Invasion verleihen. Hierdurch könnten Endothelzellen aber auch die ECM durchbrechen und die Generierung neuer Gefäßwände initiieren. Andererseits können sie auch in die Bereiche einwandern, die beschädigt wurden und zu deren Verschluß/Heilung beitragen. Zusätzlich könnten sie Komponenten liefern, die dem Aufbau zellulärer Protrusionen dienen würden, und so die Migration unterstützen. Da HUVEC-Podosomen ihre Komponenten, wie Drebrin, u. U. an die Zellperipherie liefern, könnten sie auch bei der Verknüpfung von Zell-Zell-Kontakten eine Rolle spielen. So würden HUVEC-Podosomen zu Zell-Zell-Verbindungen, zum Wundverschluß wie auch zur Bildung neuer Gefäßwände beitragen. So könnte die Integrität des Endothels durch Strukturen wie u. a. HUVEC-Podosomen kontrolliert werden. Deswegen könnten HUVEC-Podosomen vom großen Interesse für eine therapeutische Anwendung, wie nach operativen Eingriffen zum schnellen Wundverschluß, sein.

5.9. Einfluß von Drebrin auf die Bildung kapillarer Netzwerke

Wie bereits erwähnt, resultierten Mikroinjektionsversuche mit Konstrukten von Drebrin-Domänen, in einer dramatischen Reduktion der Zahl von Zellen, die HUVEC-Podosomen ausbilden können. Damit ist Drebrin nicht nur als Marker dieser Strukturen, sondern auch als ein zentraler Regulator verifiziert worden.

Um die Funktionalität des Drebrins in HUVEC zu charakterisieren, wurde dieses Protein überexpressiert bzw. mit Hilfe von *knock-out*-Experimenten deletiert. Zudem wurde seine Funktion bei der kapillaren Netzwerkbildung auf Matrigel untersucht, die als *ex vivo* Modell der Gefäßbildung fungiert. Unsere Aufnahmen zeigen Drebrin, sowohl auf dem zellulären Level als auch nach einer Überexpression, an den Zell-Zell-Kontakten und an F-Aktin-reichen Regionen der Zellreihen lokalisiert. Hier erfolgt der Aufbau zellulärer Netzwerke wie auch bei unbehandelten HUVEC ungehindert. Nach Einführung von Drebrin-siRNA in subkonfluente HUVEC kann Drebrin in keiner Zelle mehr detektiert werden. Zudem ist die Ausbildung kapillarer Netzwerke gestört und erfolgt in einem reduzierten Umfang. Somit sind, wie die Anzahl der von uns observierten Zell-Kontakte in dem dargelegten Experiment belegt, auch die Bildung kapillarer Netzwerke von Drebrin abhängig. In diesem Modell könnten die von uns beschriebenen HUVEC-Podosomen das wohl essentielle Drebrin an die dafür zuständigen Bereiche der Plasmamembran liefern und so auch die Bildung von Zell-Zell-Kontakten beeinflussen. Wie Butkevich *et al.*, 2004 publizierten, kommt es in der Abwesenheit von Drebrin zur Beeinträchtigung von Zell-Zell-Verbindungen, Internalisation von *gap junctions* und zum Connexin-43-pathway. Zusätzlich hat diese Arbeitsgruppe demonstriert, daß unter normalen Bedingungen Connexin-43 an Serin und Tyrosin-Resten phosphoryliert wird, nicht jedoch nach Transfektion von Zellen mit Drebrin-siRNA. Die Phosphorylierungen nahmen ab und gleichzeitig sank die Involvierung der Connexine in die Plasmamembran und die Stärke der Zell-Zell-Kontakte. Drebrin wird laut der Aussage dieser und nun auch unserer Arbeitsgruppe zur Erhaltung von *gap junctions*, Zell-Zell-Verbindungen und deren Funktionalität benötigt. Deswegen scheint Drebrin auch bei der Gefäßbildung eine zentrale Rolle zu spielen. Seine genaue Funktion in diesem Bereich sowie seine putative Rolle bei Vorgängen wie der Angiogenese oder Migration muß noch analysiert werden. Ergebnisse wie diese belegen jedoch die zentrale Rolle von Drebrin beim Zustandekommen der Angiogenese, Migration, der Ausbildung von HUVEC-Podosomen. Weiterhin sind Adhäsion und Matrixdegradation der Endothelzellen von entscheidender Bedeutung während der Angiogenese und Wundheilung. Beide Ereignisse werden auf temporaler und räumlicher Ebene strikt reguliert. So kann, wie Langlois *et al.*, 2004 publizierten, eine Überexpression von MT1-MMP bei Endothelzellen die Bildung kapillarer Netzwerke stiumlieren. Eine solche Induktion von kapillaren Netzwerken könnte auch von den in den HUVEC-Podosomen integrierten Komponenten, wie dem MT1-MMP, ausgehen, wodurch diese Strukturen auch die Angiogenese beeinflussen könnten. Zudem werden beide, HUVEC-Podosomen, wie wir das anhand unserer Ergebnisse zeigen können, aber auch die Angiogenese (Leung *et al.*, 1989), von Zytokinen wie VEGF stimuliert. Weitere Argumente zur Unterstützung unserer Hypothese liefern Cascone *et al.*, im Jahre 2003. Diese Arbeitsgruppe verifizierte, daß Rho-, Rac- und N-WASP-Funktionen in die Bildung kapillarer Netzwerke wie auch bei der Tubulogenese der Endothelzellen involviert sind. Auch diese Proteine stellen Regulatoren der von uns beschriebenen Adhäsionsstruktur dar. Somit handelt es sich bei den HUVEC-Podosomen um Strukturen, deren Komponenten aber auch regulatorischen *pathways*, mit denen übereinstimmen, die auch für die Ausbildung von zellulären Netzwerken benötigt werden.

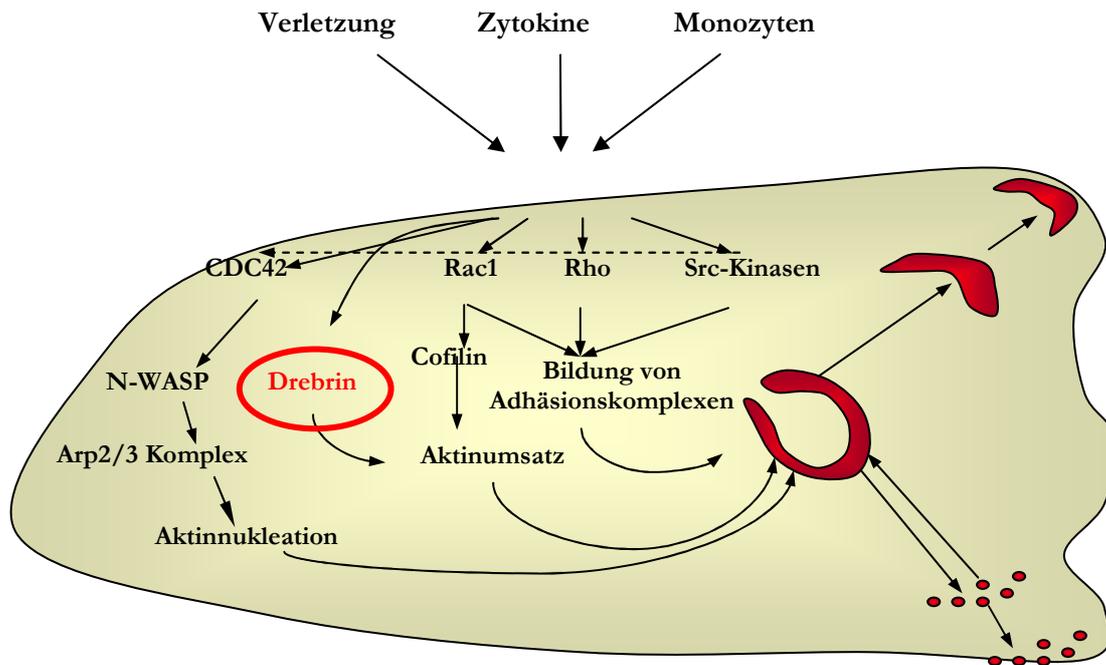


Abbildung 37: Modell der Funktion und Regulation von HUVEC-Podosomen. Anhand der von uns erhaltenen Daten können wir zeigen, daß podosomale Strukturen in HUVEC beim migratorischen Phänotyp konstitutiv generiert werden. Ihre Bildung wird zudem von Zytokinen und Monozyten stimuliert. Nachdem RhoGTPasen stimuliert worden sind, kommt es zur Induktion der Aktinnukleation über den N-WASP/Arp2/3 Komplex-*pathway* und zur Bildung von Adhäsionskomplexen und Modifizierungen des Aktinzytoskeletts. HUVEC-Podosomen können zu Rosetten fusionieren, die dissoziieren können. Die gebildete HUVEC-Podosomen und/oder Rosetten fungieren unter Umständen als multifunktionelle Zellorganellen bei der: Adhäsion, Matrixdegradierung, Migration, Invasion, Induktion und als Komponenten von Zellprotrusionen und bei der Neubildung von Zell-Zell-Kontakten.

5.10. Interaktionspartner von Drebrin

Drebrin ist, wie schon gezeigt, ein spezifisches Markerprotein der von uns charakterisierten HUVEC-Podosomen. Zahlreiche Publikationen zeigen, daß dieses Protein an F-Aktin binden kann. Bei dieser Bindung konkurriert es um die Bindestelle von Aktin-stabilisierenden Proteine wie z.B. Tropomyosin und ermöglicht anschließend Bindungen mit Aktin-destabilisierenden Proteinen (Cofilin). Somit werden Aktinfilamente kurz, ungebündelt und dynamisch gehalten, wodurch Drebrin höchstwahrscheinlich für den migratorischen Phänotyp verantwortlich ist (Hayashi *et al.*, 1999).

Es existieren nur wenige Publikationen über andere mit Drebrin interagierenden Proteine (außer F-Aktin). So konnten Butkevich *et al.*, 2004 nachweisen, daß Drebrin auch mit Connexin-43 interagiert. Drebrin Immunopräzipitate beinhalten, wie andere Gruppen nachweisen konnten, F-Aktin, Myosin, α -Aktinin, Gelsolin und Profilin (Akiko *et al.*, 1998; Kensuke *et al.*, 1996). Durch eine Interaktion mit Profilin reguliert die Rho-Familie von kleinen G-Proteinen zahlreiche Aktin-Zytoskeltes-abhängige Zell-Funktionen. Vielleicht reagieren G-Proteine auch mit Drebrin, um diese Signalkaskaden zu induzieren und so die Morphologie des Aktinzytoskeletts zu regulieren. Doch konnte für Drebrin keine Interaktion mit RhoA, Rac, Cdc42 beobachtet werden (Mammoto *et al.*, 1998).

