

Funktion der Transmembranproteine ESAM und JAM-A bei Zell-Zell Interaktionen

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Ines Nasdala

geboren am 11. Mai 1974 in Hannover

2004

Referent:

Prof. Dr. Walter Müller

Korreferent:

Prof. Dr. Dietmar Vestweber

Tag der Promotion:

04. August 2004

Zusammenfassung

Endothelzellen spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der vaskulären Permeabilität, der Einwanderung von Leukozyten ins Gewebe und der Bildung von Blutgefäßen. Im endothelialen Zellkontaktbereich sind verschiedene Proteine der CTX Genfamilie lokalisiert, die eine Unterfamilie der Immunglobulin Superfamilie darstellt. Charakterisiert sind diese Proteine durch eine variable V und eine konstante C2 Immunglobulin-Domäne, eine Transmembranregion und einen cytoplasmatischen Teil von 40-170 Aminosäuren. Für Mitglieder dieser Proteinfamilie ist eine Beteiligung an der transendothelialen Migration von Leukozyten und dem Aufbau von Zellkontakten nachgewiesen.

Mit dem monoklonalen Antikörper V1G8 wurde ein bisher unbekanntes endotheliales Protein identifiziert. Während der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Charakterisierung des 1G8 Antigens, wurde von der Arbeitsgruppe Quertermous das *endothelial cell selective adhesion molecule* (ESAM) beschrieben (Hirata et al., 2001). Die Sequenz beider Proteine ist identisch und die Bezeichnung ESAM wurde von uns übernommen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ESAM kloniert und als neues Mitglied der CTX Genfamilie identifiziert. Aufgrund seines längeren cytoplasmatischen Bereichs und des PDZ-Domänen Bindungsmotivs Typ I bildet ESAM zusammen mit MCAR, BT-IgSF und JAM4 eine Unterfamilie innerhalb der CTX Genfamilie. Im Gegensatz zu JAM-A, JAM-B und JAM-C, die eine andere Unterfamilie bilden, bindet ESAM nicht an cytoplasmatische Proteine wie beispielsweise ZO-1 oder PAR-3.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sprechen dafür, dass ESAM ein Zelladhäsionsmolekül ist, weil es homophile Bindung *in trans* eingehen kann. Außerdem unterstützt es die Bildung von Zellaggregaten in CHO Transfektanten. Eine heterophile Interaktion *in trans* mit MCAR, JAM-A, JAM-B oder JAM-C konnte jedoch nicht festgestellt werden. ESAM wird spezifisch von Endothelzellen in verschiedenen Geweben und nach Aktivierung auch auf Thrombozyten exprimiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Tight Junction Lokalisation in transfizierten MDCK Zellen nachgewiesen werden, die durch eine Kolo-kalisation von ESAM mit den Tight Junction Proteinen Occludin, Claudin-5 und ZO-1 im Gewebe von Muskel und Gehirn durch Immunogoldmarkierung bestätigt wurde.

Weder in Permeabilitätsexperimenten noch bei Impedanz-Messungen konnte nach ektopischer Expression von ESAM ein Einfluß auf den Zellkontakt detektiert werden. Somit gibt es bisher keine Anzeichen dafür, dass ESAM an der Regulation der Permeabilität beteiligt ist. Bei *in vitro* Transmigrationsexperimenten mit Neutrophilen, naiven T-Zellen und autoreaktiven PLP3 T-Zellen wurde selbst beim Einsatz polyklonaler Antikörper keine Inhibition nachgewiesen. Deshalb gibt es für eine Funktion von ESAM bei der transendothelialen Migration von Leukozyten ebenfalls keine Indizien. Erste Hinweise für eine Funktion des endothelspezifischen ESAM gibt es durch eine ESAM knock-out Maus, bei der für das Protein eine redundante Funktion bei der physiologischen Angiogenese, jedoch eine essentielle Rolle bei der pathologischen Angiogenese festgestellt wurde (Ishida et al., 2003).

Für JAM-A gibt es widersprüchliche Angaben über eine Beteiligung an der transendothelialen Migration von Leukozyten. Die in dieser Arbeit charakterisierten polyklonalen JAM-A Antikörper konnten spezifisch die transendotheliale Migration von Neutrophilen, jedoch nicht von naiven und autoreaktiven PLP3 T-Zellen, signifikant und konzentrationsabhängig inhibieren. Zudem konnte zum ersten Mal eine Expression von murinem JAM-A auf Granulozyten des peripheren Blutes gezeigt werden, jedoch nicht auf Granulozyten aus dem Knochenmark, die für die *in vitro* Experimente eingesetzt wurden. Somit ist eine heterophile Interaktion von JAM-A auf Endothelzellen mit einem Liganden auf Leukozyten an der Kontrolle der transendothelialen Migration beteiligt. Mit demselben anti-JAM-A pAk konnte sowohl der Aufbau von Zellkontakten verzögert als auch die Integrität der Tight Junction gestört werden. In der Summe zeigen diese Ergebnisse, dass eine heterophile Interaktion von JAM-A spezifisch an der transendothelialen Migration von Granulozyten beteiligt ist. Zudem ist JAM-A am Aufbau und Erhalt von Zellkontakten beteiligt.

Schlagnworte: Tight Junctions, ESAM, JAM-A

Abstract

Endothelial cells play an important role in the control of the vascular permeability, the extravasation of leukocytes into tissue, and in the formation of blood vessels. Among the proteins found in endothelial cell contacts are members of the CTX gene family, which makes up a subfamily of the immunoglobulin superfamily. These transmembrane proteins are characterized by a variable V and a constant C2 immunoglobulin domain, a transmembrane segment and a cytoplasmic tail of 40-170 amino acids. Members of this protein family have been described to play a role in the transendothelial migration of leukocytes and the establishment of cell contacts.

An until then unknown endothelial protein was identified by the monoclonal antibody V1G8. During the course of this work the endothelial cell selective adhesion molecule (ESAM) was described by the group of Quertermous (Hirata et al., 2001). The sequences of both proteins are identical and the name ESAM was taken over by us.

During the course of this work ESAM could be cloned and identified as a new protein of the CTX gene family. Due to its longer cytoplasmic tail and its PDZ binding motif type I, ESAM, along with MCAR, BT-IgSF, and JAM4, belongs to a further subfamily within the CTX gene family. In contrast to JAM-A, JAM-B, and JAM-C, who make up yet another subfamily, ESAM does not bind to cytoplasmatic proteins like, for example, ZO-1 or PAR-3.

In the course of this work, it could be shown that ESAM is a cell adhesion molecule because it can undertake homophilic interaction *in trans*. Furthermore, it supports cell aggregation in CHO transfectants. However, a heterophilic interaction *in trans* with MCAR, JAM-A, JAM-B, or JAM-C could not be shown. ESAM is expressed specifically on endothelial cells in different tissues and, after activation, also on thrombocytes. In the course of this work, a tight junction localization in transfected MDCK cells could be shown, which was confirmed in immunogold staining by colocalization of ESAM with the tight junction proteins occludin, claudin-5, and ZO-1 in tissues of muscle and brain. After ectopic expression of ESAM, an effect on the cell contacts could be detected neither in permeability assays nor in electric cell-substrate impedance sensing experiments. Therefore, so far there is no sign that ESAM participates in the regulation of permeability. During *in vitro* transmigration assays with neutrophils, naive T-cells, and autoreactive PLP3 T-cells, no inhibition could be detected even when using polyclonal antibodies. Therefore, there are also no clues for a function of ESAM during the transendothelial migration of leukocytes. A first indication for a function of the endothelial-specific ESAM can be found in the ESAM knock-out mouse, in which the protein seems to have a redundant function in the physiological angiogenesis, but an essential role in the pathological angiogenesis (Ishida et al., 2003).

For JAM-A, there are contradictory signs for a participation in the transendothelial migration of leukocytes. The polyclonal JAM-A antibody characterized in this work was able to specifically inhibit the transendothelial migration of neutrophils significantly and dose-dependent, but could not inhibit the transmigration of naive and autoreactive T-cells. Furthermore, for the first time, an expression of murine JAM-A on granulocytes of the peripheral blood, but not on granulocytes of the bone marrow, which were used for *in vitro* experiments, could be shown. Therefore, a heterophilic interaction of JAM-A on endothelial cells with a ligand on leukocytes participates in the control of transendothelial migration. With the same anti-JAM-A pAb, the build-up of cell contacts as well as the integrity of the tight junctions could be disturbed. Summed up, these results show that a heterophilic interaction of JAM-A participates specifically in the transendothelial migration of granulocytes. Furthermore, JAM-A participates in the build-up and maintenance of cell contacts.

Keywords: Tight Junctions, ESAM, JAM-A

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation mit dem Thema „**Funktion der Transmembranproteine ESAM und JAM-A bei Zell-Zell Interaktionen**“ selbständig verfasst, die benutzten Hilfsmittel, Quellen und zur Hilfsleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben und die Dissertation noch nicht als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet habe.

Dies ist mein erstes Promotionsgesuch.

Münster, den 30. Juni 2004

(Dipl.-Biochem. Ines Nasdala)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dietmar Vestweber vom Institut für Zellbiologie (ZMBE) in Münster für die Bereitstellung des Arbeitsthemas, sein Interesse und die stete Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Dr. Walter Müller bedanke ich mich für die Vertretung und Betreuung meiner Doktorarbeit im Fachbereich Chemie der Universität Hannover und sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Herrn Dr. S. Butz danke ich für die Betreuung und den wissenschaftlichen Austausch während der Doktorarbeit.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Dr. K. Ebnet für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen, seine Unterstützung und die kritische Durchsicht dieses Manuskripts.

Bei Herrn Dr. Joachim Wegener vom Institut für Biochemie der Universität Münster möchte ich mich für die geduldige Einführung in die ECIS-Technik und die Betreuung meiner Experimente bedanken.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Institut für Zellbiologie (ZMBE) und des MPI für molekulare Biomedizin danke ich für das angenehme Arbeitsklima, die Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit. Dabei geht ein besonders herzlicher Dank an Daniela Rehder und Axinia Döring, die immer da waren, wenn man sie brauchte.

Ein großer Dank geht auch an meine Freunde, die mich durch alle Zeiten begleitet haben.

Meinen Eltern und Geschwistern nebst Familie danke ich für die Unterstützung in allen Bereichen. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht in dieser Form zustande gekommen. Mein besonderer Dank geht an meine Mutter und meinen Bruder Lutz, die mir besonders in den letzten Wochen mit Rat und Tat zur Seite standen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	iii
Abstract.....	iv
Erklärung	v
Danksagung	vi
Inhaltsverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	x
1 Einleitung	1
1.1 Zellverbindungen	1
1.1.1 Tight Junctions.....	2
1.1.2 Adherens Junctions	7
1.1.3 <i>Complexi Adhaerentes</i>	8
1.1.4 Gap Junctions.....	8
1.2 Leukozyten-Adhäsionskaskade.....	9
1.2.1 Anhaftung und Rollen.....	10
1.2.2 Aktivierung	12
1.2.3 Feste Adhäsion.....	12
1.2.4 Transmigration.....	13
2 Zielsetzung	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Material	19
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	19
3.1.2 Kits und spezielle Reagenzien	22
3.1.3 Enzyme	23
3.1.4 Medien und Puffer	23
3.1.5 Verbrauchsmaterialien	24
3.1.6 Antikörper und andere Nachweisreagenzien.....	26
3.1.7 Oligonukleotide	28
3.1.8 Vektoren	29
3.1.9 Rekombinante Plasmide.....	30
3.1.10 Bakterienstämme	32
3.1.11 Zelllinien.....	32
3.1.12 Stabil transfizierte Zelllinien.....	33
3.1.13 Versuchstiere	33
3.1.14 Spezielle Geräte	33
3.1.15 Software und Internet-Adressen.....	35

3.2	Methoden	36
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	36
3.2.2	Zellbiologische Methoden	45
3.2.3	Proteinchemie und immunbiochemische Methoden	55
3.2.4	Funktionelle Experimente	68
4	Ergebnisse	75
4.1	Klonierung und Charakterisierung von ESAM	75
4.1.1	Vorarbeiten	75
4.1.2	Die monoklonalen Ratten Antikörper V1G8 und V4C10 erkennen ein 55 kDa Protein in Lysaten der Endotheliomazelllinie bEnd3	76
4.1.3	Klonierung von ESAM	77
4.1.4	Proteinstruktur und Charakterisierung von ESAM	79
4.1.5	Klonierung von MCAR	82
4.1.6	Herstellung und Charakterisierung polyklonaler Antikörper gegen die cytoplasmatische Domäne von ESAM	82
4.1.7	Herstellung und Charakterisierung polyklonaler Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von ESAM und MCAR	84
4.1.8	Herstellung und Charakterisierung stabil mit ESAM transfizierter CHO Zellen	88
4.1.9	Herstellung und Charakterisierung stabil mit MCAR transfizierter CHO Zellen	89
4.1.10	Homophile und heterophile Interaktionen zwischen Proteinen der CTX Genfamilie	90
4.1.11	ESAM ist ein Tight Junction Protein	94
4.1.12	Die Expression von ESAM in stabil transfizierten MDCK C7 ist konfluenzabhängig	97
4.1.13	Charakterisierung der ESAM Expression in stabil transfizierten MDCK II Zellen	98
4.1.14	Konstitutive Expression von ESAM in der Endotheliomazelllinie bEnd5	101
4.2	Funktionelle Analysen von ESAM	102
4.2.1	Die ektopische Expression von ESAM hat keinen reproduzierbaren Einfluss auf die Permeabilität bei <i>in vitro</i> Experimenten	102
4.2.2	Die ektopische Expression von ESAM hat keinen Einfluss auf den transepithelialen elektrischen Widerstand von CHO Transfektanten	104
4.2.3	ESAM hat keinen Einfluss auf den Aufbau des transepithelialen elektrischen Widerstandes bei transfizierten MDCK II	104
4.2.4	ESAM hat keinen Effekt beim Schließen von Zellkontakten in transfizierten MDCK II	105
4.2.5	Antikörper gegen ESAM können die transendotheliale Migration von neutrophilen Granulozyten <i>in vitro</i> nicht inhibieren	107
4.3	Funktionelle Analyse von mJAM-A	115
4.3.1	Polyklonale Antikörper gegen JAM-A inhibieren die transendotheliale Migration von neutrophilen Granulozyten durch bEnd5 Monolayer <i>in vitro</i>	115
4.3.2	JAM-A hat keinen Einfluss auf die transendotheliale Migration von PLP3 T-Zellen <i>in vitro</i>	117
4.3.3	Polyklonale JAM-A Antikörper können die transendotheliale Migration von naiven T-Zellen nicht beeinflussen	118
4.3.4	Murines JAM-A wird auf einer Subpopulation von Neutrophilen des peripheren Blutes exprimiert	119
4.3.5	Keine Expression von murinem JAM-A auf neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark	121
4.3.6	Polyklonale Antikörper gegen JAM-A inhibieren den Aufbau des transepithelialen elektrischen Widerstandes	122