Wir konnten nachweisen, daß F-Aktin mit den N-Terminalen-, CC- und dem CC+MAR-Konstrukten von Drebrin interagiert. Diese Konstrukte enthalten, wie vorher schon erwähnt, die *coiled coil*-Domäne und teilweise bzw. vollständige Sequenz der minimalen Aktin-regulatorischen Region. Diese Bereiche scheinen die Bindung des Drebrins an F-Aktin zu ermöglichen.

Zudem konnten wir zeigen, daß das MBP-Fusionsprotein, das den C-terminalen Anteil von Drebrin enthält, in der Lage ist zelluläres Drebrin zu binden, was die Fähigkeit zur Oligomerisierung demonstriert. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis enthält Drebrin eine *coiled coil* Domäne, und dieses strukturelle Motiv ist oft in eine Oligomerisierung involviert (Siehe Punkt 4.16.). Unsere Ergebnisse in diesem Bereich werden durch die Publikation der Arbeitsgruppe von W.Peitsch im Jahre 2001 bestätigt, die auch von einer Dimerisierung und Oligomerisierung von Drebrin ausgehen. Welche Drebrin-Interaktion zu welchem Zweck innerhalb der Zelle funktionell genutzt wird, müssen weitere Analysen zeigen. Somit lassen unsere Experimente die Schlußfolgerung ziehen, daß die Involvierung von beiden Prozessen bei der Generierung von HUVEC-Podosomen mitbeteiligt sein könnte, nämlich die Bindung von Drebrin an F-Aktin und die Oligomerisierung von Drebrin. Anderen Komponenten der HUVEC-Podosomen (Siehe Tabelle. 13) wie z. B. ARPC1, FAK und c-Src stellen keine Interaktionspartner dar. Obwohl Profilin mit Drebrin als Interaktionspartner beschrieben wurde, konnten wir dieses weder in den HUVEC-Podosomen lokalisieren, noch in den *pull down assays* eine Bindung dessen an Drebrin verifizieren. Auch andere von uns getesteten Kandidaten-Proteine, die wir anhand von GFP-IPs und der anschließenden MALDI identifizierten, konnten nicht als direkte Interaktionspartner dieses Proteins verifiziert werden. Weitere Experimente sind notwendig um Proteine, die mit Drebrin interagieren können, zu identifizieren.

6. Zusammenfassung

Der Hauptregulator der vaskulären Homöostase ist das Endothel, welches eine Vielzahl an vasoprotektiven Effekten ausübt. Wenn hier die vorherrschende Balance herabgesetzt wird, spricht man von endothelialer Dysfunktion, gekennzeichnet durch Schäden an der arteriellen Wand, die zu weiterer Schädigung des restlichen Körpers, wie z. B. der Erkrankung der Koronararterien, führen. Die Integrität und Regulation des endothelialen Zelllayers der Blutgefäße ist von großer Bedeutung bei physiologischen und pathologischen Prozessen, wie bei der Wundheilung, der Tumorprogression, dem Wachstum oder der Inflammation. Die Basis dieser Phänomene ist in der dynamischen und exakt kontrollierten Regulation des Zytoskeletts begründet. Die wichtigsten Regulatoren des Zytoskeletts stellen die GTPasen der Rho-Familie und deren Effektoren dar. Auch von großer Bedeutung sind die Prozesse, die zur Auflösung und Bildung von Zell-Zell- und Zellmatrix-Verbindungen, zur Stabilität des Monolayers oder zu deren Auflösung und der Migration der einzelnen Zellen beitragen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten wir in primären humanen Nabelschnurendothelzellen, eine neu in Erscheinung tretende Zytoskelettstruktur, der wir in Anlehnung an ähnliche Proteingruppierungen in monozytären Zellen den Namen HUVEC-Podosomen gaben. Einzelne HUVEC-Podosomen können zu Superstrukturen, den Rosetten fusionieren, die eine ringförmige Struktur vorweisen. HUVEC-Podosomen sind aufgrund ihrer Komponenten mit klassischen Podosomen vergleichbar. Beide Strukturen enthalten Aktin, aktinregulatorische Proteine, wie Cofilin, Arp2/3-Komplex, N-WASP, NCK, sowie GTPasen, Tyrosinkinasen, Vinculin, Talin, Paxillin, und Matrixmetalloproteinasen (MMP) und Integrine. Allerdings gibt es zwischen beiden Strukturen auch Unterschiede, denn während klassische Podosomen aus Ring und Kern bestehen, zeigen HUVEC-Podosomen eine zweischichtige Architektur.

Wie wir weiterhin nachweisen konnten liegen Podosomen der Endothelzellen an der ventralen Plasmamembran (konfokalmikroskopische Analyse) und haben engen Kontakt mit der extrazellulären Matrix (TIRF Analyse). Somit fungieren sie, wie auch die klassischen Podosomen, als Adhäsionsstrukturen. Sie dienen aber nicht nur der Adhäsion, denn wie bei FITC-markierten Monolayer-Versuchen gezeigt werden konnte, haben sie auch eine proteolytische Aktivität, die insbesondere beim Matrixverdau und der daran anschließenden Migration von Bedeutung ist. Möglicherweise vermitteln Komponenten wie die MMPs diesen Degradierungsprozeß.

Ferner können wir zeigen, daß HUVEC-Podosomen in ruhenden, konfluenten Zell Layern nicht beobachtet werden können. Sie lassen sich aber in migratorischen (subkonfluent oder nach Verwundung) HUVEC, in hoher Anzahl und diversen ringförmigen Formationen, vorwiegend in Bereichen nahe dem Leitsaum nachweisen. Wie wir mit Hilfe von *live cell imaging*-Experimenten zeigen konnten, sind diese Strukturen hochdynamisch und breiten sich wellenartig mit einem weiten Radius innerhalb einer Zelle aus. Scheinbar dispergieren diese Formationen oder fusionieren mit der Zellplasma, wodurch sie die enthaltenen Proteine für viele andere zytoplasmatische oder membranöse Prozesse freigeben könnten.

Durch Experimente, in denen Zytokine wie VEGF, bzw. Zytokin-produzierende Zellen wie Monozyten den HUVEC-Kulturen zugegeben wurden, konnten wir zeigen, daß diese die Bildung von Podosomen induzieren und sogar erheblich steigern. Unsere Arbeiten mit konstitutiv aktiven und dominant negativen GTPase-Mutanten zeigten weiterhin, daß diese bei der Organisation und Entstehung der HUVEC-Podosomen von entscheidender Bedeutung sind. Dabei konnte eine Abhängigkeit der Generierung von Podosomen von GTPasen RhoA, Rac1 und CDC42 nachgewiesen werden. Ferner konnte mit Hilfe von Mikroinjektionsversuchen von einer Teildomäne (A) des N-WASP-Proteins verifiziert werden, daß der Mechanismus zur Bildung der HUVEC-Podosomen eine Arp2/3-abhängige Aktinnukleation beinhaltet. Weiterhin ist die Bildung dieser Adhäsionsstrukturen auch von Src Tyrosinkinasen und PI3-Kinase abhängig.

Eine der Komponenten von HUVEC-Podosomen ist das Markerprotein Drebrin. Drebrin kann nur in diesen Strukturen und an Zell-Zell-Kontakten in HUVEC detektiert werden. Mikroinjektionsversuche von diversen Konstrukten der unterschiedlichen Regionen von Drebrin zeigen, daß dieses Protein von großer Bedeutung für die Bildung und Struktur der HUVEC-Podosomen ist, da alle untersuchten Regionen die Generierung von Podosomen reduzierten. Die einzelnen Protein-Protein-Interaktionen von podosomal Komponenten untereinander und mit Drebrin wurden mit Hilfe von Immunpräzipitation

getestet. Es ist uns jedoch nicht gelungen einen Drebrin-Interaktionspartner zu finden. Eine Interaktion von Drebrin konnten wir nur mit Drebrin selbst in Form einer Dimerisierung bzw. mit F-Aktin nachgewiesen.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß HUVEC-Podosomen bei Vorgängen wie der Adhäsion, ECM-Degradierung, Migration und Invasion beteiligt sind. Zudem kann ihre Bildung von Zytokinen induziert werden. All diese Vorgänge sind für die Angiogenese essentiell. Desweiteren kann Angiogenese von Zytokinen induziert werden, weshalb wir analysieren wollten, ob HUVEC-Podosomen tatsächlich auch in diesen Vorgang involviert sind. In Matrigel-Analysen gelang es uns, das Drebrin-Protein mit Hilfe von Drebrin-siRNA zu deletieren und hierdurch zu verifizieren, daß dieses auf Ausbildung von HUVEC-Netzwerken, und daraus resultierend auf die Angiogenese, einen großen Einfluß hat.

Aufgrund unserer Ergebnisse läßt sich ein Modell der Generierung von HUVEC-Podosomen erstellen. Hierbei kann als extrazelluläres Signal für die Induktion dieser Strukturen die Zugabe von Zytokinen oder eine Verwundung genannt werden. Durch diese Induktoren werden *pathways* aktiviert, die durch RhoGTPasen und Src- wie auch PI3-Kinasen reguliert werden. Der davon *downstream* liegende Signaltransduktionsweg Cdc42-WASP-Arp2/3-Komplex führt dabei zur Aktinpolymerisation und zur Bildung der F-Aktin-haltigen HUVEC-Podosomen, während die GTPasen Rho und Rac möglicherweise durch Cofilin den Aktinumsatz kontrollieren. Wie schon erwähnt ist Drebrin nicht nur Marker- sondern auch Regulator-Protein der HUVEC-Podosomen und bedingt die zur Migration notwendige Dynamik des F-Aktins, indem es die Filamente kurz hält. Diese Tatsache trägt wahrscheinlich zu der hohen Dynamik bei, die wir bei HUVEC-Podosomen beobachten konnten.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß es sich bei HUVEC-Podosomen um ein multifunktionelles Organell handelt. Wie wir in dieser Arbeit darstellen, sind HUVEC-Podosomen Adhäsionsstrukturen. Sie können am häufigsten am Leitsaum detektiert werden, wobei ihre Generierung nur in Zellen mit migratorischen Phänotyp (in Zellen am Wundrand oder in subkonfluenten *layern*) detektiert werden kann. Beide Tatsachen sprechen dafür, daß HUVEC-Podosomen den Prozeß der Migration unterstützen. Zudem können diese Adhäsionsstrukturen die Matrix degradieren, wodurch sie so wiederum zur Migration aber auch invasiven Prozessen beitragen könnten. HUVEC-Podosomen könnten auch eine Funktion als Speicherform ihrer Komponenten ausüben. Sie fusionieren mit der Zellmembran und liefern so möglicherweise notwendige Proteine und Signale, die die Induktion von Protrusionen ermöglichen und so migratorische Prozesse unterstützen könnten. Durch die Involvierung u. a. von Drebrin, das an Zell-Grenzen detektiert werden kann, können HUVEC-Podosomen möglicherweise einen Einfluß auf Zell-Zell-Kontakte und Vorgänge wie Angiogenese ausüben. Dies bestätigt auch die Tatsache, daß Zytokine die Anzahl an Zellen erhöhen, die HUVEC-Podosomen generieren können und Vorgänge wie Wundheilung beschleunigt ablaufen lassen. Insgesamt belegen unsere Untersuchungen, daß HUVEC-Podosomen multifunktionelle Organellen darstellen, die zur Erhaltung der Endothelialen-Homöostase beitragen und so u. U. eine klinische Relevanz haben könnten. Dies wird Gegenstand weiterer Studien sein.

7. Perspektiven

Zukünftige biochemische Untersuchungen werden, wie schon in dieser Doktorarbeit eingeleitet, das Ziel verfolgen, einen Interaktionspartner für Drebrin zu finden, das ein hervorragender Marker aber auch essentielles Protein für die Existenz von HUVEC-Podosomen ist. Damit könnten die Signalwege zur Initialisierung der Bildung, des Ab- oder/und Umbaus und die Bedeutung des Vorhandenseins dieser Strukturen weiterhin spezifiziert werden.

Zusätzlich ist es aber hierbei möglich, noch mehr über das wenig bekannte Drebrin-Protein und die genaue Funktion seiner Domänen in Erfahrung zu bringen. Die von uns hergestellten Drebrin-Domänen- wie auch die Drebrin-Domänen-Teil-Konstrukte müßten zu diesem Zwecke mit weiteren Kombinationen der vorliegenden Sequenz kloniert und später in Mikroinjektionsversuchen oder bei biochemischen Analysen wie auch GFP- oder RFP-markiert beim *live cell imaging* eingesetzt werden. Auf diesem Wege könnte es gelingen, nicht nur Wissen über Drebrin selbst, sondern noch zusätzlich einen Interaktionspartner und somit ein bzw. mehrere, möglicherweise HUVEC-Podosomen regulatorische Proteine, zu erhalten. Zudem wäre es auch möglich auf diese Weise zu erfahren, ob die Geberierung von HUVEC-Podosomen über die Bildung der Komponenten an Drebrin, Drebrin-Dimere, Drebrin und Aktin-Moleküle oder nur an Aktin binden, das mit Drebrin interagiert.

Größte Chancen zum genaueren Beschreiben der Struktur versprechen nun die nach der MALDI (GFP- gegen Drebrin-GFP transfizierte HUVEC) in Erscheinung tretenden Banden von Proteinen nur auf Seite der Drebrin-GFP transfizierte HUVEC-Zellen bzw. hier in einer höheren Ratio vorkommend, die jetzt bestimmt und in weiteren analytischen Experimenten eingebunden werden sollen. Auch auf diesem Wege könnte ein Drebrin-Interaktionspartner, möglicherweise aber auch ein weiteres HUVEC-Podosomen-spezifisches und/oder regulierendes Protein gefunden werden, das dann weitere Aufklärungschancen liefert.

In Anlehnung an die Podosomen der hämatopoetischen Zellen müßte auch bei den von ihnen zum Teil abweichenden HUVEC-Podosomen die Bedeutung und der Einfluß von Mikrotubuli geklärt werden. Spielen sie auch hier eine Rolle? Und wenn – wie läßt sich diese in das Konzept „Drebrin“ integrieren? Warum werden diese Adhäsionsstrukturen nur in nicht-konfluenten Zellen ausgebildet und was unterdrückt ihre Generierung im konfluenten Stadium?

Eine weitere Auffälligkeit im Hinblick auf das Vorkommen von einer bestimmten Zahl an Zellen mit HUVEC-Podosomen, die erforscht werden sollte, hängt möglicherweise mit dem Zellteilungszyklus zusammen. Gibt es nun eine Verbindung zwischen den einzelnen Phasen des Zellteilungszyklus und der Anzahl von HUVEC-Zellen, die Podosomen beinhalten? Welchen direkten oder indirekten Einfluß, wenn überhaupt, spielen dann bei der Aktivierung der Signalkaskaden, die zum Entstehen der HUVEC-Podosomen führen, Cyclin-abhängige Proteinkinasen oder die Cycline?

Um wachsen und sich teilen zu können, braucht eine Zelle positive Signale von anderen Zellen. Die Mehrheit dieser Signale gehört zur Gruppe von Wachstumsfaktoren, die auch in dieser Arbeit ihren Einsatz bei Experimenten fanden. Sie sind auch eindeutig als stimulierende Faktoren zur HUVEC-Podosomen-Bildung als auch zum Wundverschluß innerhalb einer minimalen Zeitspanne identifiziert worden. Kann dies als ein Indiz dafür gedeutet werden, daß der Zellteilungszyklus auch einen Einfluß auf diesen Prozeß hat oder umgekehrt?

Es herrscht die Erkenntnis, daß die Form einer Zelle für ihre Teilungsfähigkeit von größter Bedeutung ist. Je mehr sich eine Zelle ausbreiten kann, je mehr Zellmatrix-Kontakte also gebildet werden können, umso häufiger findet eine Zellteilung statt. In der Kontrolle der Zellteilung scheint es einen Zusammenhang zwischen der Teilung und dem Aufbau des Cytoskeletts zu geben. Möglicherweise wird dieser Mechanismus von den Anheftungspunkten selbst und/oder intrazellulären Signalen bestimmt. Trägt die von uns in dieser Arbeit beschriebene Struktur zu einem solchen Effekt bei?

Die Relevanz und der somit weitreichende Umfang in der klinischen Verwendung, der Nutzen in der Heilung von Patienten, wären bei der Klärung dieser Fragestellungen und der *in vivo* Relevanz

dieser Strukturen für eine weite Bandbreite von Medikationen eröffnet. So könnten Verwundungen und sonstige Störungen der endothelialen Integrität durch eine Stimulierung der Bildung der HUVEC-Podosomen, die das migratorische Verhalten und die Ausbildung neuer Zell-Zell-Kontakte bedingen, in einer kürzeren Zeitspanne als sonst wiederhergestellt werden. Falls die Proliferation der Zellen im Zusammenhang mit der Entstehung der Podosomen steht, könnte sie angeregt werden, und so zur Regeneration des gegebenen Gewebes beitragen.

8. Literaturverzeichnis

- Adams JC.**, Molecular organisation of cellmatrix contacts: essential multiprotein assemblies in cell and tissue function. *Expert Rev Mol Med.* 2002 Feb 11;2002:1-24. No abstract available.
- Aepfelbacher M, Essler M, Huber E, Sugai M, Weber PC.**, Bacterial toxins block endothelial wound repair. Evidence that Rho GTPases control cytoskeletal rearrangements in migrating endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Sep;17(9):1623-9.
- Akisaka T, Yoshida H, Inoue S, Shimizu K.**, Organization of cytoskeletal F-actin, G-actin, and gelsolin in the adhesion structures in cultured osteoclast. *J Bone Miner Res.* 2001 Jul;16(7):1248-55.
- Andor A, Trulzsch K, Essler M, Roggenkamp A, Wiedemann A, Heesemann J, Aepfelbacher M.**, YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell Microbiol.* 2001 May;3(5):301-10.
- Anton IM, Lu W, Mayer BJ, Ramesh N, Geha RS.**, The Wiskott-Aldrich syndrome protein-interacting protein (WIP) binds to the adaptor protein Nck. *J Biol Chem.* 1998 Aug 14;273(33):20992-5.
- Anton IM, Saville SP, Byrne MJ, Curcio C, Ramesh N, Hartwig JH, Geha RS.**, WIP participates in actin reorganization and ruffle formation induced by PDGF. *J Cell Sci.* 2003 Jun 15;116(Pt 12):2443-51. Epub 2003 Apr 30.
- Asada H, Uyemura K, Shirao T.**, Actin-binding protein, drebrin, accumulates in submembranous regions in parallel with neuronal differentiation. *J Neurosci Res.* 1994 Jun 1;38(2):149-59.
- Aspenstrom P, Fransson A, Saras J.**, Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J.* 2004 Jan 15;377(Pt 2):327-37.
- Aspenstrom P.**, The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res.* 1999 Jan 10;246(1):20-5. Review.
- Avraham HK, Lee TH, Koh Y, Kim TA, Jiang S, Sussman M, Samarel AM, Avraham S.**, Vascular endothelial growth factor regulates focal adhesion assembly in human brain microvascular endothelial cells through activation of the focal adhesion kinase and related adhesion focal tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 2003 Sep 19;278(38):36661-8. Epub 2003 Jul 3.
- Badolato R, Sozzani S, Malacarne F, Bresciani S, Fiorini M, Borsatti A, Albertini A, Mantovani A, Ugazio AG, Notarangelo LD.**, Monocytes from Wiskott-Aldrich patients display reduced chemotaxis and lack of cell polarization in response to monocyte chemoattractant protein-1 and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J Immunol.* 1998 Jul 15;161(2):1026-33.
- Badour K, Zhang J, Shi F, McGavin MK, Rampersad V, Hardy LA, Field D, Siminovitch KA.**, The Wiskott-Aldrich syndrome protein acts downstream of CD2 and the CD2AP and PSTPIP1 adaptors to promote formation of the immunological synapse. *Immunity.* 2003 Jan;18(1):141-54.
- Badour K, Zhang J, Siminovitch KA.**, The Wiskott-Aldrich syndrome protein: forging the link between actin and cell activation. *Immunol Rev.* 2003 Apr;192:98-112. Review.
- Bailly M, Jones GE.**, Polarised migration: cofilin holds the front. *Curr Biol.* 2003 Feb 18;13(4):R128-30. Review.
- Baldassarre M, Pompeo A, Beznoussenko G, Castaldi C, Cortellino S, McNiven MA, Luini A, Buccione R.**, Dynamin participates in focal extracellular matrix degradation by invasive cells. *Mol Biol Cell.* 2003 Mar;14(3):1074-84.
- Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Imhof BA.**, Actin dynamics in living mammalian cells. *J Cell Sci.* 1998 Jun;111 (Pt 12):1649-58.
- Banin S, Truong O, Katz DR, Waterfield MD, Brickell PM, Gout I.**, Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) is a binding partner for c-Src family protein-tyrosine kinases. *Curr Biol.* 1996 Aug 1;6(8):981-8.
- Barreiro O, Yanez-Mo M, Serrador JM, Montoya MC, Vicente-Manzanares M, Tejedor R, Furthmayr H, Sanchez-Madrid F.**, Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J Cell Biol.* 2002 Jun 24;157(7):1233-45. Epub 2002 Jun 24.
- Bayless KJ, Davis GE.**, The Cdc42 and Rac1 GTPases are required for capillary lumen formation in three-dimensional extracellular matrices. *J Cell Sci.* 2002 Mar 15;115(Pt 6):1123-36.
- Belkin AM, Akimov SS, Zaritskaya LS, Ratnikov BI, Deryugina EI, Strongin AY.**, Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion. *J Biol Chem.* 2001 May 25;276(21):18415-22. Epub 2001 Mar 2.