5	Diskussion	125
5.1	Klonierung eines durch den monoklonalen Antikörper V1G8 erkannten Antigens	125
5.2	ESAM ist Mitglied der CTX Genfamilie	126
5.3	ESAM wird spezifisch von Endothelzellen und aktivierten Thrombozyten exprimiert.....	127
5.4	ESAM ist ein Zelladhäsionsmolekül	128
5.5	ESAM ist ein Tight Junction-assoziiertes Molekül	129
5.6	Einfluss von ESAM auf die Barriereigenschaften von Tight Junctions.....	131
5.7	Einfluss von ESAM auf die Zellkontaktbildung.....	132
5.8	Funktion von ESAM bei der Öffnung endothelialer Zellkontakte während der transendothelialen Migration von Leukozyten	132
5.9	Ausblick für ESAM Studien	133
5.10	JAM-A Antikörper inhibieren die transendotheliale Migration von Granulozyten.....	134
5.11	Expression von murinem JAM-A auf Granulozyten	135
5.12	Einfluss von JAM-A auf den Wiederaufbau der Zellkontakte und die Integrität der Tight Junction	136
	Literatur	137
	Lebenslauf	156
	Publikationsliste	157

Abkürzungsverzeichnis

Zur Bezeichnung physikalischer Größen werden SI-Einheiten verwendet. Nukleotide und Aminosäuren werden mit den gängigen Abkürzungen bezeichnet. Selten verwendete Abkürzungen werden im Text erläutert, alle weiteren sind im Folgenden aufgelistet:

α	repräsentativer Parameter für Zell-Substrat Kontakt (ECIS)
α -MEM	<i>α-Minimum Essential Medium</i>
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
aPKC	<i>atypical protein kinase C</i>
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
BT-IgSF	<i>brain- and testis-specific immunoglobulin superfamily</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CAR	Coxsackievirus und Adenovirus Rezeptor
CLMP	<i>CAR-like membrane protein</i>
C_m	repräsentativer Parameter für Kapazität der Zellmembran (ECIS)
CTX	<i>cortical thymocyte marker, Xenopus</i>
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dox	Doxycyclin
DTAF	Dichlorotriazinylamino-Fluorescein
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECGS	<i>endothelial cell growth supplement</i>
ECIS	<i>electric cell-substrate impedance sensing</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylen-bis-(oxyethylenitrilo)-tetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESAM	<i>endothelial cell-selective adhesion molecule</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H ₂ O _{MilliQ}	Milli-Q H ₂ O
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i>
HCAR	humaner Coxsackie- und Adenovirus Rezeptor
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]
HEV	<i>high endothelial venules</i> (postkapilläre Venolen mit hohem Endothel)

ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
JAM	<i>junctional adhesion molecule</i>
JAML	<i>junctional adhesion molecule-like</i>
kDa	Kilodalton
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LNX	<i>ligand-of-numb protein X</i>
Min	Minute
MAGUK	Membran-assoziierte Guanylatkinasen
mAk	monoklonaler Antikörper
MCAR	muriner Coxsackie- und Adenovirus Rezeptor
OPD	o-Phenylendiamine Dihydrochlorid
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektroporese
pAk	polyklonaler Antikörper
Pals1	<i>Protein Associated with Lin Seven 1</i>
PAR	<i>Partitioning Defective Protein</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PECAM-1	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</i>
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PLP	<i>myelin proteolipid protein</i>
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R _b	repräsentativer Parameter für Zell-Zell Kontakt (ECIS)
R-PE	R-Phycoerythrin
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TER	transepithelialer/transendothelialer elektrischer Widerstand
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VLA-4	<i>very late-antigen-4</i>
ZO	<i>zonula occludens</i>
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

1 Einleitung

Der Mensch ist ein vielzelliger Organismus mit über 200 verschiedenen Zelltypen, die mit ihren spezialisierten Funktionen eine Vielzahl von Geweben bilden, die wiederum zu größeren funktionellen Einheiten, den Organen, zusammengefasst werden. Eines dieser hoch spezialisierten Gewebe stellt das Epithel dar, das aus einer oder mehreren Schichten von **Epithelzellen** aufgebaut ist. Epithelien kleiden alle Hohlräume aus und bedecken frei zugängliche Körperoberflächen. Die Versorgung der verschiedenen Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen wird durch das Blutgefäßsystem gewährleistet, dessen einzelne Gefäßabschnitte sich in ihrem Aufbau unterscheiden. Arterien und Venen als größte Blutgefäße bestehen aus einer dicken, belastbaren Schicht aus Bindegewebe und mehreren Lagen glatter Muskelzellen. Ausgekleidet werden alle Gefäße mit einer einzelligen Schicht aus **Endothelzellen**, einem dünnen einschichtigen Plattenepithel, das einer Basalmembran aufliegt. Die Menge an Bindegewebe und glatten Muskelzellen variiert je nach Funktion und Durchmesser des Gefäßes. So besteht die Wand bei Kapillaren und Sinusoiden ausschließlich aus Endothelzellen und Basalmembran, die von einigen verstreuten Pericyten umfasst wird. Epithel- und Endothelzellen ist gemeinsam, dass sie Zellverbindungen ausbilden, deren Struktur und Funktion im folgenden Abschnitt vorgestellt werden soll.

1.1 Zellverbindungen

Aufgrund ihrer Funktion kann man Zellkontakte zwischen Endothel- oder Epithelzellen in verschiedene Gruppen unterteilen (Alberts et al., 2004): **Undurchlässige Verbindungen** wie die Tight Junctions in Vertebraten bilden eine Diffusionsbarriere, durch die der parazelluläre Transport von Ionen, Makromolekülen und Zellen kontrolliert wird (Anderson et al., 1995; Diamond, 1977; Gumbiner, 1987; Schneeberger et al., 2004). **Ankerverbindungen** sind Anheftungsstellen für Filamente des Cytoskeletts und sorgen für eine Verteilung der mechanischen Belastung auf den gesamten Zellverband. Bei den Adhäsionsverbindungen (Adherens Junctions) wird über einen Zell/Zell-Kontakt eine Verbindung mit den Aktinfilamenten geknüpft (Farquhar et al., 1963). Eine Verankerung der Intermediärfilamente mit der Plasmamembran findet an den Zell/Zell-Verbindungen der Desmosomen und den Zell/Matrix-Kontakten der Hemidesmosomen statt (Garrod, 1986). **Kommunizierende Verbindungen** vermitteln die Diffusion chemischer Signale (Gap Junctions) zwischen zwei benachbarten Zellen (Pitts et al., 1986).

In den meisten Epithelien sind Tight Junctions im apikalen Bereich der Zellen lokalisiert. Im Gegensatz dazu sind in Endothelzellen Tight und Adherens Junctions häufig entlang des gesamten Interzellularspalts miteinander vermischt (Simionescu, 2000). Die Organisation der Zellkontakte variiert hier in Zusammensetzung und Morphologie innerhalb des Gefäßsystems (Simionescu et al., 1975; Simionescu et al., 1976; Simionescu et al., 1991). Tight Junctions sind besonders gut im Endothel der Blut-Hirn-Schranke und in großen Ar-

terien ausgebildet, während sie in postkapillären Venolen, wo die Extravasation von Leukozyten hauptsächlich stattfindet, nur rudimentär vorhanden sind. Adherens Junctions hingegen sind in allen Gefäßabschnitten ubiquitär vorhanden. Ein weiterer Unterschied zwischen Zellkontakten in Epithel und Endothel ist das Fehlen von Desmosomen in Endothelzellen (Dejana et al., 1995). Es gibt allerdings in einigen speziellen Endothelien, wie denen des lymphatischen Systems oder der Venen, Desmosomen-ähnliche Strukturen, die als *complexi adherentes* bezeichnet werden (Schmelz et al., 1993). Auf einzelne Zellverbindungen soll in den folgenden Kapiteln näher eingegangen werden.

1.1.1 Tight Junctions

Die Tight Junctions oder *zonula occludens* sind in polarisierten Epithelzellen im apikalen Bereich des Zellkontakts lokalisiert und räumlich von den Adherens Junctions getrennt. In der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie erscheinen sie als ein verzweigtes Netzwerk von Proteinsträngen, das die Zelle vollständig umgibt (Anderson et al., 1993; Gumbiner, 1993). Sie dichten den Interzellularspalt ab und dienen als selektive Permeabilitätsbarriere (Anderson et al., 1995). Zudem erhalten sie die Zellpolarität, da sie als laterale Diffusionsbarriere für Membranproteine und -lipide zwischen apikaler und basolateraler Membran fungieren (Tsukita et al., 2001). Die Proteinstränge der Tight Junctions bestehen aus transmembranen Zelladhäsionsproteinen, die durch Interaktionen *in trans* den Zwischenraum zwischen benachbarten Zellen weitgehend verschließen. An die Transmembranproteine können verschiedene periphere cytoplasmatische Proteine binden.

1.1.1.1 Occludin

Als erstes Transmembranprotein der Tight Junctions wurde Occludin identifiziert (Furuse et al., 1993). Durch Immunogoldmarkierung konnte es in der *zonula occludens* von Epithelien und Endothelien nachgewiesen werden. Das 65 kDa Protein besitzt vier Transmembrandomänen. Es ist zwar eine funktionelle Komponente der Tight Junctions (McCarthy et al., 1996), dennoch ändert sich in Occludin-defizienten Epithelzellen weder die Zahl noch die Morphologie der Tight Junction Stränge (Saitou et al., 1998). Auch bei Occludin knock-out Mäusen weisen epitheliale Tight Junctions keine morphologischen Veränderungen auf (Saitou et al., 2000).

1.1.1.2 Claudine

Im Gegensatz zu Occludin sind die Proteine der Claudin-Genfamilie essentiell für die Ausbildung von Tight Junctions. Die Transfektion von Fibroblasten mit Claudin-1 oder Claudin-2 cDNA führt zur Ausbildung kontinuierlicher Proteinstränge, in die Occludin eingelagert wird (Furuse et al., 1998; Furuse et al., 1998; Tsukita et al., 1999). Alle Claudine haben vier Transmembrandomänen, kurze cytoplasmatische N- und C-terminale Enden und ein Molekulargewicht von 20-27 kDa (Tsukita et al., 2001). Mittlerweile sind 24 Proteine dieser Genfamilie bekannt, die ein gewebespezifisches Expressionsmuster aufweisen. So

wird Claudin-5 beispielsweise in verschiedenen Geweben einschließlich Muskel und Gehirn endothelspezifisch exprimiert (Morita et al., 1999). Bei einer linearen Zunahme der Tight Junction Stränge erhöht sich der transepitheliale elektrische Widerstand (TER) logarithmisch (Claude, 1978), was zur Postulierung extrazellulärer, wassergefüllter Poren führte. Somit könnte man die mit einer Mutation von Claudin-16 verbundene kongenitale Hypomagnesiämie durch das Fehlen eines parazellulären Kanals für Mg^{2+} erklären (Cole et al., 2000). Ein weiteres Indiz für die Ausbildung wassergefüllter Kanäle ist bei Claudin-5 knock-out Mäusen die erhöhte Permeabilität für Moleküle kleiner als 800 Da (Nitta et al., 2003). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass sich die beiden Hundenieren-Epithelzelllinien MDCK I (hochohmig) und MDCK II (niederohmig) in ihrer Claudin-Expression unterscheiden. MDCK I Zellen exprimieren im Gegensatz zu MDCK II kein Claudin-2. Durch eine Transfektion mit Claudin-2 wird der transepitheliale elektrische Widerstand der MDCK I Zellen um den Faktor 20 verringert (Furuse et al., 2001). Weil sich die Anzahl und Morphologie der Tight Junction Stränge jedoch nicht ändert, kann man vermuten, dass auch die Kombination und das Verhältnis der verschiedenen Claudine die Barriereigenschaften der abdichtenden Proteinstränge bestimmen.

1.1.1.3 Immunglobulin Superfamilie

Die dritte Gruppe von Tight Junction-assoziierten Transmembranproteinen gehört der CTX Genfamilie an. Dies ist eine Unterfamilie der Immunglobulin Superfamilie, die durch den *Xenopus thymocyte receptor* (CTX) definiert ist und extrazellulär eine variable V und eine konstante C2 Immunglobulin-Domäne besitzt (Chretien et al., 1998). Zu den Proteinen der CTX Genfamilie zählen unter anderem das *junctional adhesion molecule A* (JAM-A), sowie JAM-B und JAM-C, der Coxsackievirus und Adenovirus Rezeptor (CAR) (Bergelson et al., 1997; Carson et al., 1997; Tomko et al., 1997), das Protein *brain- and testis-specific immunoglobulin superfamily* (BT-IgSF) (Suzu et al., 2002), *junctional adhesion molecule 4* (JAM4) (Hirabayashi et al., 2003), *junctional adhesion molecule-like* (JAML) (Moog-Lutz et al., 2003) und das *CAR-like membrane protein* (CLMP) (Raschperger et al., 2004).

JAM-A wird in Endothel- sowie Epithelzellen exprimiert und ist an Tight Junctions lokalisiert (Martin-Padura et al., 1998). Eine ektopische Expression von JAM-A in Fibroblasten führt nicht zur Ausbildung von Tight Junction Proteinsträngen (Itoh et al., 2001). JAM-A wird auch nicht wie Occludin in die von Claudinen gebildeten Proteinstränge eingebaut, was für eine von Occludin und den Claudinen unterschiedliche Funktion von JAM-A spricht. Dies trifft möglicherweise auch auf andere Mitglieder der CTX Genfamilie zu. Weitere zu JAM-A homologe Proteine wurden in verschiedenen Laboren unabhängig voneinander kloniert. Aufgrund der dadurch entstandenen verwirrenden Namensgebung ist in Tabelle 1 die neu eingeführte Nomenklatur aufgeführt (Muller, 2003).

Tabelle 1: Nomenklatur der JAM Familie

Neue Bezeichnung	Alte Bezeichnung	Spezies	Referenz
JAM-A	JAM	Murin	(Martin-Padura et al., 1998)
JAM-A	F11 receptor	Human	(Sobočka et al., 2000)
JAM-A	JAM	Human	(Liu et al., 2000)
JAM-A	JAM	Human	(Williams et al., 1999)
JAM-A	JAM	Human, bovin	(Ozaki et al., 1999)
JAM-B	VE-JAM	Human, murin	(Palmeri et al., 2000)
JAM-B	JAM2	Human	(Cunningham et al., 2000)
JAM-B	JAM-3	Murin	(Aurrand-Lions et al., 2000)
JAM-C	JAM-2	Murin	(Aurrand-Lions et al., 2001)
JAM-C	JAM3	Human	(Arrate et al., 2001)
JAM-C	JAM-3	Human	(Santoso et al., 2002)

JAM-B und **JAM-C** werden von Endothelzellen in verschiedenen Organen und deutlich auf postkapillären Venolen mit hohem Endothel (*high endothelial venules*, HEV) exprimiert (Arrate et al., 2001; Aurrand-Lions et al., 2001; Aurrand-Lions et al., 2000; Cunningham et al., 2000; Liang et al., 2002; Palmeri et al., 2000). Die subzelluläre Lokalisation beider Moleküle wurde bisher nicht durch ultrastrukturelle Analysen aufgeklärt. Aufgrund der ektopischen Expression von JAM-C in Epithelzellen und einer Kollokalisierung von JAM-C mit dem Protein *zonula occludens-1* (ZO-1) wurde auf eine Tight Junction Assoziation geschlossen (Aurrand-Lions et al., 2001). Im Darmepithel ist JAM-C jedoch basolateral mit Desmosomen assoziiert (Zen et al., 2004). Für JAM-B bleibt die genaue zelluläre Lokalisation unklar, weil das Protein in stabil transfizierten MDCK Zellen nicht spezifisch an Tight Junctions angereichert wird (Aurrand-Lions et al., 2001).

Sowohl JAM-A als auch JAM-B und JAM-C können homophile Interaktionen *in trans* eingehen, was durch ektopische Expression dieser Moleküle in CHO und MDCK Zellen gezeigt werden konnte (Aurrand-Lions et al., 2001; Aurrand-Lions et al., 2001; Cunningham et al., 2000; Ebnet et al., 2003; Ebnet et al., 2001; Martin-Padura et al., 1998). Die homophile Interaktion von JAM-A kann durch einen Antikörper, der gegen ein N-terminales Epitop des Proteins gerichtet ist (Bazzoni et al., 2000), oder ein Peptid, das aus den 23 N-terminalen Aminosäuren des reifen Proteins besteht, blockiert werden (Babinska et al., 2002). Die trans-Interaktion scheint somit durch die Membran-distale Domäne von JAM-A vermittelt zu werden. Durch Röntgenstrukturanalyse von rekombinantem löslichem JAM-A wurden cis-Dimere nachgewiesen, die durch ein bei den JAMs konserviertes Dimerisierungsmotiv R(V/I/L)E verbunden sind (Kostrewa et al., 2001). Die

cis-Dimerisierung von JAM-A ist Voraussetzung für eine trans-Interaktion, was auch für Nektine, Mitglieder der Immunglobulin Superfamilie von Adherens Junctions, gezeigt wurde (Takai et al., 2003).

Die homophile Interaktion der JAMs hat einen Einfluss auf die Integrität der Zellkontakte. So erniedrigt die ektopische Expression von JAM-A in CHO Zellen die parazelluläre Permeabilität (Martin-Padura et al., 1998), während exogenes JAM-A in MDCK Zellen die Permeabilität nicht verändert (Aurrand-Lions et al., 2001). Zudem wird der Wiederaufbau der Zellkontakte in Epithelzellen nach Calcium-Depletion durch monoklonale Antikörper beeinträchtigt (Liu et al., 2000). Auch für JAM-C konnte durch Expression in CHO Zellen die parazelluläre Permeabilität erniedrigt werden, ektopisches JAM-C erhöht aber in MDCK Zellen die Permeabilität, was durch Unterschiede im Aufbau der Zellkontakte erklärt werden könnte (Aurrand-Lions et al., 2001).

Die Expression von **CAR** ist für neuronale, epitheliale (Tomko et al., 2000) und endotheliale Zellen beschrieben (Carson et al., 1999). Durch Immunogoldmarkierung konnte seine Tight Junction Assoziation in Epithelzellen nachgewiesen werden (Cohen et al., 2001). CAR kann über seine Membran-distale Immunglobulin-Domäne Dimere bilden (van Raaij et al., 2000) und scheint als Zelladhäsionsmolekül im Gehirn während der Entwicklung zu fungieren (Honda et al., 2000). Die ektopische Expression von humanem CAR (HCAR) in CHO Zellen erniedrigt die parazelluläre Permeabilität, und die Transfektion von MDCK Zellen mit HCAR erhöht den TER (Cohen et al., 2001). Für das **BT-IgSF** ist bisher nur die Expression im Hoden und in Arealen des Gehirns wie beispielsweise den pyramidalen Zellen des Hippocampus oder dem corpus callosum nachgewiesen (Suzu et al., 2002). Das *junctional adhesion molecule 4* (**JAM4**) kolokalisiert in Glomeruli der Niere und in Epithelzellen des Dünndarms mit ZO-1 (Hirabayashi et al., 2003). Zudem konnte eine Verringerung der Permeabilität in JAM4-transfizierten CHO Zellen gezeigt werden. Das epitheliale **CLMP** kolokalisiert in MDCK Zellen mit ZO-1 und erhöht den TER des Monolayers (Raschperger et al., 2004).

1.1.1.4 Cytoplasmatische Proteine der Tight Junctions

Das cytoplasmatische *zonula occludens-1* (**ZO-1**) wurde als erstes Tight Junction-assoziiertes Protein identifiziert (Stevenson et al., 1986). Es konnte sowohl eine Bindung an das in Epithelzellen exprimierte ZO-2 als auch an ZO-3 nachgewiesen werden (Gumbiner, et al., 1991; Haskins et al., 1998; Jesaitis et al., 1994). Die Proteine gehören zur Familie der Membran-assoziierten Guanylatkinasen (MAGUK), die aus einer katalytisch inaktiven Guanylatkinase-Domäne, einer SH3-Domäne und mehreren PDZ-Domänen bestehen. Alle Domänen sind potentielle Protein-Protein Interaktionsmodule. MAGUKs stellen einen Adapter zwischen cytoplasmatischen und Transmembranproteinen dar.

PDZ-Domänen

PDZ (PSD-95/DlgA/ZO-1) Domänen sind weit verbreitet unter cytoplasmatischen und signaltransduzierenden Proteinen (Kennedy, 1995; Ponting, 1997). Sie bestehen aus

80-100 Aminosäuren (Songyang et al., 1997) und häufig gibt es mehrere PDZ-Domänen in einem Protein (Fanning & Anderson, 1996, 1999). PDZ-Domänen sind an der Signaltransduktion und der Bildung cytoplasmatischer Proteinkomplexe beteiligt. Die letzten C-terminalen Aminosäuren eines Liganden vermitteln die Bindung mit einer Peptid bindenden Spalte der PDZ-Domäne. Die Liganden können in verschiedene Klassen unterteilt werden (Vacarro et al., 2002). Für die Klasse 1-3 wird die Unterscheidung anhand der Position P^{-2} , für Klasse 4 anhand Position P^0 getroffen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Unterteilung der PDZ-Domänen Bindungsmotive

Ligand	Konsensus-Motiv
Typ I	S/T-X-Φ/Ψ
Typ II	Φ/Ψ-X-Φ
Typ III	D/E-X-V
Typ IV	X-Ψ-D/E

Φ: hydrophobe Aminosäure

Ψ: hydrophobe Aminosäure

D/E: jede Aminosäure außer Φ und Ψ

Viele Proteine der CTX Genfamilie tragen C-terminal PDZ-Domänen Bindungsmotive. Sowohl JAM-A, als auch JAM-B und JAM-C besitzen C-terminal ein Typ II PDZ-Domänen Bindungsmotiv, CAR und JAM4 hingegen besitzt ein Typ I PDZ-Domänen Bindungsmotiv.

ZO-1 – ZO-2 – ZO-3 Komplex

Die erste PDZ-Domäne von ZO-1, ZO-2 und ZO-3 interagiert mit dem C-Terminus der Transmembranproteine Claudin 1-8 (Itoh et al., 1999), während die Interaktion zwischen Occludin und ZO-1 über die Guanylatkinase-Domäne zustande kommt (Fanning et al., 1998). ZO-1 interagiert über seine dritte PDZ-Domäne auch mit JAM-A, -B und -C (Bazzoni et al., 2000; Ebnet et al., 2003; Ebnet et al., 2000) und wird in nichtpolarisierten Zellen durch direkte oder indirekte Assoziation mit CAR an Zellkontaktstellen rekrutiert (Cohen et al., 2001). Die Bindung von ZO-1 und ZO-2 an F-Aktin wiederum erfolgt durch eine C-terminale Aktin bindende Region (Fanning et al., 1998; Fanning et al., 2002). Durch diese Interaktion wird eine Verbindung zwischen den Transmembranproteinen der Tight Junction und den Aktin-Filamenten der Zelle hergestellt.

PAR3 – aPKC – PAR-6 Komplex

JAM-A, JAM-B und JAM-C binden direkt an das für die Zellpolarität wichtige *partitioning defective protein-3* (PAR-3) (Ebnet et al., 2003; Ebnet et al., 2001; Itoh et al., 2001), das einen Komplex mit *atypical protein kinase C* (aPKC) und PAR-6 bildet. Dieser Kom-

plex ist an der Ausbildung von Tight Junctions und dem Aufbau von Zellpolarität beteiligt (Ohno, 2001). JAM-A rekrutiert aktiv endogenes PAR-3 an die Tight Junctions, was für eine entscheidende Rolle von JAM-A bei der Ausbildung von Zellkontakten und Zellpolarität spricht (Ebnet et al., 2001). An Occludin, Claudin-1, Claudin-4, Claudin-5 oder CAR bindet PAR-3 hingegen nicht (Ebnet et al., 2003; Ebnet et al., 2001).

Pals1 – PATJ Komplex

Ein dritter mit Tight Junctions-assoziiierter Proteinkomplex besteht aus dem cytoplasmatischen *Protein Associated with Lin Seven 1* (Pals1), welches die Transmembranproteine Crumbs 1 (CRB1) und Crumbs 3 (CRB3) mit dem cytoplasmatischen *PALS1-Associated Tight Junction Protein* (PATJ) verbindet (Roh et al., 2002). CRB1 und CRB3 sind an der apikalen Oberfläche von epithelialen Zellen lokalisiert, aber in Tight Junctions konzentriert (Makarova et al., 2003). Aufgrund von Studien in *Drosophila* kann vermutet werden, dass dieser Komplex an der Regulation der Zellpolarität beteiligt ist (Bilder, 2003; Tanentzapf et al., 2003).

Jeder dieser drei Proteinkomplexe könnte unabhängig oder miteinander verbunden vorkommen. PATJ kann ZO-3 und Claudine binden (Ebnet et al., 2004; Roh et al., 2002), und PALS1 interagiert mit PAR-6 (Straight et al., 2004).

CAR bindet die zweite der vier PDZ-Domänen von *ligand-of-numb protein X* (LNX) (Sollerbrant et al., 2003) *in vivo* und *in vitro*. LNX wiederum bindet an das entwicklungsphysiologisch wichtige Numb und reguliert dessen Expressionslevel (Dho et al., 1998; Knoblich, 1997). CAR könnte an der Bildung eines funktionellen Komplexes mit LNX und Numb beteiligt sein. Für JAM4 ist eine Interaktion mit MAGI-1 gezeigt worden (Hirabayashi et al., 2003). MAGIs sind Membran-assoziierte Guanylatkinasen mit invertierter Domänenstruktur und stellen eine Untergruppe der MAGUK Proteinfamilie dar.