- Bertling E, Hotulainen P, Mattila PK, Matilainen T, Salminen M, Lappalainen P.**, Cyclase-associated protein 1 (CAP1) promotes cofilin-induced actin dynamics in mammalian nonmuscle cells. *Mol Biol Cell*. 2004 May;15(5):2324-34. Epub 2004 Mar 5.
- Blystone SD.**, Integrating an integrin: a direct route to actin. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Jul 5;1692(2-3):47-54. Review.
- Bretschneider T, Diez S, Anderson K, Heuser J, Clarke M, Muller-Taubenberger A, Kohler J, Gerisch G.**, Dynamic actin patterns and Arp2/3 assembly at the substrate-attached surface of motile cells. *Curr Biol*. 2004 Jan 6;14(1):1-10.
- Bretschneider T, Jonkman J, Kohler J, Medalia O, Barisic K, Weber I, Stelzer EH, Baumeister W, Gerisch G.**, Dynamic organization of the actin system in the motile cells of Dictyostelium. *J Muscle Res Cell Motil*. 2002;23(7-8):639-49.
- Brinckerhoff CE, Matrisian LM.**, Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Mar;3(3):207-14. Review.
- Brinkerhoff CJ, Podsiadlo P, Komiyama T, Fuller RS, Blum O.**, Protease inhibitors formed in situ from copper and tridentate chelates: a generalized approach towards metal-based pharmaceuticals. *ChemBiochem*. 2002 Nov 4;3(11):1141-3. No abstract available.
- Buccione R, Orth JD, McNiven MA.**, Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Aug;5(8):647-57. Review.
- Burgstaller G, Gimona M.**, Actin cytoskeleton remodelling via local inhibition of contractility at discrete microdomains. *J Cell Sci*. 2004 Jan 15;117(Pt 2):223-31.
- Burns S, Thrasher A J, Blundell M P, Machesky L und Jones G E.** (2001). Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood* **98**, 1142-1149.
- Butkevich E, Hulsmann S, Wenzel D, Shirao T, Duden R, Majoul I.**, Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton. *Curr Biol*. 2004 Apr 20;14(8):650-8.
- Cascone I, Giraudo E, Caccavari F, Napione L, Bertotti E, Collard JG, Serini G, Bussolino F.**, Temporal and spatial modulation of Rho GTPases during in vitro formation of capillary vascular network. Adherens junctions and myosin light chain as targets of Rac1 and RhoA. *J Biol Chem*. 2003 Dec 12;278(50):50702-13. Epub 2003 Sep 12. Erratum in: *J Biol Chem*. 2004 Aug 27;279(35):37208-9.
- Chardin P, Boquet P, Madaule P, Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM.**, The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by Clostridium botulinum exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells. *EMBO J*. 1989 Apr;8(4):1087-92.
- Chellaiah M, Fitzgerald C, Alvarez U, Hruska K.**, c-Src is required for stimulation of gelsolin-associated phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*. 1998 May 8;273(19):11908-16.
- Chen WT.**, An in vitro cell invasion assay: Determination of cell surface proteolytic activity that degrades extracellular matrix *Methods in Cell Science*, 1994 Sep;16(3-4): 177 - 181
- Chen WT, K Olden, BA Bernard, FF Chu.**, Expression of Transformation-associated Protease(s) That Degrade Fibronectin at Cell Contact Sites, *J. Cell Biol*, 1984 April;98: 1546-1555
- Chen WT.**, Membrane proteases: roles in tissue remodeling and tumour invasion. *Curr Opin Cell Biol*. 1992 Oct;4(5):802-9. Review.
- Chen WT.**, Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. *J Exp Zool*. 1989 Aug;251(2):167-85.
- Chen X, Kojima S, Borisy GG, Green KJ.**, p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J Cell Biol*. 2003 Nov 10;163(3):547-57.
- Chong AY, Freestone B, Patel J, Lim HS, Hughes E, Blann AD, Lip GY.**, Endothelial activation, dysfunction, and damage in congestive heart failure and the relation to brain natriuretic peptide and outcomes. *Am J Cardiol*. 2006 Mar 1;97(5):671-5. Epub 2006 Jan 10.
- Cooper JA, Schafer DA.**, Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr Opin Cell Biol*. 2000 Feb;12(1):97-103. Review.
- Cooper JA.**, Actin dynamics: tropomyosin provides stability. *Curr Biol*. 2002 Aug 6;12(15):R523-5.
- Cooper JA.**, Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol*. 1987 Oct;105(4):1473-8. Review. No abstract available.
- Cory GO, Ridley AJ.**, Cell motility: braking WAVES. *Nature*. 2002 Aug 15;418(6899):732-3. No abstract available. Erratum in: *Nature* 2002 Sep 26;419(6905):354.
- DeMali KA, Barlow CA, Burridge K.**, Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J Cell Biol*. 2002 Dec 9;159(5):881-91. Epub 2002 Dec 9.

- Deryugina EI, Bourdon MA, Jungwirth K, Smith JW, Strongin AY.**, Functional activation of integrin alpha V beta 3 in tumor cells expressing membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Int J Cancer*. 2000 Apr 1;86(1):15-23.
- Destaing O, Saltel F, Geminard JC, Jurdic P, Bard F.**, Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Mol Biol Cell*. 2003 Feb;14(2):407-16.
- Devriendt K, Kim AS, Mathijs G, Frints SG, et al:** Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nat Genet* 27, 313-317 (2001).
- Dove AW,** Urge to merge erects filopodia: *J. Cell Biol*. 2003, 160: 285.
- Dzurik R, Spustova V, Gajdos M.**, Nitric oxide modulation of metabolic and haemodynamic balance. *Bratisl Lek Listy*. 2005;106(8-9):252-6. Review.
- Eden S, Rohatgi R, Podtelejnikov AV, Mann M, Kirschner MW.** Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature*. 2002 Aug 15;418(6899):790-3.
- Essler M, Linder S, Schell B, Hufner K, Wiedemann A, Randhahn K, Staddon JM, Aepfelbacher M.**, Cytotoxic necrotizing factor 1 of *Escherichia coli* stimulates Rho/Rho-kinase-dependent myosin light-chain phosphorylation without inactivating myosin light-chain phosphatase in endothelial cells. *Infect Immun*. 2003 Sep;71(9):5188-93.
- Etienne-Manneville S, Hall A.**, Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 2002 Dec 12;420(6916):629-35. Review.
- Etienne-Manneville S.**, Actin and microtubules in cell motility: which one is in control? *Traffic*. 2004 Jul;5(7):470-7. Review.
- Etienne-Manneville S.**, Cdc42--the centre of polarity. *J Cell Sci*. 2004 Mar 15;117(Pt 8):1291-300. Review.
- Evans J., Correia, I., Krasavina, O., Watson, N. und Matsudaira, P.** (2003). Macrophage podosomes assemble at the leading lamella by growth and fragmentation. *J Cell Biol* 161, 697-705.
- Fieber C, Baumann P, Vallon R, Termeer C, Simon JC, Hofmann M, Angel P, Herrlich P, Sleeman JP.**, Hyaluronan-oligosaccharide-induced transcription of metalloproteases. *J Cell Sci*. 2004 Jan 15;117(Pt 2):359-67. Epub 2003 Dec 2.
- Fucini RV, Navarrete A, Vadakkan C, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Stames M.**, Activated ADP-ribosylation factor assembles distinct pools of actin on golgi membranes. *J Biol Chem*. 2000 Jun 23;275(25):18824-9.
- Fukata M, Kaibuchi K.**, Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Dec;2(12):887-97. Review.
- Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K.**, Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci*. 2001 Jan;22(1):32-9. Review.
- Galvez BG, Matias-Roman S, Yanez-Mo M, Vicente-Manzanares M, Sanchez-Madrid F, Arroyo AG.**, Caveolae are a novel pathway for membrane-type 1 matrix metalloproteinase traffic in human endothelial cells. *Mol Biol Cell*. 2004 Feb;15(2):678-87. Epub 2003 Dec 2.
- Garlanda C, Dejana E.**, Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Jul;17(7):1193-202. Review.
- Gavazzi I, Nermut MV, Marchisio PC.**, Ultrastructure and gold-immunolabelling of cell-substratum adhesions (podosomes) in RSV-transformed BHK cells. *J Cell Sci*. 1989 Sep;94 (Pt 1):85-99.
- Genersch E, Hayess K, Neuenfeld Y, Haller H.**, Sustained ERK phosphorylation is necessary but not sufficient for MMP-9 regulation in endothelial cells: involvement of Ras-dependent and -independent pathways. *J Cell Sci*. 2000 Dec;113 Pt 23:4319-30.
- Gherzi G, Dong H, Goldstein LA, Yeh Y, Hakkinen L, Larjava HS, Chen WT.**, Regulation of fibroblast migration on collagenous matrix by a cell surface peptidase complex. *J Biol Chem*. 2002 Aug 9;277(32):29231-41. Epub 2002 May 22.
- Giannone G, Dubin-Thaler BJ, Dobereiner HG, Kieffer N, Bresnick AR, Sheetz MP.**, Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves. *Cell*. 2004 Feb 6;116(3):431-43.
- Grinnell F.**, Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol*. 2003 May;13(5):264-9. Review.
- Guenzi E, Topolt K, Lubeseder-Martellato C, Jorg A, Naschberger E, Benelli R, Albin A, Sturzl M.**, The guanylate binding protein-1 GTPase controls the invasive and angiogenic capability of endothelial cells through inhibition of MMP-1 expression. *EMBO J*. 2003 Aug 1;22(15):3772-82.
- Hall A.**, 1998, Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. 1998 Jan 23;279(5350):509-14. Review.