1.1.2 Adherens Junctions

Adherens Junctions bilden einen Adhäsionsgürtel entlang der Zellen und befinden sich in polarisierten Epithelzellen basal zu den Tight Junction (Farquhar & Palade, 1963). Sie verleihen Gewebe mechanische Stabilität und sind an der Morphogenese beteiligt (Gumbiner, 1996). In den postkapillären Venolen sind sie die dominierenden Zellverbindungen, weil dort nur rudimentäre Tight Junction ausgebildet werden. Während der Ausbildung von Zellkontakten werden zuerst die Adherens Junctions und dann die Tight Junctions aufgebaut.

Die Adhäsion zwischen Zellen wird über Calcium-abhängige Transmembranproteine vermittelt, die zur Superfamilie der Cadherine gehören (Boller et al., 1985). In Epithelzellen ist E-Cadherin an der Aufrechterhaltung der Zellkontakt-Integrität beteiligt (Vestweber & Kemler, 1985). Das *Vascular Endothelial-Cell-specific Cadherin* (VE-Cadherin, Cadherin5, CD144) ist hingegen ein essentielles Adhäsionsmolekül für die Integrität der Endo-

thelzellbarriere und spezifisch für Adherens Junctions in Endothelzellen (Ali et al., 1997; Breier et al., 1996; Dejana et al., 1999; Lampugnani et al., 1992).

Der cytoplasmatische Teil der Cadherine assoziiert mit β -Catenin, Plakoglobin (γ -Catenin) und p120^{ctn} aus der Armadillo Proteinfamilie (Aberle et al., 1994; Geiger & Ginsberg, 1991; Herrenknecht et al., 1991; Hulsken et al., 1994; Nagafuchi et al., 1991; Shibamoto et al., 1995; Tsukita et al., 1992). Im Gegensatz zu p120^{ctn} sind β -Catenin und Plakoglobin in der Lage, an α -Catenin zu binden, das wiederum eine Anheftungsstelle für Actinfilamente darstellt (Daniel & Reynolds, 1995; Dejana et al., 1995). β -Catenin ist an der Wnt Signaltransduktion beteiligt, kann wie andere Mitglieder der Armadillo-Familie in den Nukleus translozieren, bindet an Transkriptionsfaktoren und ist an der Kontrolle der Genexpression beteiligt (Behrens et al., 1996; Hulsken & Behrens, 2002).

1.1.3 *Complexi Adhaerentes*

In Epithelien vermitteln Desmosomen eine starke Adhäsion zwischen den Zellen, welche durch die Transmembranproteine Desmoglein und Desmocollin ausgeübt wird, die zur Cadherin-Familie gehören (Schwarz et al., 1990). Diese binden an das intrazelluläre Protein Plakoglobin, das wiederum Desmoplakin bindet und als Verankerungspunkt für Keratin-Filamente dient (Schmidt et al., 1994).

Klassische Desmosomen werden im Endothel nicht ausgebildet, dafür aber funktional ähnliche Strukturen, die als *Complexi Adhaerentes* bezeichnet werden (Schmelz & Franke, 1993; Schmelz et al., 1994). Vaskuläre und lymphatische Endothelzellen exprimieren die cytoplasmatischen Proteine Plakoglobin und Desmoplakin, welche mit VE-Cadherin und Vimentin-Filamenten kolokalisieren (Lampugnani & Dejana, 1997; Valiron et al., 1996).

1.1.4 **Gap Junctions**

Gap Junctions sind Cluster von hydrophilen Kanälen in der Zellmembran, die den direkten Austausch von Ionen und kleinen wasserlöslichen Molekülen zwischen Nachbarzellen erlauben und von kanalbildenden Proteinen (Connexinen) gebildet werden (Beyer, 1993). In Endothelzellen sind Gap Junctions über den gesamten Zellkontakt verteilt (Dejana et al., 1995). Jeweils sechs Connexine bilden ein Connexon mit zentraler Pore. Zwei Connexone von benachbarten Zellen bilden einen durchgängigen, wassergefüllten Kanal. Für Endothelzellen ist die Expression der Connexine 37, 40 und 43 beschrieben (Bruzzone et al., 1993; Larson et al., 1997). Gap Junctions sind wichtige Strukturen für homotypische (Endothelzelle – Endothelzelle) oder heterotypische Kommunikation (Endothelzelle – glatte Muskelzelle, Makrophage oder Perizyt) (Allt & Lawrenson, 2001; Polacek et al., 1997). Die Anzahl der Gap Junctions korreliert mit der von Tight Junctions, in die diese interkaliert sind (Simionescu & Simionescu, 1991).

1.2 Leukozyten-Adhäsionskaskade

Das Immunsystem schützt unseren Organismus vor Infektionen und prüft Gewebe auf die Expression veränderter körpereigener Antigene. Eine zentrale Rolle bei der angeborenen und adaptiven Immunantwort spielt die Migration von Leukozyten durch das Endothel.

Da Pathogene eine extrem hohe Proliferationsrate haben, muss zur Abwendung einer systemischen Infektion und Schädigung des betroffenen Gewebes eine schnelle Antwort des Immunsystems erfolgen. Im Rahmen der **angeborenen Immunantwort** kommt es zur Aktivierung des Komplementsystems und zur Aufnahme der Mikroorganismen durch Phagozyten. Diese wiederum schütten Cytokine und Entzündungsmediatoren wie beispielsweise die Interleukine IL-1, IL-6, IL-8 und IL-12, den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Plasminogenaktivator, Prostaglandine, den *platelet-activating factor* (PAF) und das Leukotrien LTB₄ aus. Der Komplementfaktor C5a führt zur Aktivierung von Mastzellen, die Histamin und LTB₄ freisetzen, welche zur Aktivierung der Endothelzellen führen. Dadurch kommt es zu einer Dilatation der Gefäße, einer Verlangsamung des Blutflusses und in postkapillären Venolen zu einer erhöhten Permeabilität sowie zur Expression von Zelladhäsionsmolekülen. Zunächst wandern Neutrophile aus den Blutgefäßen ins Gewebe aus, später folgen Monozyten, die im Gewebe zu Makrophagen oder myeloiden dendritischen Zellen differenzieren. Die Zellen werden an den Infektionsherd gelockt, wo sie Pathogene durch Rezeptoren wie den *Toll-like receptor* erkennen (Takeda et al., 2003). Die innerhalb von kurzer Zeit in großer Zellzahl gebildeten Neutrophilen und Monozyten haben nur eine kurze Lebensdauer, halten aber die Pathogene bis zum Einsetzen der angeborenen Immunantwort in Schach.

Reife, nicht aktivierte Lymphozyten als Komponenten der **adaptiven Immunantwort** zirkulieren kontinuierlich zwischen Blut und lymphatischen Geweben auf der Suche nach ihrem spezifischen Antigen (Ager, 1994; Pabst & Binns, 1989; Salmi & Jalkanen, 1997; Wiedle et al., 2001). Die Auswanderung der Lymphozyten findet in den postkapillären Venolen mit hohem Endothel (*high endothelial venules*, HEV) statt (Anderson & Anderson, 1976), die in allen sekundären lymphatischen Organen außer der Milz vorkommen und eine spezialisierte Morphologie haben. Sobald der Lymphozyt sein spezifisches Antigen erkennt, ändert sich die Expression der Zelladhäsionsmoleküle, der Chemokin-Rezeptoren und somit auch das Migrationsverhalten, wodurch er im Gegensatz zu naiven Lymphozyten in nicht lymphatisches Gewebe auswandern kann, um dort die Immunabwehr auszuführen (Muller, 2002).

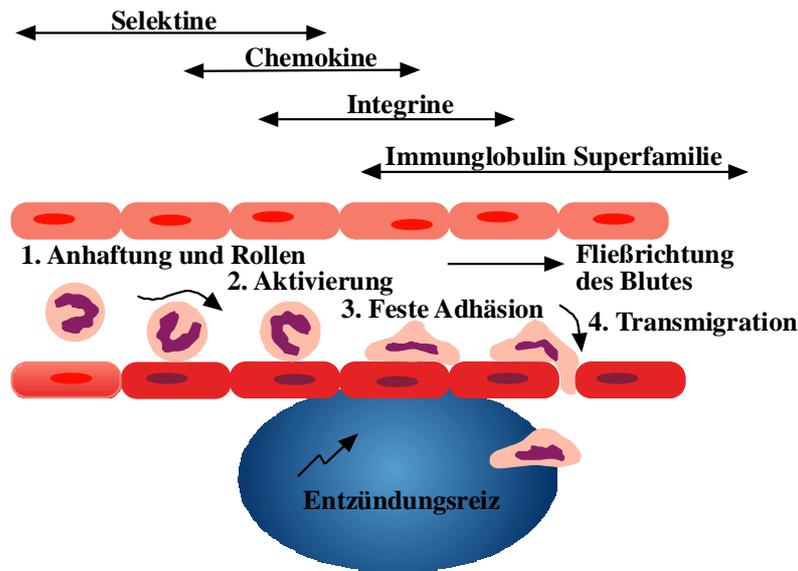


Abb. 1: Modell der Leukozyten-Adhäsionskaskade (modifiziert nach Zöllner et al., 1999).

Die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen erfolgt über verschiedene Zelladhäsionsmoleküle, die zu den Selektinen, den Integrinen und der Immunglobulin Superfamilie gehören, und über Signale von den Endothelzellen an die Leukozyten (Panes & Granger, 1998). Durch die Stimulation von Endothelzellen durch Cytokine und bakterielle Bestandteile werden Tight und Adherens Junctions lokal aufgelöst (Feldmann et al., 1996). Der streng regulierte Prozess kann in die vier Schritte der Leukozyten-Adhäsionskaskade unterteilt werden kann (siehe Abb. 1) (Butcher & Picker, 1996; Carlos & Harlan, 1994; Springer, 1994). Zunächst erfolgt ein Selektin-vermitteltes reversibles Anhaften und Rollen der Leukozyten auf dem Endothel, gefolgt von einer Aktivierung durch Chemokine. Dies führt zu einer festen Adhäsion der Leukozyten auf den Endothelzellen und anschließend zur Extravasation aus dem Blutgefäß ins umliegende Gewebe. Diese einzelnen Schritte werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

1.2.1 Anhaftung und Rollen

Durch die reversible Selektin-vermittelte Anhaftung (*tethering*) von Leukozyten an die Gefäßwand wird die Geschwindigkeit der Zellen herabgesetzt. Der Blutstrom treibt die Leukozyten vorwärts, wodurch diese an der Gefäßwand entlang rollen (*rolling*). Die Schritte der reversiblen Anhaftung und des Rollens werden von Selektinen und ihren glykosylierten Liganden vermittelt (Vestweber & Blanks, 1999). P-Selektin (CD62P) ist auf Endothelzellen und Thrombozyten (*platelets*) zu finden, während die Expression von L-Selektin (CD62L) auf Leukozyten und die von E-Selektin (CD62E) auf Endothelzellen beschränkt ist (Ebnet & Vestweber, 1999). Selektine binden das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis^x von Protein- oder Lipid-Liganden über ihre Lektindomäne (Foxall et al., 1992; Phillips et al., 1990; Walz et al., 1990). Glykoproteine sind vermutlich die physiologischen Liganden der Selektine (Vestweber & Blanks, 1999).

L-Selektin ist auf der Oberfläche der meisten Leukozyten lokalisiert, auf Gedächtnis-Lymphozyten und aktivierten Leukozyten ist die Expression jedoch reduziert oder fehlt. (Gallatin et al., 1983; Kishimoto et al., 1990; Vestweber & Blanks, 1999). Seine Liganden sind konstitutiv auf postkapillären Venolen mit hohem Endothel (*high endothelial venules*, HEV) exprimiert. Dabei ist L-Selektin für den Eintritt naiver Lymphozyten in sekundäre lymphatische Gewebe im Rahmen der Immunüberwachung verantwortlich (Berg et al., 1989). Durch Erkennung des spezifischen Antigens wird der Lymphozyt aktiviert, proliferiert und L-Selektin verschwindet von der Zelloberfläche. Dadurch wird der Wiedereintritt in Lymphknoten verhindert und die Extravasation aktivierter Lymphozyten in entzündetes Gewebe ermöglicht (Hafezi-Moghadam et al., 2001; Rigby & Dailey, 2000). Die Entfernung von L-Selektin erfolgt durch proteolytische Spaltung mittels Metalloproteasen (Preece et al., 1996). Als Liganden von L-Selektin wurden GlyCAM-1, CD34, Podocalyxin und MAdCAM-1 identifiziert (Baumhueter et al., 1994; Berg et al., 1993; Imai et al., 1991; Lasky et al., 1992; Sasseti et al., 1998).

Humanes **P-Selektin** wird von Thrombozyten in α -Granula (Hsu-Lin et al., 1984; McEver & Martin, 1984) und von Endothelzellen in Weibel-Palade-Körperchen (McEver et al., 1989), spezialisierten Granula, gespeichert. Nach einer Stimulation mit Histamin, Thrombin, Leukotrien LTB₄ oder dem Komplementfaktor C5a kommt es durch Fusion der Granula mit der Plasmamembran innerhalb weniger Minuten zu einer Präsentation von P-Selektin auf der Zelloberfläche (Hattori et al., 1989; McEver et al., 1989). Die Menge an P-Selektin erreicht 5 bis 10 Minuten nach Stimulation ihr Maximum und sinkt innerhalb der nächsten 30 bis 60 Minuten stark ab, wobei das Protein durch Endozytose internalisiert wird (Setiadi et al., 1995). Als P-Selektin Liganden wurden der P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) und ein 120 kDa Ligand in myeloiden Zellen nachgewiesen (Moore et al., 1992; Sako et al., 1993).

Im Gegensatz zu P-Selektin wird **E-Selektin** nach Stimulation durch LPS, die Cytokine TNF- α oder Interleukin IL-1 β durch *de novo* Proteinsynthese hochreguliert (Bevilacqua, et al., 1987; Pober et al., 1987). Nach 3 bis 4 Stunden ist die Expression von E-Selektin auf der Zelloberfläche maximal und 16 bis 20 Stunden nach Stimulation ist durch Endozytose wieder die ursprüngliche Menge auf der Oberfläche erreicht (Vestweber & Blanks, 1999). Der E-Selektin-Ligand-1 (ESL-1) (Levinovitz et al., 1993; Steegmaier et al., 1995), PSGL-1 (Asa et al., 1995) und L-Selektin (Zollner et al., 1997) wurden als E-Selektin Liganden identifiziert.

Neben den Selektinen kann auch das Leukozyten Integrin **VLA-4** (α 4 β 1) ein Anhaften und Rollen auf *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) unterstützen, welches von aktivierten Endothelzellen exprimiert wird (Alon et al., 1995; Berlin et al., 1995; Henderson et al., 2001). Außerdem kann das Glykoprotein **CD44** in seiner Funktion als Adhäsionsmolekül ein Rollen von Leukozyten auf Hyaluronan vermitteln (Clark et al., 1996; DeGrendele et al., 1996). Hyaluronan ist Bestandteil der extrazellulären Matrix und wird auf Endothelzellen nach Stimulation hochreguliert (Mohamadzadeh et al., 1998).

1.2.2 Aktivierung

Die durch Selektine vermittelte Interaktion von Leukozyten und Endothel hat eine geringe Bindungsstärke und ist reversibel. Für eine stabile Adhäsion werden die Leukozyten durch Chemokine aktiviert. Bisher wurden mehr als 40 verschiedene humane Chemokine mit spezifischen und teilweise überlappenden Funktionen identifiziert (Ebnet & Vestweber, 1999). Chemokine werden konstitutiv oder nach Stimulation mit LPS, TNF- α oder IL-1 von Endothelzellen exprimiert. Die Chemokine SLC, ELC, TARC und DC-CK1 werden konstitutiv exprimiert und regulieren die Rekrutierung naiver Lymphozyten in sekundäre lymphatische Organe (Baggiolini, 1998). Durch Stimulation der Endothelzellen werden unter anderem *macrophage inflammatory proteins* (MIPs), *monocyte chemotactic proteins* (MCPs), Fraktalkine (CX3CL1) und RANTES (CCL5) exprimiert (Baggiolini & Dahinden, 1994; Ben-Baruch et al., 1995). Einige Chemokine binden über eine Heparin-bindende Domäne an Proteoglykane auf der luminalen Oberfläche von Endothelzellen (Tanaka et al., 1993). Leukozyten tragen verschiedene Chemokin-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, die an G-Proteine gekoppelt sind und in der Regel mehr als ein Chemokin binden (Mantovani, 1999; Ward et al., 1998). Eine Chemokin-Bindung führt zur Induktion der Genexpression oder zur Aktivierung der Integrine auf der Oberfläche von Leukozyten (Panes & Granger, 1998).

1.2.3 Feste Adhäsion

Die stabile Adhäsion von Leukozyten und Endothelzellen wird von Integrinen und ihren Liganden, Proteinen der Immunglobulin Superfamilie, ausgeübt. Integrine bestehen aus zwei nicht kovalent verbundenen transmembranen Glykoproteinen, die man als α - und β -Kette bezeichnet (Haas & Plow, 1994; Shimizu et al., 1999). Bisher wurden siebzehn α - und acht β -Untereinheiten identifiziert und mehr als 20 verschiedene Integrine in Zellen des Immunsystems nachgewiesen. Diese vermitteln Zell-Zell und Zell-Substrat Interaktionen. Für die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen spielen vor allen Dingen die in Tabelle 3 aufgelisteten Integrine und Liganden eine Rolle (Panes & Granger, 1998; Stuiver & O'Toole, 1995).

Durch die Bindung von Chemokinen an die spezifischen Rezeptoren auf Leukozyten kommt es zu einer erhöhten Adhäsivität der Integrine. Dies kann durch eine erhöhte Affinität (Ginsberg, 1995), die Assoziation mit dem Cytoskelett (Kucik et al., 1996) oder die Bildung von Clustern hervorgerufen werden (van Kooyk et al., 1994).

Das *intercellular cell adhesion molecule-1* (ICAM-1) sowie ICAM-2 werden konstitutiv auf Endothelzellen exprimiert. Die Expression von ICAM-1 und *vascular cell adhesion molecule* (VCAM), das auf ruhendem Endothel gering vorhanden ist, wird durch Stimulation mit IL-1, TNF- α oder LPS hochreguliert (Dustin et al., 1986; Wellicome et al., 1990).

Tabelle 3: Integrine und ihre Liganden, die an der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen beteiligt sind.

Integrin	Alternative Bezeichnung	Expression	Ligand auf Endothelzellen
$\alpha_L\beta_2$	LFA-1, CD11a/CD18	alle Leukozyten	ICAM-1, -2, -3
$\alpha_M\beta_2$	Mac-1, CD11b/CD18	Monozyten, Neutrophile,	ICAM-1, iC3b
$\alpha_X\beta_2$	p150, 95, CD11c/CD18	Monozyten, Neutrophile	Fibrinogen, iC3b
$\alpha_D\beta_2$	CD11d/CD18	Myeloide Zellen	ICAM-3, VCAM-1
$\alpha_4\beta_1$	VLA-4, CD49d/CD29	Lymphozyten, Monozyten, Eosinophile	VCAM-1

1.2.4 Transmigration

Der letzte Schritt der Leukozyten-Adhäsionskaskade, die Extravasation der Leukozyten aus den Blutgefäßen, findet bei einer Entzündungsreaktion in postkapillären Venolen statt, die nur rudimentäre Tight Junctions ausbilden. In ultrastrukturellen Studien konnte einerseits eine transzelluläre Migration für Neutrophile festgestellt werden (Feng et al., 1998). Andererseits wurde in den meisten Arbeiten der parazelluläre Weg nachgewiesen. Die Migration von Neutrophilen an der Kontaktfläche von drei aufeinanderstoßenden Zellen wird gegenüber einem Zellkontakt zwischen zwei Zellen bevorzugt, weil die Tight Junctions dort *in vitro* diskontinuierlich sind (Burns et al., 2000; Burns et al., 1997). Allerdings könnte dies spezifisch für Neutrophile sein, denn Monozyten scheinen vorzugsweise an der Kontaktfläche zweier Zellen durchzuwandern (Shaw et al., 2001). Der Leukozyt drängt sich dabei durch den Endothelzellkontakt. Der Abbau seines Cytoskeletts an der apikalen Seite der Endothelzellen und der Wiederaufbau auf der abluminalen Seite dauert bei Neutrophilen *in vitro* ungefähr 90 Sekunden (Muller, 2003). Dabei verläuft die transendotheliale Migration von Leukozyten *in vitro* ohne einen Anstieg der Permeabilität oder eine Verringerung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (Huang et al., 1988; Huang et al., 1993).

Die Adhäsion von Neutrophilen führt in den Endothelzellen zu einem Anstieg der cytosolischen freien Ca^{2+} -Konzentration. Falls dieser Anstieg unterbunden wird, wird die Diapedese, aber nicht die Adhäsion von Neutrophilen inhibiert (Hixenbaugh et al., 1997). Der transiente Anstieg des intrazellulären freien Ca^{2+} führt zur Aktivierung der Calmodulin-abhängigen *myosin light chain kinase*, die eine Konformationsänderung von Myosin II bewirkt. Dadurch kommt es zu einer Kontraktion der Endothelzellen, wodurch sich der Abstand der Zellen zueinander vergrößert und den Durchtritt der Leukozyten erleichtert (Hixenbaugh et al., 1997). Das Heparin-bindende Protein Azurocidin, das als lösliches

Protein von Neutrophilen freigesetzt wird, kann einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration hervorrufen (Gautam et al., 2001). Auch eine Quervernetzung von E- oder P-Selektin beziehungsweise VCAM auf aktivierten Endothelzellen kann dies auslösen (Lorenzon et al., 1998).

Verschiedene Transmembranproteine im Zellkontaktbereich von Endothelzellen, die homophil interagieren können und möglicherweise eine Rolle bei der Regulation interendothelialer Kontakte haben, scheinen an der Extravasation von Leukozyten beteiligt zu sein. Auf einzelne Proteine, die in Abbildung 2 dargestellt sind, soll im Folgenden näher eingegangen werden.

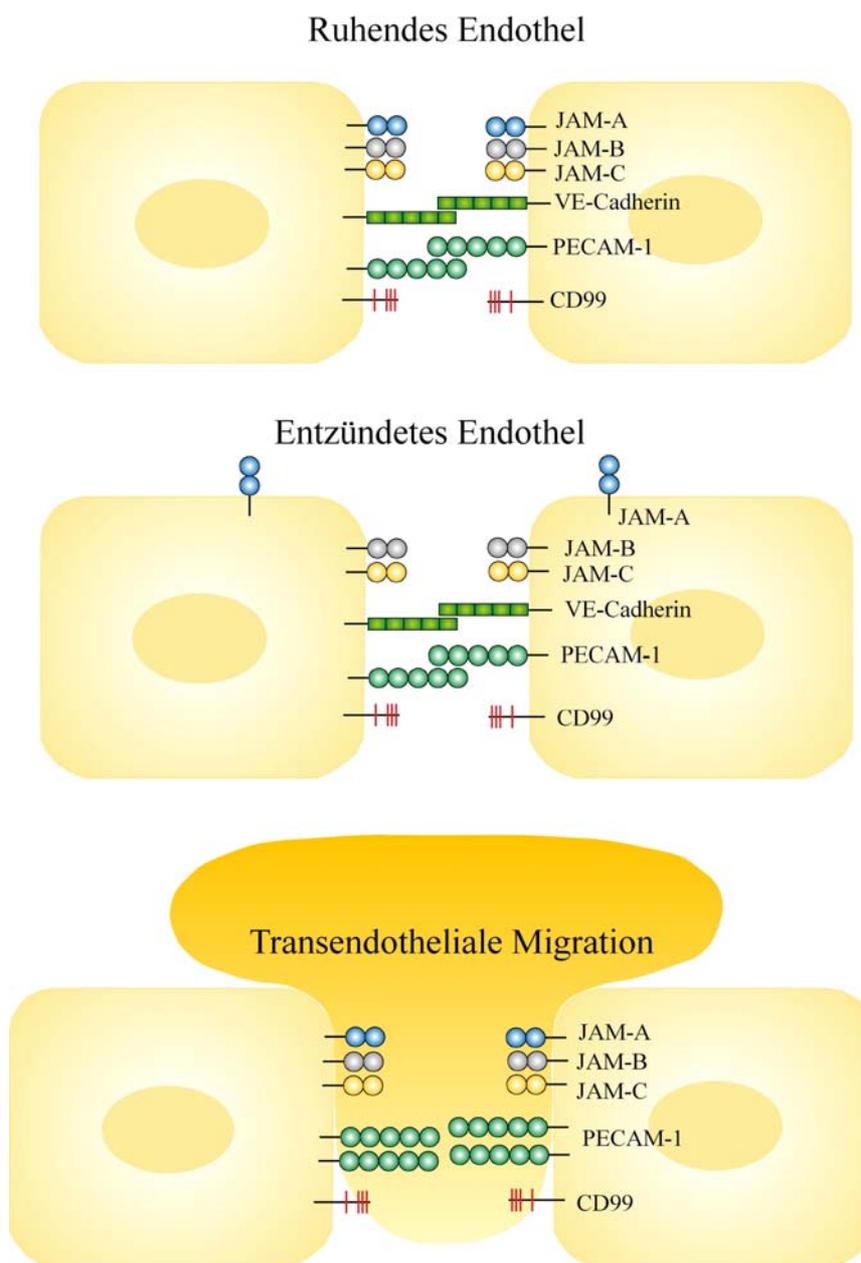


Abb. 2: An der transendothelialen Migration von Leukozyten beteiligte Moleküle (modifiziert nach Muller et al., 2003).

1.2.4.1 PECAM-1

Das *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1* (PECAM-1) ist ein 130 kDa Glykoprotein mit diffuser Expression auf der Oberfläche von Blutplättchen, Monozyten, Granulozyten, NK-Zellen und einer Subpopulation von T-Zellen (Muller et al., 1989; Newman et al., 1990). Als Transmembranprotein der Immunglobulin Superfamilie ist es im Zellkontakt von Endothelzellen konzentriert, wobei es weder Tight noch Adherens Junctions zugeordnet werden kann. Eine Inkubation mit einer Kombination der Entzündungsmediatoren TNF- α und IFN- γ verursacht eine Umverteilung von PECAM-1 aus dem endothelialen Zellkontakt (Romer et al., 1995). Neben seiner Funktion als Zelladhäsionsmolekül ist es an der Signaltransduktion beteiligt.