- Hansen MD, Ehrlich JS, Nelson WJ.**, Molecular mechanism for orienting membrane and actin dynamics to nascent cell-cell contacts in epithelial cells. *J Biol Chem.* 2002 Nov 22;277(47):45371-6. Epub 2002 Sep 18.
- Hayakawa H, Coffee K, Raji L.**, Endothelial dysfunction and cardiorenal injury in experimental salt-sensitive hypertension: effects of antihypertensive therapy. *Circulation.* 1997 Oct 7;96(7):2407-13.
- Hayashi K, Ishikawa R, Kawai-Hirai R, Takagi T, Taketomi A, Shirao T.**, Domain analysis of the actin-binding and actin-remodeling activities of drebrin. *Exp Cell Res.* 1999 Dec 15;253(2):673-80.
- Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Soria E, Lamas S.**, Involvement of Rho GTPases in the transcriptional inhibition of preproendothelin-1 gene expression by simvastatin in vascular endothelial cells. *Circ Res.* 2000 Sep 29;87(7):616-22.
- Higgs HN, Pollard TD.**, Regulation of actin polymerization by Arp2/3 complex and WASp/Scar proteins. *J Biol Chem.* 1999 Nov 12;274(46):32531-4. Review. No abstract available.
- Hoang MV, Whelan MC, Senger DR.**, Rho activity critically and selectively regulates endothelial cell organization during angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Feb 17;101(7):1874-9. Epub 2004 Feb 9.
- Hojo Y, Ikeda U, Katsuki T, Mizuno O, Fujikawa H, Shimada K.**, Matrix metalloproteinase expression in the coronary circulation induced by coronary angioplasty. *Atherosclerosis.* 2002 Mar;161(1):185-92.
- Holly SP, Larson MK, Parise LV (2000).** Multiple roles of integrins in cell motility. *Exp Cell Res.* 261: 69-74. Review.
- Holmbeck K, Bianco P, Birkedal-Hansen H.**, MT1-mmp: a collagenase essential for tumor cell invasive growth. *Cancer Cell.* 2003 Aug;4(2):83-4.
- Holmbeck K, Bianco P, Chrysovergis K, Yamada S, Birkedal-Hansen H.**, MT1-MMP-dependent, apoptotic remodeling of unmineralized cartilage: a critical process in skeletal growth. *J Cell Biol.* 2003 Nov 10;163(3):661-71.
- Hopkins AM, Walsh SV, Verkade P, Boquet P, Nusrat A.**, Constitutive activation of Rho proteins by CNF-1 influences tight junction structure and epithelial barrier function. *J Cell Sci.* 2003 Feb 15;116(Pt 4):725-42.
- Hotary K, Allen E, Punturieri A, Yana I, Weiss SJ.**, Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *J Cell Biol.* 2000 Jun 12;149(6):1309-23.
- Hotary KB, Yana I, Sabeh F, Li XY, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Allen ED, Hiraoka N, Weiss SJ.**, Matrix metalloproteinases (MMPs) regulate fibrin-invasive activity via MT1-MMP-dependent and -independent processes. *J Exp Med.* 2002 Feb 4;195(3):295-308.
- Huefner K, Higgs HN, Pollard TD, Jacobi C, Aepfelbacher M, Linder S.**, The verprolin-like central (vc) region of Wiskott-Aldrich syndrome protein induces Arp2/3 complex-dependent actin nucleation. *J Biol Chem.* 2001 Sep 21;276(38):35761-7. Epub 2001 Jul 17.
- Ikeda K, Kaub PA, Asada H, Uyemura K, Toya S, Shirao T.**, Stabilization of adhesion plaques by the expression of drebrin A in fibroblasts. *Brain Res Dev Brain Res.* 1996 Feb 26;91(2):227-36.
- Ikeda K, Shirao T, Toda M, Asada H, Toya S, Uyemura K.**, Effect of a neuron-specific actin-binding protein, drebrin A, on cell-substratum adhesion. *Neurosci Lett.* 1995 Jul 21;194(3):197-200.
- Iwaki K, Ohashi K, Ikeda M, Tsujioka K, Kajiya F, Kurimoto M.**, Decrease in the amount of focal adhesion kinase (p125(FAK)) in interleukin-1beta-stimulated human umbilical vein endothelial cells by binding of human monocytic cell lines. *J Biol Chem.* 1997 Aug 15;272(33):20665-70.
- Jaffe AB, Hall A.**, Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:247-69. Review.
- Javier Redondo-Muñoz, Elizabeth Escobar-Díaz, Rafael Samaniego, María José Terol, José A. García-Marco, and Ángeles García-Pardo.** MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by $\alpha 4\beta 1$ integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration *Blood.* 2006 Nov 1;108(9):3143-51. Epub 2006 Jul 13.
- Jeong JW, Cha HJ, Yu DY, Seiki M, Kim KW.**, Induction of membrane-type matrix metalloproteinase-1 stimulates angiogenic activities of bovine aortic endothelial cells. *Angiogenesis.* 1999;3(2):167-74.
- Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A, Kinoh H, Seiki M.**, Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol.* 2001 May 28;153(5):893-904.
- Kaverina I, Rottner K, Small JV.**, Targeting, capture, and stabilization of microtubules at early focal adhesions. *J Cell Biol.* 1998 Jul 13;142(1):181-90.

- Kaverina I, Stradal TE, Gimona M.**, Podosome formation in cultured A7r5 vascular smooth muscle cells requires Arp2/3-dependent de-novo actin polymerization at discrete microdomains. *J Cell Sci.* 2003 Dec 15;116(Pt 24):4915-24.
- Kawakatsu T, Shimizu K, Honda T, Fukuhara T, Hoshino T, Takai Y.**, Trans-interactions of nectins induce formation of filopodia and Lamellipodia through the respective activation of Cdc42 and Rac small G proteins. *J Biol Chem.* 2002 Dec 27;277(52):50749-55. Epub 2002 Oct 11.
- Kawasaki Y, Sato R, Akiyama T.**, Mutated APC and Asef are involved in the migration of colorectal tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2003 Mar;5(3):211-5.
- Keon BH, Jedrzejewski PT, Paul DL, Goodenough DA.**, Isoform specific expression of the neuronal F-actin binding protein, drebrin, in specialized cells of stomach and kidney epithelia. *J Cell Sci.* 2000 Jan;113 Pt 2:325-36.
- Kessels MM, Engqvist-Goldstein AE, Drubin DG.**, Association of mouse actin-binding protein 1 (mAbp1/SH3P7), an Src kinase target, with dynamic regions of the cortical actin cytoskeleton in response to Rac1 activation. *Mol Biol Cell.* 2000 Jan;11(1):393-412.
- Kim MH.**, Flavonoids inhibit VEGF/bFGF-induced angiogenesis in vitro by inhibiting the matrix-degrading proteases. *J Cell Biochem.* 2003 Jun 1;89(3):529-38.
- Koo HY, Shin I, Lee ZW, Lee SH, Kim SH, Lee CH, Kang HS, Ha KS.**, Roles of RhoA and phospholipase A2 in the elevation of intracellular H2O2 by transforming growth factor-beta in Swiss 3T3 fibroblasts. *Cell Signal.* 1999 Sep;11(9):677-83.
- Kovacs EM, Goodwin M, Ali RG, Paterson AD, Yap AS.**, Cadherin-directed actin assembly: E-cadherin physically associates with the Arp2/3 complex to direct actin assembly in nascent adhesive contacts. *Curr Biol.* 2002 Mar 5;12(5):379-82.
- Krueger EW, Orth JD, Cao H, McNiven MA.**, A dynamin-cortactin-Arp2/3 complex mediates actin reorganization in growth factor-stimulated cells. *Mol Biol Cell.* 2003 Mar;14(3):1085-96.
- Lafleur MA, Forsyth PA, Atkinson SJ, Murphy G, Edwards DR.**, Perivascular cells regulate endothelial membrane type-1 matrix metalloproteinase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Mar 30;282(2):463-73.
- Lafleur MA, Tester AM, Thompson EW.**, Selective involvement of TIMP-2 in the second activation cleavage of pro-MMP-2: refinement of the pro-MMP-2 activation mechanism. *FEBS Lett.* 2003 Oct 23;553(3):457-63.
- Lakka SS, Gondi CS, Yanamandra N, Olivero WC, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS.**, Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis. *Oncogene.* 2004 Jun 10;23(27):4681-9.
- Lakkakorpi PT, Nakamura I, Nagy RM, Parsons JT, Rodan GA, Duong LT.**, Stable association of PYK2 and p130(Cas) in osteoclasts and their co-localization in the sealing zone. *J Biol Chem.* 1999 Feb 19;274(8):4900-7.
- Lappalainen P, Kessels MM, Cope MJ, Drubin DG.**, The ADF homology (ADF-H) domain: a highly exploited actin-binding module. *Mol Biol Cell.* 1998 Aug;9(8):1951-9. Review. No abstract available.
- Laufs S, Blau N, Thony B.**, Retrovirus-mediated double transduction of the GTPCH and PTPS genes allows 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase-deficient human fibroblasts to synthesize and release tetrahydrobiopterin. *J Neurochem.* 1998 Jul;71(1):33-40.
- Le Page Y, Demay F, Salbert G.**, A neural-specific splicing event generates an active form of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *EMBO Rep.* 2004 Sep;5(9):895-900.
- Lee MH, Murphy G.**, Matrix metalloproteinases at a glance. *J Cell Sci.* 2004 Aug 15;117(Pt 18):4015-6. Review. No abstract available.
- Lee ZW, Kweon SM, Kim BC, Leem SH, Shin I, Kim JH, Ha KS.**, Phosphatidic acid-induced elevation of intracellular Ca²⁺ is mediated by RhoA and H2O2 in Rat-2 fibroblasts. *J Biol Chem.* 1998 May 22;273(21):12710-5.
- Lehto, V.-P., Hovi, T., Vartio, T., Badley, R. und Virtanen, I.** (1982). Reorganization of cytoskeletal and contractile elements during transition of human monocytes into adherent macrophage. *Lab. Invest.* 47, 391–399.
- Lei Q, Jones MB, Talley EM, Garrison JC, Bayliss DA.** Molecular mechanisms mediating inhibition of G protein-coupled inwardly-rectifying K⁺ channels. *Mol Cell* 2003; 15: 1–9.
- Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK.**, IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol.* 2003 Mar 15;170(6):3369-76.