Aufgrund von Blockierungsstudien mit Antikörpern wird PECAM-1 mit einer Regulation der Leukozyten-Transmigration und der Angiogenese in Verbindung gebracht. Anti-PECAM-1 Antikörper, welche gegen die erste oder zweite Immunglobulin-Domäne gerichtet sind, sowie rekombinantes lösliches PECAM-1 Fusionsprotein inhibieren die transendotheliale Migration von Monozyten und Neutrophilen (Bogen et al., 1994; Liao et al., 1997; Liao et al., 1995; Muller et al., 1993). Die Zellen verharren direkt oberhalb des Interzellularspalts. Antikörper hingegen, die gegen die sechste Ig-Domäne gerichtet sind, verhindern die Migration durch die Basalmembran (Liao et al., 1995). PECAM-1 kann nicht das einzige Molekül sein, das an der Diapedese beteiligt ist, da *in vitro* und *in vivo* keine vollständige Blockierung erreicht werden kann. Mit der PECAM-1 knock-out Maus kann in den meisten akuten Entzündungsmodellen kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden (Duncan et al., 1999). Die Funktion von PECAM-1 scheint von dem/den Moleküle(n) kompensiert zu werden, die für die verbleibenden 10-20% Migration bei Blockierungsexperimenten verantwortlich sind. Interessanterweise ist mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen eine leichte Akkumulation von Leukozyten zwischen Endothel und Basalmembran zu erkennen. Für eine Beteiligung von PECAM-1 an der Regulation der transendothelialen Migration sprechen auch Ergebnisse der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis, dem Mausmodell für Multiple Sklerose (Graesser et al., 2002). Bei der PECAM-1 knock-out Maus konnte ein früheres Einsetzen klinischer Symptome beobachtet werden. Außerdem war die durch Histamin induzierte Öffnung der Zellkontakte verlängert.

In Endothelzellen wurden 50 nm große, vesikuläre Strukturen entdeckt, die miteinander und mit der Zellmembran verbunden sind und ein Drittel des gesamten PECAM-1 einer Zelle enthalten (Mamdouh et al., 2003). Das PECAM-1 dieses Membrankompartiments wird konstitutiv recycled. Während der Migration von Monozyten verändert sich das Recycling, und PECAM-1 wird in den Zellkontaktbereich zwischen Endothelzelle und Monozyt transportiert.

1.2.4.2 CD99

CD99 ist ein stark glykosyliertes 32 kDa Protein, das auf der Oberfläche der meisten Leukozyten und im Zellkontakt konfluenter Endothelzellen lokalisiert ist und keiner der bisher bekannten Proteinfamilien zugeordnet werden kann (Schenkel et al., 2002). In einem *in vitro* Transmigrationsmodell wurde durch anti-CD99 Antikörper die Diapedese von Monozyten um mehr als 90% blockiert. Sowohl die Inhibition von CD99 auf Leukozyten als auch auf Endothelzellen war ausreichend, was auf eine homophile Interaktion hindeutet. Die Verwendung von anti-CD99 und anti-PECAM-1 Antikörpern führte zu einem additiven Effekt und zu einer kompletten Blockierung der Transmigration, weshalb die beiden Moleküle an unterschiedlichen Schritten der Diapedese beteiligt zu sein scheinen. Dafür spricht auch, dass bei den Blockierungsexperimenten mit anti-CD99 Antikörpern Monozyten auf halbem Weg durch den Zellkontakt verharren.

1.2.4.3 VE-Cadherin

Bei *in vitro* Analysen mit Monozyten verschwinden VE-Cadherin und assoziierte Catenine transient aus dem Zellkontakt von Endothelzellen (Allport et al., 2000). Kleine Löcher im Adhäsionsgürtel werden für die Extravasation ausgenutzt, die sich fünf Minuten nach der Migration wieder geschlossen haben (Shaw et al., 2001). Es bleibt unklar, ob das Verschwinden der Adherens Junctions Voraussetzung oder Konsequenz der transendothelialen Migration ist. Antikörper gegen VE-Cadherin führen zu einer Erhöhung der Permeabilität und führen bei aktiviertem Endothel zu einer veränderten Lokalisation (Corada et al., 1999; Lampugnani et al., 1992). Außerdem kann ein anti-VE-Cadherin Antikörper den Aufbau des transendothelialen elektrischen Widerstandes eines kultivierten Endothelzellrasen inhibieren (Gotsch et al., 1997). Im Peritonitismodell führt derselbe Antikörper zu einer beschleunigten Einwanderung von Leukozyten ins Peritoneum.

1.2.4.4 JAM-A

Das *junctional adhesion molecule-A* (JAM-A) wurde neben seiner Expression in Endothel- und Epithelzellen auch auf murinen Thrombozyten und dendritischen Zellen (Malergue et al., 1998), sowie auf humanen Neutrophilen, Monozyten, einer Subpopulation von Lymphozyten, Erythrozyten und Thrombozyten detektiert (Liu et al., 2000; Sobocka et al., 2000; Williams et al., 1999). Mehrere Publikationen sprechen für einen Einfluss von JAM-A bei der transendothelialen Migration:

Der monoklonale Antikörper BV11 inhibiert die spontante und Chemokin-induzierte Migration von humanen Monozyten durch einen murinen Endothelzellmonolayer *in vitro* und die Einwanderung von Monozyten bei einem *in vivo* Haut-Entzündungsmodell (Martin-Padura et al., 1998). Derselbe Antikörper zeigt blockierende Wirkung bei einem Cytokin-induziertes Meningitismodell (Del Maschio et al., 1999), jedoch keine Inhibition bei einem durch Bakterien oder Viren induzierten Meningitismodell (Lechner et al., 2000). Andere monoklonale und polyklonale anti-JAM-1 Antikörper konnten zwar die Ausbildung des

transepithelialen elektrischen Widerstandes beeinträchtigen, aber nicht die transendotheliale und transepitheliale Migration von humanen Granulozyten (Liu et al., 2000). Somit scheint es möglich, die Funktion von JAM-A für die Integrität interepithelialer und interendothelialer Zellkontakte von einer Beteiligung von JAM-A bei der transendothelialen Migration von Leukozyten zu trennen.

In einer weiteren Studie wurde die Interaktion zwischen humanem JAM-A und *lymphocyte function-associated antigen-1* (LFA-1, CD11a/CD18) (Ostermann et al., 2002) nachgewiesen. Mit einem polyklonalen Maus Antikörper konnte die transendotheliale Migration von Neutrophilen und T-Zellen inhibiert werden. Außerdem wurde die Adhäsion von T-Zellen auf TNF- α und IFN- γ stimuliertem Endothel blockiert. Bei dieser Interaktion war die Membran-proximale Ig-Domäne beteiligt, und nicht die für die Dimer-Bildung benötigte Membran-distale Ig-Domäne. Durch die Stimulation von primären humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs) mit einer Kombination aus TNF- α und IFN- γ wird JAM-A aus dem Zellkontaktbereich auf die apikale Membran umverteilt, die Menge an membrangebundenem JAM-A ändert sich jedoch nicht (Ozaki et al., 1999).

1.2.4.5 JAM-B

Eine starke Expression von JAM-B ist für den interzellulären Kontakt von HEVs nachgewiesen worden (Palmeri et al., 2000). Eine Proteininteraktion zwischen JAM-B und JAM-C, die allerdings nicht direkt mit Leukozyten und Endothelzellen gezeigt wurde, liefert einen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung der Moleküle bei der transendothelialen Migration von Leukozyten (Arrate et al., 2001; Liang et al., 2002). Dafür spricht auch die Bindung von mit humanem JAM-B transfizierten Zellen an das *very late antigen-4* (VLA-4, $\alpha_4\beta_1$, CD49d/CD29), das von Lymphozyten, Monozyten und Eosinophilen exprimiert wird (Cunningham et al., 2002). Allerdings ist die Bindung erst effizient, wenn JAM-B bereits eine Interaktion mit JAM-C eingegangen ist.

1.2.4.6 JAM-C

Auch JAM-C wird stark auf HEVs exprimiert (Aurrand-Lions et al., 2001), zudem ist es auf Subpopulationen von humanen Lymphozyten und den meisten Monozyten nachgewiesen (Johnson-Leger et al., 2002). Mit Antikörpern gegen JAM-C oder mit löslichem rekombinantem JAM-C wurde eine durch *stromal derived factor-1* (SDF-1, CXCL12) induzierte Migration von humanen Granulozyten durch HUVECs blockiert (Johnson-Leger et al., 2002). Außerdem ist für humanes JAM-C eine Interaktion mit dem Integrin Mac-1 (CD11b/CD18) auf Thrombozyten gezeigt worden (Santoso et al., 2002). Die Identifikation von Integrin-Liganden für JAM-B und JAM-C, welche auf zirkulierenden Leukozyten vorhanden sind, deutet auf mögliche Interaktionen in Abhängigkeit der physiologischen Parameter und auf eine Beteiligung der Moleküle an der transendothelialen Migration hin.

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zum näheren Verständnis der molekularen Mechanismen beizutragen, welche die Zellkontakte zwischen Endothelzellen kontrollieren. Die Regulation der vaskulären Permeabilität, der Leukozyten Extravasation und der Angiogenese hängen von der Ausbildung beziehungsweise der Öffnung endothelialer Zellkontakte ab. Tight Junction-assoziierte Proteine sind für die Ausbildung einer selektiven Permeabilitätsbarriere verantwortlich. Proteine aus verschiedenen Bereichen des Zellkontakts wie VE-Cadherin, PECAM-1, CD99 und JAM-A haben einen Einfluss auf die transendotheliale Migration von Leukozyten.

Auf der Suche nach Transmembranproteinen, die im Zellkontakt von Endothelzellen lokalisiert sind, wurden an diesem Institut monoklonale Antikörper (mAk) gegen murine Endotheliumzellen hergestellt. Mit dem mAk V1G8 war bereits ein bisher unbekanntes Protein durch Immunpräzipitationen identifiziert worden, über das durch MALDI-TOF Analysen erste Informationen vorlagen.

Zunächst sollte im Rahmen dieser Arbeit das durch den mAk V1G8 erkannte Antigen kloniert und biochemisch charakterisiert werden. In Immunfluoreszenz-Studien sollte zudem die zelluläre Lokalisation und die Fähigkeit zur Ausbildung homo- und heterophiler Interaktionen geklärt werden.

Eine weitere Fragestellung war die Auswirkung von Antikörpern gegen das 1G8 Antigen auf Permeabilität und transendotheliale Migration in verschiedenen *in vitro* Systemen. Durch ektopische Expression sollte die physiologische Relevanz des 1G8 Antigens auf den Aufbau und die Integrität von Zellkontakten analysiert werden.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit sollten polyklonale Antikörper (pAk) gegen das *junctional adhesion molecule-A* (JAM-A) charakterisiert werden. Diese pAk sollten bei *in vitro* Transmigrationsexperimenten eingesetzt werden, da es widersprüchliche Angaben über eine Beteiligung von JAM-A an der transendothelialen Migration von Leukozyten gibt. Im weiteren Verlauf sollten die Expression von murinem JAM-A auf Leukozyten und der Einfluss der pAk auf die Zellkontaktbildung in Epithelzellen untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

AgNO₃ (Merck, Darmstadt, #1.01512)

α-MEM, Pulver (Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, #11900-073)

ABI PRISM BigDye™ Premix v1.0 (Applied Biosystems, Warrington, GB, # 4303150)

ABI PRISM BigDye™ Premix v2.0 (Applied Biosystems, Warrington, GB, # 4314415)

ABI Loading Buffer (Applied Biosystems, Warrington, GB, #402055)

Agarose (Cambrex, Rochland, ME, USA, #50004)

Ampicillin (Sigma-Aldrich, Steinheim, # A-9518)

Amylose Resin (New England Biolabs, Beverly, MA, USA, #E8021S)

Aprotinin (Roche Diagnostic, Mannheim, #981532)

APS (Bio-Rad, München, #161-0700)

Bacto™ Agar (Becton-Dickinson, Heidelberg, #214030)

Bacto™ Yeast Extract (Becton Dickinson, Heidelberg, #212750)

β-Mercaptoethanol, 50 mM (Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, #31350-010)

Blasticidin S HCl (Invitrogen, Life Technologies, Karlsruhe, #46-1120)

Borsäure (Riedel-de Haën, Seelze, #11607)

Bromphenolblau (Sigma-Aldrich, Steinheim, #B-7021)

BSA (Sigma-Aldrich, Steinheim, #A-7906)

CaCl₂ (Merck, Darmstadt, #1.02382.1000)

Caprylsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim, #C-2875)

CASYton isotone Kochsalzlösung (Schärfe System, Reutlingen, #043-90037P)

Cell FIX™ (BD Biosciences, Heidelberg, #340181)

CHCl₃ (Fluka, Buchs, #25690)

Citronensäure (Merck, Darmstadt, #1.00247.5000)

CNBr-activated Sepharose™ 4B (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden, #17-0430-01)

Coomassie® Brilliant Blue R250 (Sigma-Aldrich, Steinheim, #B-0149)

dATP, 100 mM (Sigma-Aldrich, Steinheim, #D-4788)

DEPC (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, # D-5758)

Dimethylformamid (J.T. Baker, Deventer, Niederlande, #7032)

DMEM, Pulver (High Glucose) (Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, #52100-039)

DMEM ohne Ca²⁺, Mg²⁺ (Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, #21068-028)

DMSO (Merck, Darmstadt, #1.02952.1000)

Doxycyclin (Sigma-Aldrich, Steinheim, #D-9891)