- Li S, Moon JJ, Miao H, Jin G, Chen BP, Yuan S, Hu Y, Usami S, Chien S.**, Signal transduction in matrix contraction and the migration of vascular smooth muscle cells in three-dimensional matrix. *J Vasc Res.* 2003 Jul-Aug;40(4):378-88. Epub 2003 Jul 29.
- Liao G, Nagasaki T, Gundersen GG.**, Low concentrations of nocodazole interfere with fibroblast locomotion without significantly affecting microtubule level: implications for the role of dynamic microtubules in cell locomotion. *J Cell Sci.* 1995 Nov;108 (Pt 11):3473-83.
- Linder S, Aepfelbacher M.**, Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol.* 2003 Jul;13(7):376-85. Review.
- Linder S, Heimerl C, Fingerle V, Aepfelbacher M, Wilske B.**, Coiling phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* by primary human macrophages is controlled by CDC42Hs and Rac1 and involves recruitment of Wiskott-Aldrich syndrome protein and Arp2/3 complex. *Infect Immun.* 2001 Mar;69(3):1739-46.
- Linder S, Hufner K, Wintergerst U, Aepfelbacher M.**, Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *J Cell Sci.* 2000 Dec;113 Pt 23:4165-76.
- Linder S, Kopp P.**, Podosomes at a glance. *J Cell Sci.* 2005 May 15;118(Pt 10):2079-82. Review. No abstract available.
- Linder S, Nelson D, Weiss M, Aepfelbacher M.**, Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Aug 17;96(17):9648-53.
- Linder S, Wintergerst U, Bender-Gotze C, Schwarz K, Pannicke U, Aepfelbacher M.**, Macrophages of patients with X-linked thrombocytopenia display an attenuated Wiskott-Aldrich syndrome phenotype. *Immunol Cell Biol.* 2003 Apr;81(2):130-6.
- Luna EJ, Pestonjamas KN, Cheney RE, Strassel CP, Lu TH, Chia CP, Hitt AL, Fehheimer M, Furthmayr H, Mooseker MS.**, Actin-binding membrane proteins identified by F-actin blot overlays. *Soc Gen Physiol Ser.* 1997;52:3-18.
- M.J. Cross, J. Dixelius, T. Matsumoto and L. Claesson-Welsh**, VEGF-receptor signal transduction, *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003), pp. 488–494.
- Mackay DJ, Hall A.**, Rho GTPases. *J Biol Chem.* 1998 Aug 14;273(33):20685-8. Review. No abstract available.
- Magdalena J, Millard TH, Etienne-Manneville S, Launay S, Warwick HK, Machesky LM.**, Involvement of the Arp2/3 complex and Scar2 in Golgi polarity in scratch wound models. *Mol Biol Cell.* 2003 Feb;14(2):670-84.
- Magdalena J, Millard TH, Machesky LM.**, Microtubule involvement in NIH 3T3 Golgi and MTOC polarity establishment. *J Cell Sci.* 2003 Feb 15;116(Pt 4):743-56.
- Mammoto A, Sasaki T, Asakura T, Hotta I, Imamura H, Takahashi K, Matsuura Y, Shirao T, Takai Y.**, Interactions of drebrin and gephyrin with profilin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Feb 4;243(1):86-9.
- Massberg S, Konrad I, Bultmann A, Schulz C, Munch G, Peluso M, Lorenz M, Schneider S, Besta F, Muller I, Hu B, Langer H, Kremmer E, Rudelius M, Heinzmann U, Ungerer M, Gawaz M.**, Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *FASEB J.* 2004 Feb;18(2):397-9. Epub 2003 Dec 4.
- Massberg S, Vogt F, Dickfeld T, Brand K, Page S, Gawaz M.**, Activated platelets trigger an inflammatory response and enhance migration of aortic smooth muscle cells. *Thromb Res.* 2003 Jun 1;110(4):187-94.
- Marchisio, P. C., Cirillo, D., Teti, A., Zambonin-Zallone, A. und Tarone, G.** (1987). Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts and cells of monocytic origin display a peculiar dot-like organization of cytoskeletal proteins involved in microfilament-membrane interactions. *Exp. Cell Res.* 169, 202-214.
- Marchisio, P. C., Cirillo, D., Naldini, L., Primavera, M. V., Teti, A. und Zambonin-Zallone, A.** (1984). Cell-substratum interaction of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures. *J. Cell Biol.* 99, 1696-1705.
- May AE, Kalsch T, Massberg S, Herouy Y, Schmidt R, Gawaz M.**, Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (alpha(IIb)beta3) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells. *Circulation.* 2002 Oct 15;106(16):2111-7.
- May RC, Hall ME, Higgs HN, Pollard TD, Chakraborty T, Wehland J, Machesky LM, Sechi AS.**, The Arp2/3 complex is essential for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *Curr Biol.* 1999 Jul 15;9(14):759-62.

- McNiven MA, Baldassarre M, Buccione R.**, The role of dynamin in the assembly and function of podosomes and invadopodia. *Front Biosci.* 2004 May 1;9:1944-53. Review.
- Meberg PJ, Bamburg JR.**, Increase in neurite outgrowth mediated by overexpression of actin depolymerizing factor. *J Neurosci.* 2000 Apr 1;20(7):2459-69.
- Miki H, Takenawa T.**, Regulation of actin dynamics by WASP family proteins. *J Biochem (Tokyo).* 2003 Sep;134(3):309-13. Review.
- Miri M, Stark H.**, Persistent random walk in a honeycomb structure: light transport in foams. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 2003 Sep;68(3 Pt 1):031102. Epub 2003 Sep 16.
- Mizutani K, Miki H, He H, Maruta H, Takenawa T.**, Essential role of neural Wiskott Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer Res.* 2002 Feb 1;62(3):669-74.
- Molecular Biology of the Cell.** 4th ed. Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter. New York: Garland Publishing; c2002
- Molecular Cell Biology.** 4th ed. Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E. New York: W. H. Freeman & Co.; c2000.)
- Monsky WL, Chen WT.**, Proteases of cell adhesion proteins in cancer. *Semin Cancer Biol.* 1993 Aug;4(4):251-8. Review.
- Moreau V, Tatin F, Varon C, Genot E.**, Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol Cell Biol.* 2003 Oct;23(19):6809-22.
- Mott JD, Werb Z.**, Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol.* 2004 Oct;16(5):558-64. Review.
- Mullins RD, Pollard TD.**, Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr Opin Struct Biol.* 1999 Apr;9(2):244-9. Review.
- Mullins RD.**, How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures. *Curr Opin Cell Biol.* 2000 Feb;12(1):91-6. Review.
- Mullins, R. D., Heuser, J. A. und Pollard, T. D.** (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 6181–6186.
- Murphy G, Knauper V, Lee MH, Amour A, Worley JR, Hutton M, Atkinson S, Rapti M, Williamson R.**, Role of TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) in pericellular proteolysis: the specificity is in the detail. *Biochem Soc Symp.* 2003;(70):65-80. Review.
- Nagata-Ohashi K, Ohta Y, Goto K, Chiba S, Mori R, Nishita M, Ohashi K, Kousaka K, Iwamatsu A, Niwa R, Uemura T, Mizuno K.**, A pathway of neuregulin-induced activation of cofilin-phosphatase Slingshot and cofilin in lamellipodia. *J Cell Biol.* 2004 May 24;165(4):465-71.
- Nakagawa H, Miki H, Ito M, Ohashi K, Takenawa T, Miyamoto S.**, N-WASP, WAVE and Mena play different roles in the organization of actin cytoskeleton in lamellipodia. *J Cell Sci.* 2001 Apr;114(Pt 8):1555-65.
- Nakahara H, Howard L, Thompson EW, Sato H, Seiki M, Yeh Y, Chen WT.**, Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jul 22;94(15):7959-64.
- Nakahara H, Nomizu M, Akiyama SK, Yamada Y, Yeh Y, Chen WT.**, A mechanism for regulation of melanoma invasion. Ligation of alpha6beta1 integrin by laminin G peptides. *J Biol Chem.* 1996 Nov 1;271(44):27221-4.
- Nishita M, Aizawa H, Mizuno K.**, Stromal cell-derived factor 1alpha activates LIM kinase 1 and induces cofilin phosphorylation for T-cell chemotaxis. *Mol Cell Biol.* 2002 Feb;22(3):774-83.
- Nobes CD, Hall A.**, Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans.* 1995 Aug;23(3):456-9. Review. No abstract available.
- Notarangelo LD, Ochs HD.**, Wiskott-Aldrich Syndrome: a model for defective actin reorganization, cell trafficking and synapse formation. *Curr Opin Immunol.* 2003 Oct;15(5):585-91. Review.
- Okabe T, Nakamura T, Nishimura YN, Kohu K, Ohwada S, Morishita Y, Akiyama T.**, RICS, a novel GTPase-activating protein for Cdc42 and Rac1, is involved in the beta-catenin-N-cadherin and N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *J Biol Chem.* 2003 Mar 14;278(11):9920-7. Epub 2003 Jan 16.
- Olazabal IM, Caron E, May RC, Schilling K, Knecht DA, Machesky LM.**, Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not FcgammaR, phagocytosis. *Curr Biol.* 2002 Aug 20;12(16):1413-18.
- Olson MF.**, Contraction reaction: mechanical regulation of Rho GTPase. *Trends Cell Biol.* 2004 Mar;14(3):111-4. Review.

- Omelchenko T, Vasiliev JM, Gelfand IM, Feder HH, Bonder EM.**, Mechanisms of polarization of the shape of fibroblasts and epitheliocytes: Separation of the roles of microtubules and Rho-dependent actin-myosin contractility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Aug 6;99(16):10452-7. Epub 2002 Jul 29.
- Ooe N, Saito K, Mikami N, Nakatuka I, Kaneko H.**, Identification of a novel basic helix-loop-helix-PAS factor, NXF, reveals a Sim2 competitive, positive regulatory role in dendritic-cytoskeleton modulator drebrin gene expression. *Mol Cell Biol*. 2004 Jan;24(2):608-16.
- Ory, S., Destaing, O. und Jurdic, P.** (2002). Microtubule dynamics differentially regulate Rho and Rac activity and triggers Rho-independent stress fiber formation in macrophage polycaryons. *Eur. J. Cell Biol* **81**, 351-362.
- Osiak AE, Zenner G, Linder S.**, Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Exp Cell Res*. 2005 Jul 15;307(2):342-53.
- Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS.**, Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004 Aug;4(8):617-29. Review. No abstract available.
- Pavlaki M, Cao J, Hymowitz M, Chen WT, Bahou W, Zucker S.**, A conserved sequence within the propeptide domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase is critical for function as an intramolecular chaperone. *J Biol Chem*. 2002 Jan 25;277(4):2740-9. Epub 2001 Nov 9.
- Pawlak G, Helfman DM.**, MEK mediates v-Src-induced disruption of the actin cytoskeleton via inactivation of the Rho-ROCK-LIM kinase pathway. *J Biol Chem*. 2002 Jul 26;277(30):26927-33. Epub 2002 May 14.
- Peitsch WK, Grund C, Kuhn C, Schnolzer M, Spring H, Schmelz M, Franke WW.**, Drebrin is a widespread actin-associating protein enriched at junctional plaques, defining a specific microfilament anchorage system in polar epithelial cells. *Eur J Cell Biol*. 1999 Nov;78(11):767-78.
- Peitsch WK, Hofmann I, Bulkescher J, Hergt M, Spring H, Bleyl U, Goerdts S, Franke WW.**, Drebrin, an actin-binding, cell-type characteristic protein: induction and localization in epithelial skin tumors and cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2005 Oct;125(4):761-74.
- Peitsch WK, Hofmann I, Endlich N, Pratzel S, Kuhn C, Spring H, Grone HJ, Kriz W, Franke WW.**, Cell biological and biochemical characterization of drebrin complexes in mesangial cells and podocytes of renal glomeruli. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Jun;14(6):1452-63.
- Peitsch WK, Hofmann I, Endlich N, Pratzel S, Kuhn C, Spring H, Grone HJ, Kriz W, Franke WW.**, Cell biological and biochemical characterization of drebrin complexes in mesangial cells and podocytes of renal glomeruli. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Jun;14(6):1452-63.
- Peitsch WK, Hofmann I, Pratzel S, Grund C, Kuhn C, Moll I, Langbein L, Franke WW.**, Drebrin particles: components in the ensemble of proteins regulating actin dynamics of lamellipodia and filopodia. *Eur J Cell Biol*. 2001 Sep;80(9):567-79.
- Persaud K, Tille JC, Liu M, Zhu Z, Jimenez X, Pereira DS, Miao HQ, Brennan LA, Witte L, Pepper MS, Pytowski B.**, Involvement of the VEGF receptor 3 in tubular morphogenesis demonstrated with a human anti-human VEGFR-3 monoclonal antibody that antagonizes receptor activation by VEGF-C. *J Cell Sci*. 2004 Jun 1;117(Pt 13):2745-56. Epub 2004 May 18.
- Petit V, Boyer B, Lentz D, Turner CE, Thiery JP, Valles AM.**, Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with CRK in NBT-II cells. *J Cell Biol*. 2000 Mar 6;148(5):957-70.
- Pollard TD, Beltzner CC.**, Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr Opin Struct Biol*. 2002 Dec;12(6):768-74. Review.
- Pollard TD, Borisy GG.**, Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 2003 Feb 21;112(4):453-65. Review. Erratum in: *Cell*. 2003 May 16;113(4):549.
- Pollard TD.**, The cytoskeleton, cellular motility and the reductionist agenda. *Nature*. 2003 Apr 17;422(6933):741-5.
- Preston A.** Metalloproteinases, *Calbiochem*, 2002 Jan 2
- Qian Y, Luo J, Leonard SS, Harris GK, Millecchia L, Flynn DC, Shi X.**, Hydrogen peroxide formation and actin filament reorganization by Cdc42 are essential for ethanol-induced in vitro angiogenesis. *J Biol Chem*. 2003 May 2;278(18):16189-97. Epub 2003 Feb 21.
- Revenu C, Athman R, Robine S, Louvard D.**, The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Aug;5(8):635-46. Review.
- Richter U, Wittler L, Kessel M.**, Restricted expression domains of Ezrin in developing epithelia of the chick. *Gene Expr Patterns*. 2004 Mar;4(2):199-204.
- Ridley AJ, Hall A.**, Snails, Swiss, and serum: the solution for Rac 'n' Rho. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2 Suppl):S23-5, 2 p following S25. No abstract available.

- Rogers SL, Wiedemann U, Stuurman N, Vale RD.**, Molecular requirements for actin-based lamella formation in *Drosophila* S2 cells. *J Cell Biol.* 2003 Sep 15;162(6):1079-88.
- Rottner K, Hall A, Small JV.**, Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol.* 1999 Jun 17;9(12):640-8.
- Rottner K, Behrendt B, Small JV, Wehland J.**, VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat Cell Biol.* 1999 Sep;1(5):321-2.
- Rousseau S, Houle F, Huot J.**, Integrating the VEGF signals leading to actin-based motility in vascular endothelial cells. *Trends Cardiovasc Med.* 2000 Nov;10(8):321-7. Review.
- Samstag Y, Eibert SM, Klemke M, Wabnitz GH.**, Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *J Leukoc Biol.* 2003 Jan;73(1):30-48. Review.
- Schafer DA, Welch MD, Machesky LM, Bridgman PC, Meyer SM, Cooper JA.**, Visualization and molecular analysis of actin assembly in living cells. *J Cell Biol.* 1998 Dec 28;143(7):1919-30.
- Schafer DA.**, Regulating actin dynamics at membranes: a focus on dynamin. *Traffic.* 2004 Jul;5(7):463-9. Review.
- Schmidt, G., Sehr, P., Wilm, M., Selzer, J., Mann, M., and Aktories, K.** (1997). Gln63 of Rho is deamidated by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1. *Nature* 387, 725-729.
- Schmidt, M., N. Lugerling, H.G. Pauels, K. Schulze-Osthoff, W. Domschke, T. Kucharzik:** IL-10 induces apoptosis in monocytes involving the CD95 receptor/ligand pathway. *Eur J Immunol* 30:1769 (2000).
- Saltel, F., Destaing, O., Bard, F., Eichert, D. und Jurdic, P.** (2004). Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts. *Mol. Biol. Cell* 15, 5231-5241.
- Schwartz M.**, Rho signalling at a glance. *J Cell Sci.* 2004 Nov 1;117(Pt 23):5457-8. Review. No abstract available.
- Sehr et al., 1998: Sehr, P., Joseph, G., Genth, H., Just, I., Pick, E., and Aktories, K.** (1998). Glucosylation and ADP-ribosylation of Rho proteins - Effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector-coupling. *Biochemistry* 37, 5296-5304.
- Seiki M, Koshikawa N, Yana I.**, Role of pericellular proteolysis by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 2003 Jun-Sep;22(2-3):129-43. Review.
- Seiki M, Mori H, Kajita M, Uekita T, Itoh Y.**, Membrane-type 1 matrix metalloproteinase and cell migration. *Biochem Soc Symp.* 2003;(70):253-62. Review.
- Seiki M.**, The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration. *Curr Opin Cell Biol.* 2002 Oct;14(5):624-32. Review.
- Shirao T, Hayashi K, Ishikawa R, Isa K, Asada H, Ikeda K, Uyemura K.**, Formation of thick, curving bundles of actin by drebrin A expressed in fibroblasts. *Exp Cell Res.* 1994 Nov;215(1):145-53.
- Soderling SH, Binns KL, Wayman GA, Davee SM, Ong SH, Pawson T, Scott JD.**, The WRP component of the WAVE-1 complex attenuates Rac-mediated signalling. *Nat Cell Biol.* 2002 Dec;4(12):970-5.
- Sounni NE, Roghi C, Chabottaux V, Janssen M, Munaut C, Maquoi E, Galvez BG, Gilles C, Frankenne F, Murphy G, Foidart JM, Noel A.**, Up-regulation of vascular endothelial growth factor-A by active membrane-type 1 matrix metalloproteinase through activation of Src-tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 2004 Apr 2;279(14):13564-74. Epub 2004 Jan 16.
- Spinardi L, Rietdorf J, Nitsch L, Bono M, Tacchetti C, Way M, Marchisio PC.**, A dynamic podosome-like structure of epithelial cells. *Exp Cell Res.* 2004 May 1;295(2):360-74.
- Stradal TE, Scita G.**, Protein complexes regulating Arp2/3-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol.* 2006 Feb;18(1):4-10. Epub 2005 Dec 15. Review.
- Suetsugu S, Hattori M, Miki H, Tezuka T, Yamamoto T, Mikoshiba K, Takenawa T.**, Sustained activation of N-WASP through phosphorylation is essential for neurite extension. *Dev Cell.* 2002 Nov;3(5):645-58.
- Svitkina T.M. and Borisy G.G.**, Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol.* 145:1009-1026. 1999.
- Svitkina TM, Bulanova EA, Chaga OY, Vignjevic DM, Kojima S, Vasiliev JM, Borisy GG.**, Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol.* 2003 Feb 3;160(3):409-21.
- Takahashi H, Sekino Y, Tanaka S, Mizui T, Kishi S, Shirao T.**, Drebrin-dependent actin clustering in dendritic filopodia governs synaptic targeting of postsynaptic density-95 and dendritic spine morphogenesis. *J Neurosci.* 2003 Jul 23;23(16):6586-95.

- Takahashi K, Sasaki T, Mammoto A, Hotta I, Takaishi K, Imamura H, Nakano K, Kodama A, Takai Y.**, Interaction of radixin with Rho small G protein GDP/GTP exchange protein Dbl. *Oncogene*. 1998 Jun 25;16(25):3279-84.
- Takahashi K, Sasaki T, Mammoto A, Takaishi K, Kameyama T, Tsukita S, Takai Y.**, Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J Biol Chem*. 1997 Sep 12;272(37):23371-5.
- Takenawa T, Miki H.**, WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci*. 2001 May;114(Pt 10):1801-9. Review.
- Tanaka J, Watanabe T, Nakamura N, Sobue K.**, Morphological and biochemical analyses of contractile proteins (actin, myosin, caldesmon and tropomyosin) in normal and transformed cells. *J Cell Sci*. 1993 Feb;104 (Pt 2):595-606.
- Tarone G, Cirillo D, Giancotti F G, Comoglio P M, Marchisio P C.** (1985). Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp. Cell Res*. **159**, 141-157.
- Teti A, H.C. Blair, P. Schlesinger, M. Grano, A. Zamboni-Zallone, A.J. Kahn, S.L. Teitelbaum and K.A. Hruska**, Extracellular protons acidify osteoclasts, reduce cytosolic calcium, and promote expression of cell-matrix attachment structures, *J. Clin. Invest.* **84** (1989), pp. 773-780.
- The Cell**, 2nd ed. Cooper, Geoffrey M. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc; c2000
- Thrasher AJ.**, WASp in immune-system organization and function. *Nat Rev Immunol*. 2002 Sep;2(9):635-46. Review.
- Thrasher AJ.**, WASp in immune-system organization and function. *Nat Rev Immunol*. 2002 Sep;2(9):635-46. Review.
- Timpson P, Jones GE, Frame MC, Brunton VG.**, Coordination of cell polarization and migration by the Rho family GTPases requires Src tyrosine kinase activity. *Curr Biol*. 2001 Nov 27;11(23):1836-46.
- Toda M, Shirao T, Minoshima S, Shimizu N, Toya S, Uyemura K.**, Molecular cloning of cDNA encoding human drebrin E and chromosomal mapping of its gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Oct 15;196(1):468-72.
- Toda M, Shirao T, Uyemura K.**, Suppression of an actin-binding protein, drebrin, by antisense transfection attenuates neurite outgrowth in neuroblastoma B104 cells. *Brain Res Dev Brain Res*. 1999 May 14;114(2):193-200.
- Torres E and Michael K.** Protein-tyrosine Kinase and GTPase Signals Cooperate to Phosphorylate and Activate Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP)/Neuronal WASP. *J. Biol. Chem.* 2006 281: 3513-3520. First Published on November 17, 2005).
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF.**, A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem*. 1994 Feb 18;269(7):5241-8.
- Vouret-Craviari V, Boquet P, Pouyssegur J, Van Obberghen-Schilling E.**, Regulation of the actin cytoskeleton by thrombin in human endothelial cells: role of Rho proteins in endothelial barrier function. *Mol Biol Cell*. 1998 Sep;9(9):2639-53.
- Welch MD, Mullins RD.**, Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2002;18:247-88. Epub 2002 Apr 2. Review.
- Wells CM, Walmsley M, Ooi S, Tybulewicz V, Ridley AJ.**, Rac1-deficient macrophages exhibit defects in cell spreading and membrane ruffling but not migration. *J Cell Sci*. 2004 Mar 1;117(Pt 7):1259-68.
- Wennerberg K, Der CJ.**, Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci*. 2004 Mar 15;117(Pt 8):1301-12. Review.
- Wheeler AP, Smith SD, Ridley AJ.**; CSF-1 and PI 3-kinase regulate podosome distribution and assembly in macrophages. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2006 Mar;63(3):132-40.
- Will H, Atkinson SJ, Butler GS, Smith B, Murphy G.** The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J Biol Chem*. 1996;271:17119-17123.
- Wojciak-Stothard B, Entwistle A, Garg R, Ridley AJ.**, Regulation of TNF-alpha-induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in human endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1998 Jul;176(1):150-65.
- Wojciak-Stothard B, Ridley AJ.**, Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol*. 2002 Nov;39(4-5):187-99. Review.
- Wojciak-Stothard B, Ridley AJ.**, Shear stress-induced endothelial cell polarization is mediated by Rho and Rac but not Cdc42 or PI 3-kinases. *J Cell Biol*. 2003 Apr 28;161(2):429-39.

- Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Brocker EB, Friedl P.**, Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol.* 2003 Jan 20;160(2):267-77. Epub 2003 Jan 13.
- Yamaguchi H, Miki H, Takenawa T.**, Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein is involved in hepatocyte growth factor-induced migration, invasion, and tubulogenesis of epithelial cells. *Cancer Res.* 2002 May 1;62(9):2503-9.
- Yamazaki D, Suetsugu S, Miki H, Kataoka Y, Nishikawa S, Fujiwara T, Yoshida N, Takenawa T.**, WAVE2 is required for directed cell migration and cardiovascular development. *Nature.* 2003 Jul 24;424(6947):452-6.
- Zambonin-Zallone A, Teti A, Carano A, Marchisio PC.**, The distribution of podosomes in osteoclasts cultured on bone laminae: effect of retinol. *J Bone Miner Res.* 1988 Oct;3(5):517-23.
- Zegers MM, O'Brien LE, Yu W, Datta A, Mostov KE.**, Epithelial polarity and tubulogenesis in vitro. *Trends Cell Biol.* 2003 Apr;13(4):169-76. Review.
- Zhang H, Berg JS, Li Z, Wang Y, Lang P, Sousa AD, Bhaskar A, Cheney RE, Stromblad S.**, Myosin-X provides a motor-based link between integrins and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol.* 2004 Jun;6(6):523-31. Epub 2004 May 23.
- Zigmond SH, Evangelista M, Boone C, Yang C, Dar AC, Sicheri F, Forkey J, Pring M.**, Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins. *Curr Biol.* 2003 Oct 14;13(20):1820-3.
- Zucker S, Mirza H, Conner CE, Lorenz AF, Drews MH, Bahou WF, Jesty J.**, Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Int J Cancer.* 1998 Mar 2;75(5):780-6.

9. Lebenslauf

Name: Osiak

Vorname: Anna-Eleonor

Adresse: Maistr.5
80337 München
Tel.: 089/20318686
E-Mail-Adresse: Anna.Osiak@campus.de

Geburtsdatum: 19. August 1974

Geburtsort: Breslau

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung: 05/1995 Abitur an der Wilhelm-Raabe-Schule, Hannover

Studium: 09/1995 – 03/2002 Biologie - Studium an der Universität Hannover

08/2000 – 09/2000 Praktikumsversuch an der Medizinischen Hochschule Hannover unter Anleitung von Dr.rer.nat. Ulrich Martin, angefertigt in den Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe (LEBAO), Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie,
Titel: Vorarbeiten für ein Nachweisverfahren ausdifferenzierter Kardiomyozyten

05/2001 mündliche Diplomprüfungen an der Universität Hannover; im Hauptstudium - Hauptfach: Genetik,
1. Nebenfach: Molekularbiologie, 2. Nebenfach: Virologie

06/2001 – 02/2002 Diplomarbeit an der Medizinischen Hochschule Hannover unter Anleitung von Prof. Dr.med. Axel Haverich, angefertigt in den Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe (LEBAO), Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie,
Titel: Expressionsklonierung xenoreaktiver Epitope- aufbauende Methode

03/2002 Abschluß: Diplom

08/2002 - 10/07 Doktorarbeit unter Leitung von PD.Dr. Stefan Linder mit dem Thema: „Charakterisierung podosomal Adhäsionsstrukturen in primären humanen Nabelschnurendothelzellen“ am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Ludwig-Maximilians-Universität München

10/2004 Studium der Humanmedizin an den Universitäten:
LMU/TU in München - 09/2007 Physikum

Weiterbildung: SS 2000 Seminar „Computeranwendungen in der Molekularbiologie
(Bioinformatik)“ an der Tierärztlichen Hochschule Hannover

04/2000 – 10/2000 Fortbildungslehrgang für „Gentechnische
Sicherheit“ an der Medizinischen Hochschule Hannover

10/2001 – 01/2002 „Grundlagen der Versuchstierkunde“ an der
Medizinischen Hochschule Hannover, Institut für
Versuchstierkunde und Zentrales Tierlaboratorium

01/2001 – 02/2002 „Perioperative Betreuung von Versuchstieren“
an der Medizinischen Hochschule Hannover, Institut für
Versuchstierkunde und Zentrales Tierlaboratorium

Führerschein: Klasse 3

München, 16.01.2007

.....

10. Anhang Inhalt der Video-CD

Für eine optimale Abspielgeschwindigkeit von der CD wurden die Filme komprimiert. In den vorliegenden Filmen (*live cell imaging*) wurden primäre humane Nabelschnurendothelzellen mit pEGFP-C1-Drebrin transfiziert.

Film 1 (220803_Drebrin_11.avi): Die Aufnahmen zeigen eine migrierende humane Nabelschnurendothelzelle, die HUVEC-Podosomen mit einer hohen Frequenz generiert. Diese podosomalen Strukturen erreichen die Zellperipherie mit der sie fusionieren und so zur Ausbildung von Protrusionen beitragen. Die Zeit seit Beginn des Filmes ist in sec in der linken oberen Ecke zu sehen. Dauer des Films: 17 sec (entspricht in Echtzeit 27 min).

Film 2 (220803_Drebrin_5.avi): Die Aufnahmen zeigen zwei migrierende humane Nabelschnurendothelzellen, die HUVEC-Podosomen generieren. Diese podosomalen Strukturen erreichen die Zellperipherie mit der sie fusionieren und so zur Ausbildung von Protrusionen beitragen. Außer als Komponente von HUVEC-Podosomen kann Drebrin an Zell-Zell-Kontakten und protrusiven, peripheren Zellbereichen detektiert werden. Die Zeit seit Beginn des Filmes ist in sec in der linken oberen Ecke zu sehen. Dauer des Films: 24 sec (entspricht in Echtzeit 22 min).

Film 3 (310703_DrebC1_6.avi): Die Aufnahmen zeigen zwei migrierende humane Nabelschnurendothelzellen, die HUVEC-Podosomen generieren. Diese podosomalen Strukturen bewegen sich innerhalb der Zelle, erreichen die Zellperipherie mit der sie fusionieren und so zur Ausbildung von Protrusionen beitragen. Außer als Komponente von HUVEC-Podosomen kann Drebrin an Zell-Zell-Kontakten und protrusiven, peripheren Zellbereichen detektiert werden. Die Zeit seit Beginn des Filmes ist in sec in der linken oberen Ecke zu sehen. Dauer des Films: 30 sec (entspricht in Echtzeit 32 min).

Film 4 (310703_DrebC1_4.avi): Die Aufnahmen zeigen zwei migrierende humane Nabelschnurendothelzellen, die HUVEC-Podosomen generieren. Die im Film rechts liegende Zelle scheint eine podosomale Struktur ausgebildet zu haben, die „stationär“ ist. Stationäre HUVEC-Podosomen konnten nur selten beobachtet werden. In Mehrzahl der Versuche zeigten HUVEC-Podosomen eine hohe Dynamik in Aufkommen und Auflösen bzw. Fusion mit der Membran. Die Zeit seit Beginn des Filmes ist in sec in der linken oberen Ecke zu sehen. Dauer des Films: 12 sec (entspricht in Echtzeit 40 min).

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herr Prof. Dr. med.P.C.Weber danke ich für die freundliche Aufnahme im Institut, wie auch für die Anregungen und das stete Interesse mit der Er meine Doktorarbeit begleitet hat.

Herrn Dr.med. Martin Äpfelbacher und PD Dr. Stefan Linder danke ich für die Vergabe des Themas, das große Interesse an dieser Arbeit und für die anregenden Diskussionen während der Durchführung, die sie zu dem machten, was sie nun ist. Meinem Betreuer PD Dr. Stefan Linder möchte ich auch gesondert Danke sagen, Danke für das Vertrauen, den Freiraum und das Begleiten dieser Arbeit!

Ebenfalls gilt mein Dank Dr. rer. nat. Barbara Schell und der Dr. rer. nat. Petra Kopp und den gesamten Doktorandenteam aus dem Gartenpavillon, für die gute Zusammenarbeit und für die netten Stunden inner- und außerhalb des Labors.

Dankbar bin ich auch den Doktoranden Andreas Schröder, Gerhard Zenner für die netten Gespräche, die Anregungen und wertvollen Ideen zum Thema live cell imaging, sowie für die gute Labornachbarschaft zur Arbeitsgruppe-Äpfelbacher aus dem Pettenkofferinstitut.

Frau Barbara Böhlig, der technischen Assistentin, danke ich für die tatkräftige und kompetente Unterstützung wie auch für die vielen angenehmen Arbeitsstunden.

Mein aufrichtiger Dank gilt meiner Familie, insbesondere meiner Mutter Frau Magister Marianne Osiak und ihrem Bruder Herr Pfarrer Johannes Lampczak, die mir durch ihre großzügige Unterstützung und stete Hilfe meine Ausbildung erst ermöglichten, der ich diese Arbeit somit auch widmen möchte.

Nicht zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei all meinen Freunden bedanken, die immer zu mir gestanden haben und mich immer wieder neu motivierten und bei meinem Freund Thomas Schlecht, der dazu den größten Anteil beitrug – alea iacta est ... thanks, Danke & merci. Ich habe fertig!