Dynabeads® M-450 Sheep anti-Rat IgG (DynaL Biotech GmbH, Hamburg, #110.08)

dNTP Mix (Stratagene, Amsterdam, Niederlande, #200415)
DTT (Roche Diagnostic, Mannheim, #197777)
ECGS (Sigma-Aldrich, Steinheim, #E-0760)
EDTA (Roth, Karlsruhe, #8043.2)
EGTA (Sigma-Aldrich, Steinheim, #E-0396)
Essigsäure (Roth, Karlsruhe, #3738.2)
Ethanol (Riedel-de Haën, Seelze, #32205)
Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Steinheim, #E-1510)
FACS Flow (BD Immunocytometry Systems, Heidelberg, #342003)
FACS® Lysing Solution (BD Immunocytometry Systems, Heidelberg, #349202)
FBS, Tet System Approved (BD Clontech, Heidelberg, #631106)
FCS (PAN Biotec, Aidenbach, #P30-1502)
Fibronektin (Sigma-Aldrich, Steinheim, #F-1141)
Filipin III (Sigma-Aldrich, Steinheim, #F4767)
FITC-Dextran, 40kD (Sigma-Aldrich, Steinheim, #FD-40S)
Fetal Bovine Serum (BioWest, Nuaille, Frankreich, #S1800)
Fetal Bovine Serum, Ultra-Low IgG (Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, #16250-078)
Foetal Calf Serum Gold (PAA Laboratories, Linz, Österreich, #A15-649)
Formaldehydlösung, min. 37% (Merck, Darmstadt, #1.04002)
Fluorescent Mounting Medium (DAKO, Hamburg, #S3023)
Gelatine (Sigma-Aldrich, Steinheim, #G-1393)
Gentamicin, G418 (PAA Laboratories, Pasching, Österreich, #P27-011)
Glutathione (Sigma-Aldrich, Steinheim, # G-4251)
Glutathione-Agarose (Sigma-Aldrich, Steinheim, #G-4510)
Glycerin (Calbiochem, La Jolla, CA, USA, #356352)
Glycin (J.T.Baker, Deventer, Niederlande, #4059-06)
L-Glutamine, 200 mM (Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, #25030-024)
Harnstoff (J.T.Baker, Deventer, Niederlande, #0345)
HAT supplement, 50x (Gibco BRL, Life Technologies, Heidelberg, #21060-017)
HBSS ohne Ca²⁺, Mg²⁺ (Gibco BRL, Life Technologies, Heidelberg, #14170-088)
HCl, 37% (Riedel-de Haën, Seelze, #30721)
HCl, 1M Lösung (Bernd Kraft GmbH, Duisburg, #01041.3000)
Heparin (Sigma-Aldrich, Steinheim, #H-3149)
HEPES (Sigma-Aldrich, Steinheim, #H-7523)
Histamine (Sigma-Aldrich, Steinheim, #H-7125)
Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, Steinheim, #1077-1)
Histopaque®-1119 (Sigma-Aldrich, Steinheim, #1119-1)
Hygromycin B (Invitrogen, Life Technologies, Karlsruhe, #10687-010)
IgG from Bovine Serum, Reagent Grade (Sigma-Aldrich, Steinheim, #I-5506)
IgG from Human Serum, Reagent Grade (Sigma-Aldrich, Steinheim, #I-4506)
IgG₁ λ from Human Myeloma Plasma (Sigma-Aldrich, Steinheim, #I-5029)
Imidazol (Sigma-Aldrich, Steinheim, #I-0250)

IPTG (Sigma-Aldrich, Steinheim, I-6758)
Isopropanol (J.T.Baker, Deventer, Niederlande, #8175)
KCl (Merck, Darmstadt, #1.04936.1000)
KHCO₃ (J.T.Baker, Deventer, Niederlande, #2940-01)
KH₂PO₄ (Roth, Karlsruhe, #3904)
K₂HPO₄ (Roth, Karlsruhe, #6878)
Laminin (Sigma-Aldrich, Steinheim, #L-2020)
Leupeptin (Roche Diagnostic, Mannheim, #1-017-128)
Lysozym (Sigma-Aldrich, Steinheim, # L7651)
Magermilchpulver (Uelzena)
Maltose (Sigma-Aldrich, Steinheim, # M9171)
Medium 199 (Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, #31150-022)
MEM (Biochrom, Berlin, #FG0325)
MEM Natriumpyruvat, 100 mM (Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, #11360-039)
MEM Nichtessentielle Aminosäuren, (100x) (Gibco BRL, Karlsruhe, #11140-035)
Methanol (J.T. Baker, Deventer, Niederlande, #8045)
MgCl₂ (J.T. Baker, Deventer, Niederlande, #0162)
MgSO₄ (Merck, Darmstadt, #5886.0500)
Na₂HPO₄ (J.T.Baker, Deventer, Niederlande, #0306)
NaCl (J.T. Baker, Deventer, Niederlande, #0278)
NaH₂PO₄ (Merck, Darmstadt, #1.06346.1000)
NaHCO₃ (Biochrom, Berlin, #L1703)
NaN₃ (Merck, Darmstadt, #1.06688.0250)
NaOH (J.T. Baker, Deventer, Niederlande, #0288)
NaOH, 1M Lösung (Bernd Kraft GmbH, Duisburg, #01030.3)
Natriumacetat (J.T. Baker, Deventer, Niederlande, #0256)
Natriumthiosulfat (Merck, Darmstadt, #1.06516.1000)
NH₄Cl (Merck, Darmstadt, #1.01136)
Nycoprep™ 1.077A (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norwegen, #1002380)
OPD (Sigma-Aldrich, Steinheim, #P-8412)
Paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, Steinheim, #P-6148)
PBS Dulbecco w/o Ca²⁺, Mg²⁺ (Biochrom, Berlin, #L182-10)
Polyethylenglycol 6000 (Merck, Darmstadt, #1.12033.1000)
Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10.000 µg/ml) (Gibco BRL, Karlsruhe, #15140-122)
Pepstatin (Roche Diagnostics, Mannheim, #1524 488)
Prestained SDS-PAGE Standards, High Range (BIO-RAD, München, #161-0309)
Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range (BIO-RAD, München, #161-0305)
Protein Free Hybridoma Medium (Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, #12040-051)
PMSF (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #P-7626)
Ponceau S Lösung, 0,2% in 3% TCA (Serva, Heidelberg, #33427)
Protein A Sepharose™ CL-4B (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden, #17-0780-01)
Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden, #17-0618-01)

Rabbit IgG, Technical Grade (Sigma-Aldrich, Steinheim, I-8140)
 RPMI 1640 Medium (Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, #31870-025)
 RNase Block Ribonuclease Inhibitor (Stratagene, Amsterdam, Niederlande, #300152)
 Rotiphorese® Gel 30, 30% Acrylamid mit 0,8% Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe, #3029.1)
 SDF-1 α /CXCL12, Recombinant Murine (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, #460-SD)
 SDS (Calbiochem, La Jolla, CA, USA, #428015)
 SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range (BIO-RAD, München, #161-0317)
 SmartLadder™ (Eurogentec, Seraing, Belgien, #MW-1700-02)
 SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, IL, USA, #34080)
 TEMED (Bio-Rad, Hercules, CA, USA, #161-0801)
 TNF- α , Recombinant Human (TEBU, Frankfurt am Main, #300-01A)
 TRIZMA® BASE (Sigma-Aldrich, Steinheim, #T-1503)
 Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Steinheim, #T-8787)
 Triton X-100, 10% (w/v) (Roche Diagnostics, Mannheim, #10716800)
 TRIzol® Reagent (Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, #15596-018)
 Trypan Blue Solution (0,4%) (Sigma-Aldrich, Steinheim, #T8154)
 Trypsin/EDTA Solution, 0,05%/0,02% (w/v) (Biochrom, Berlin, #L2143)
 Tryptone Peptone (Becton Dickinson, Heidelberg, #211705)
 Tween® 20 (Merck, Darmstadt, #8.22184.0500)
 Wasserstoffperoxid, 35% (Merck, Darmstadt, #1.08600.1000)
 X-Gal (Calbiochem, Bad Soden, #03-36-0001)
 Xylene Cyanole FF (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, #X-4126)

3.1.2 Kits und spezielle Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
DyeEx™ 1.0 Spin Kit (250)	QIAGEN, Hilden
DyeEx™ 2.0 Spin Kit (250)	QIAGEN, Hilden
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Perfectprep® Gel Cleanup Kit	Eppendorf, Hamburg
Quantum Prep® Plasmid Miniprep Kit	BIO-RAD, München
QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit (25)	QIAGEN, Hilden
Quick Ligation™ Kit	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Life Technologies, Karlsruhe

3.1.3 Enzyme

Restriktionsendonukleasen wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, von den Firmen Gibco BRL, Life Technologies (Karlsruhe), New England Biolabs (Beverly, MA, USA) und Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

Bezeichnung	Hersteller
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
MMLV Reverse Transcriptase	Stratagene, Amsterdam, NL
Platinum® <i>Pfx</i> DNA Polymerase	Invitrogen, Life Technologies, Karlsruhe
Quick Ligation™ Kit	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
Shrimp Alkaline Phosphatase	Roche Diagnostic, Mannheim
Super <i>Taq</i>	HT Biotechnology, Cambridge, GB
T4 DNA Ligase	Invitrogen, Life Technologies, Karlsruhe

3.1.4 Medien und Puffer

Sowohl α -MEM (Gibco BRL) und DMEM (Gibco BRL) als auch PBS (Biochrom AG) wurden nach den Angaben des Herstellers mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$ angesetzt und zur Verwendung in der Zellkultur steril filtriert.

α -MEM Vollmedium:	α -MEM 10% FCS (hitzeinaktiviert für 30 Min bei 56°C) 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin
DMEM Vollmedium:	DMEM 10% FCS (hitzeinaktiviert für 30 Min bei 56°C) 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin
Einfriermedium:	50% α -MEM oder DMEM Vollmedium 40% FCS (hitzeinaktiviert für 30 Min bei 56°C) 10% DMSO
LB-Medium:	10 g/l Tryptone Peptone 5 g/l Bacto Yeast Extrakt 10 g/l NaCl
LB-Agar:	LB-Medium 15 g/l Bacto Agar

PBS (pH7,4):	137 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl
PBS ^{mc} :	PBS 1 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂
PBS/1M NaCl:	3 Volumen PBS 1 Volumen 4M NaCl
TBE-Puffer (pH8,4):	89 mM Tris-HCl 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
TE-Puffer (pH8,0):	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA
TBS (pH7,4):	25 mM Tris-HCl 137 mM NaCl 2,7 mM KCl
TBST (pH7,4):	TBS 0,1% Tween 20

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
CASYcups	Schärfe System, Reutlingen
Cell Lifter	Corning, New York, USA
Centricon YM-10 MWCO 10.000	Millipore, Bedford, MA, USA
Centricon YM-30 MWCO 30.000	Millipore, Bedford, MA, USA
Chamber Slides TM , Lab-Tek [®] II, Permanox	Nalgene Nunc, Wiesbaden
Cryoröhrchen	Greiner, Solingen
ECL Hyperfilm	Amersham Biosciences, Freiburg
Econo-Säulen	Bio-Rad, München
Einwegpipetten, 1-50 ml	Falcon, Heidelberg
8W10E, Chamber Slides mit Elektroden	Applied BioPhysics, Troy, NY, USA
Elektroporationsküvette, 0,2 cm	Bio-Rad, München
FACS-Röhrchen, 0,6 ml	Greiner, Solingen

Bezeichnung	Hersteller
Mikroreaktionsgefäße, 0,2-2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen mit Nocken, 35 mm	Greiner, Solingen
Petrischalen, 94 mm	Greiner, Solingen
Reaktionsgefäße Polypropylen, 5-14 ml	BD Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäße Polypropylen, 15-50 ml	BD Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäße Polystyrol, 5-14 ml	BD Falcon, Heidelberg
Slide-A-Lyzer [®] 10K	Pierce, Rockford, IL, USA
Stericups, 0,2 µm	Millipore, Bedford, MA, USA
Sterilfilteraufsatz für Spritzen, 0,2 µm	Millipore, Bedford, MA, USA
6,5 mm Transwell, PC, 5 µm Porengröße	Corning Costar, Bodenheim
6,5 mm Transwell, PC, 0,4 µm Porengröße	Corning Costar, Bodenheim
Universalgeläß, 30ml	Sterilin, Staffordshire, GB
Pipettenspitzen, Aerosol Resistant	Molecular BioProducts, San Diego, USA
96-well Platten, V-Form	Greiner, Solingen
96-well Platten, MaxiSorp	Nalgene Nunc, Wiesbaden
Protran [®] Nitrocellulose Transfer Membrane	Schleicher & Schuell, Dassel
Whatman-Papier, GB005, 1,2 mm	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflasche, T25	BD Falcon, Heidelberg
Zellkulturflasche, T75	BD Falcon, Heidelberg
Zellkulturplatten, 6mm, 96-well	BD Falcon, Heidelberg
Zellkulturplatten, 16mm, 24-well	BD Falcon, Heidelberg
Zellkulturplatten, 35mm, 6-well	BD Falcon, Heidelberg
Zellkulturschale, 90 mm	BD Falcon, Heidelberg
Zellkulturschale, 150 mm	BD Falcon, Heidelberg
Zellkulturschale, 140mm	Nalgene Nunc, Wiesbaden
Zellsieb, 70 µm, Nylon	BD Falcon, Heidelberg

3.1.6 Antikörper und andere Nachweisreagenzien

3.1.6.1 Monoklonale primäre Antikörper

Antigen	Klon	Spezies und Isotyp	Konjugation	Referenz
mESAM	V1G8.2	Ratte IgG _{2a}		Dr. Ulrike Samulowitz
mESAM	V4C10.10	Ratte IgG _{2a}		Dr. Ulrike Samulowitz
mJAM-A	106	Ratte IgG ₁		(Malergue et al., 1998)
mJAM-C	F26	Ratte IgG _{2a}		(Aurrand-Lions et al., 2001)
mICAM-1	YN1.1	Ratte IgG _{2b}		(Takei, 1985)
mVE-Cadherin	11D4.1	Ratte IgG _{2a}		(Gotsch et al., 1997)
mEndomucin	V5C7.8	Ratte IgG ₁		(Morgan et al., 1999)
Unbekannt	V6D7.3	Ratte IgG		Dr. Ulrike Samulowitz
CD146	V6D7.M	Ratte IgG _{2b}		Dr. Ulrike Samulowitz
FLAG Epitop	M2	Maus IgG ₁		Sigma-Aldrich F 3165
β-Catenin	14	Maus IgG ₁		BD 610154
mCD16/CD32	2.4G2	Ratte IgG _{2b} , κ		BD 553142
mCD3e	145-2C11	Hamster IgG ₁ , κ	FITC	BD 553062
mCD4	RM4-5	Ratte IgG _{2a} , κ	FITC	BD 553046
mCD8a	53-6.7	Ratte IgG _{2a} , κ	FITC	BD 553030
mCD11b	M1/70	Ratte IgG _{2b} , κ	FITC	BD 557396
mCD19	1D3	Ratte IgG _{2a} , κ		BD 553783
mCD19	1D3	Ratte IgG _{2a} , κ	FITC	BD 553785
mCD45	30-F11	Ratte IgG _{2b} , κ	FITC	BD 553080
mCD45	30-F11	Ratte IgG _{2b} , κ	R-PE	BD 553081
mCD45	30-F11	Ratte IgG _{2b} , κ	PerCP	BD 557235
Ly-6G	1A8	Ratte IgG _{2a} , κ	FITC	BD 551460
m7/4 Antigen	7/4	Ratte IgG _{2a}	RPE	Serotec MCA771PE
Unspezifisch	B39-4	Ratte IgG _{2a} , λ	FITC	BD 557077
Unspezifisch	R3-34	Ratte IgG ₁ , κ	R-PE	BD 553925

3.1.6.2 Polyklonale primäre Antikörper

Antigen	Bezeichnung	Spezies	Referenz
mESAM, C-Terminus	VE2	Kaninchen	diese Arbeit
Präserum	Prä VE2	Kaninchen	diese Arbeit
mESAM, extrazellulär	VE19	Kaninchen	diese Arbeit
Präserum	Prä VE19	Kaninchen	diese Arbeit
mESAM, extrazellulär	VE20	Kaninchen	diese Arbeit
Präserum	Prä VE20	Kaninchen	diese Arbeit
MCAR, extrazellulär	VE15	Kaninchen	diese Arbeit
Präserum	Prä VE15	Kaninchen	diese Arbeit
MCAR, extrazellulär	VE16	Kaninchen	diese Arbeit
Präserum	Prä VE16	Kaninchen	diese Arbeit
mJAM-A, extrazellulär	KE # 798	Kaninchen	Dr. Klaus Ebnet
Präserum	KE # 869	Kaninchen	Dr. Klaus Ebnet
mJAM-C, extrazellulär	KE # 800	Kaninchen	Dr. Klaus Ebnet
FLAG Epitop		Kaninchen	Sigma-Aldrich #F 7425
ZO-1	Z-R1	Kaninchen	Zymed #61-7300

3.1.6.3 Sekundäre Antikörper und Zweitreagenzien

Spezifität	Konjugation	Referenz
F(ab') ₂ Fragment Esel α Kaninchen IgG (H+L)	Peroxidase	Jackson Immunoresearch, Dianova, Hamburg, # 711-036-152
Whole IgG Ziege α Kaninchen IgG (H+L)	Peroxidase	Jackson Immunoresearch, Dianova, Hamburg, # 111-035-144
F(ab') ₂ Fragment Ziege α Ratte IgG + IgM(H+L)	Peroxidase	Jackson Immunoresearch, Dianova, Hamburg, # 112-036-068
F(ab') ₂ Fragment Ziege α Maus IgG (F(ab') ₂)	Peroxidase	Jackson Immunoresearch, Dianova, Hamburg, # 115-036-072
F(ab') ₂ Fragment Esel α Kaninchen IgG (H+L)	Biotin	Jackson Immunoresearch, Dianova, Hamburg, # 711-066-152
F(ab') ₂ Fragment Esel α Ratte IgG (H+L)	DTAF	Jackson Immunoresearch, Dianova, Hamburg, # 712-016-153
F(ab') ₂ Fragment Ziege α Ratte IgG + IgM (H+L)	DTAF	Jackson Immunoresearch, Dianova, Hamburg, # 112-016-068

F(ab') ₂ Fragment Esel α Ratte IgG (H+L)	Cy TM 2	Jackson Immunoresearch, Hamburg, # 712-226-153	Dianova,
F(ab') ₂ Fragment Esel α Maus IgG (H+L)	Cy TM 2	Jackson Immunoresearch, Hamburg, # 715-226-151	Dianova,
F(ab') ₂ Fragment Esel α Kaninchen IgG (H+L)	Cy TM 3	Jackson Immunoresearch, Hamburg, # 711-166-152	Dianova,
F(ab') ₂ Fragment Esel α Maus IgG (H+L)	Cy TM 3	Jackson Immunoresearch, Hamburg, # 715-166-151	Dianova,
F(ab') ₂ Fragment Esel α Kaninchen IgG (H+L)	R-PE	Jackson Immunoresearch, Hamburg, # 711-116-152	Dianova,
F(ab') ₂ Fragment Esel α Ratte IgG (H+L)	R-PE	Jackson Immunoresearch, Hamburg, # 712-116-153	Dianova,
Streptavidin	PerCP	BD Immunocytometry Systems, Heidelberg, , # 554064	

3.1.7 Oligonukleotide

Alle Primer wurde von der Firma Gibco BRL, Life Technologies (Karlsruhe) synthetisiert.

Name	5'-3' Sequenz	Orientierung	Template
SB1	gcgccatgggaagcaagaccttgaagagctg	Sense	mESAM
SB2	gcgctcgagagcaagaccttgaagagctg	Sense	mESAM
SB4	gcgaagcttaagcagaagaagaaccccacc	Antisense	mESAM
SB5	gcgaagcttatggcgcgctactgtgcttc	Sense	MCAR
SB6	gcggaattcctatactatagaccctgtctgct	Antisense	MCAR
SB11	accagatagtgatcaag	Sense	MCAR
SB12	tggttgctgccaatatag	Antisense	MCAR
SB23	cgccgaagcttagcatcactacacccgaacagaggatc	Sense	MCAR
SB24	ccatccacgaagcatctgtacc	Antisense	MCAR
SB30	gatgaaggcaaaagtatagg	Sense	mESAM
SB31	tggagtctatgtctgcaagg	Sense	mESAM
SB32	agaaagtgtcccattcttg	Antisense	mESAM
SB33	gtgagcttaaagatccacg	Antisense	mESAM
SB34	ccaggtttattgtcatgac	Antisense	mESAM
SB35	cgggatccatgattcttcaggctggaac	Sense	mESAM
SB36	ggaattcacttacctttgaccctgtcatcagc	Antisense	mESAM
SB41	gcgtctagactactgactctgtgcaggcacc	Antisense	mESAM

3.1.9 Rekombinante Plasmide

Alle hier aufgeführten rekombinanten Plasmide wurden vor Verwendung vollständig sequenziert.

ESAM-pCMV5:

Zur Klonierung von murinem ESAM wurde das EST IMAG p998 A042169 über die Schnittstellen *EcoRI* und *XbaI* in den eukaryotischen Expressionsvektor pCMV5 kloniert. Das Plasmid umfasst die gesamte kodierende Sequenz von murinem ESAM.

ESAM-pcDNA3:

Die gesamte cDNA von murinem ESAM wurde über die *EcoRI* und *XbaI* Restriktionsschnittstellen in den pcDNA3 Vektor umklontiert.

ESAM-pTRE2hyg:

Für die Klonierung dieses Konstrukts wurde ESAM-pcDNA3 zunächst mit *XbaI* verdaut, die kohäsiven Enden durch eine Klenow-Reaktion aufgefüllt und nach einer Gelaufreinigung mit *BamHI* verdaut. Das die gesamte kodierende Sequenz von murinem ESAM umfassende DNA-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *PvuII* in den pTRE2hyg Vektor kloniert.

ESAM Δ 5-pcDNA3:

Mit den Oligonukleotiden SB1 und SB41 wurde ein 353 bp großes PCR-Fragment aus ESAM-pcDNA3 amplifiziert und über die Schnittstellen *EcoRV* und *XbaI* in den ESAM-pcDNA3 Vektor kloniert. Das rekombinante Plasmid kodiert für die Aminosäuren 1-389 von murinem ESAM.

ESAM_2+4_pGEX-KG:

Zur Herstellung des ESAM-GST Fusionsproteins wurde die cDNA, die für die Aminosäuren 278-373 von murinem ESAM kodiert, in den prokaryotischen Expressionsvektor pGEX-KG kloniert. Dazu wurde in einer RT-PCR Reaktion mit Gesamt-RNA aus bEnd3 Zellen und den Primern SB2 und SB4 das entsprechende DNA-Fragment amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *HindIII* in den pGEX-KG Vektor kloniert.

ESAM_2+4_pMAL-c2:

Das rekombinante Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein bestehend aus den Aminosäuren 278-373 von murinem ESAM und dem Maltose-bindenden Protein (MBP). Zur Klonierung des Konstrukts wurde das ESAM-Fragment des ESAM_2+4_pGEX-KG Vektors mit *XhoI* und *HindIII* verdaut und über die *SalI* und *HindIII* Schnittstellen in den pMAL-c2 Vektor ligiert.

hIgG₁-pcDNA3:

Das Konstrukt wurde von Dr. Ulrike Samulowitz während ihrer Doktorarbeit an diesem Institut kloniert. Es umfasst die Nukleotide 553-1803 der Gen Bank Sequenz J00228, die die genomische Sequenz der drei durch Introns getrennten Exons für die Hinge-, die C_{H2}- und die C_{H3}-Region der schweren Kette des humanen IgG₁ enthält.

ESAM-hIgG₁-pcDNA3:

Zur Herstellung des ESAM-hIgG₁ Fusionsproteins wurde die extrazelluläre Domäne von murinem ESAM mit den Aminosäuren 1-249 in den hIgG₁-pcDNA3 Vektor kloniert. Dazu wurden mit Hilfe der Oligonukleotide SB35 und SB36 das entsprechende ESAM-Fragment aus dem ESAM-pcDNA3 Vektor amplifiziert und über die *Bam*H1 und *Eco*RI Schnittstelle in den hIgG₁-pcDNA3 Vektor ligiert.

MCAR-pFLAG-CMV-1:

Zur Klonierung der vollständigen Sequenz von MCAR (gi|1881466) wurde eine RT-PCR Reaktion mit Gesamt-RNA aus Herzgewebe und den Primern SB5 und SB6 durchgeführt. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde über die *Hind*III und *Eco*RI Schnittstellen in den pFLAG-CMV-1 Vektor kloniert.

MCAR-pcDNA3:

Bei der Herstellung dieses rekombinanten Plasmids wurde mit Hilfe der Primer SB53 und SB6 die gesamte cDNA von MCAR aus dem MCAR-pFLAG-CMV-1 Vektor amplifiziert. Über den Primer SB53 wurde dabei die Kozak Sequenz ccgcc eingeführt. Das PCR-Produkt wurde über die Schnittstellen *Hind*III und *Eco*RI in den pcDNA3 Vektor kloniert.

MCAR-hIgG₁-pcDNA3:

Für das MCAR-hIgG₁ Fusionsprotein wurde die DNA-Sequenz für den extrazellulären Teil von MCAR mit den Aminosäuren 1-235 in den hIgG₁-pcDNA3 Vektor kloniert. Aus dem MCAR-pcDNA3 Vektor wurde dazu mit den Oligonukleotiden SB53 und SB54 das entsprechende DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert und über die *Hind*III und *Eco*RI Restriktionsschnittstellen in den Zielvektor kloniert.

3.1.10 Bakterienstämme

E. coli Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α	F ⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 re-cA1 endA1 hsdR17 (r _k ⁻ , m _k ⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1	Promega, Mannheim
BL21	F ⁻ ompT hsdS (r _B ⁻ , m _B ⁻) gal dcm	Amersham Biosciences, Freiburg
TOP10F'	F ⁻ {lacI ^q Tn10 (Tet ^R)} mrcA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Invitrogen, Life Technologies, Karlsruhe

3.1.11 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Referenz
bEnd3	Murines mikrovaskuläres Gehirnendothel	Prof. Dr. Werner Risau, MPI Bad Nauheim
bEnd5	Murines mikrovaskuläres Gehirnendothel	Prof. Dr. Werner Risau, MPI Bad Nauheim
MyEnd	Mikrovaskuläre Zelllinie aus dem Myokard von Mäusen	Prof. Drenkhahn, Universität Würzburg
HUVEC	Primäre humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen	Renate Thanos, dieses Labor
CHO dhfr ⁻	Ovarzellen des chinesischen Hamsters, defizient in Dihydrofolatreduktase	ATCC CRL-9096
MDCK II Tet-off	Epitheliale Nierenzelllinie des Hundes, stabil transfiziert mit pUHD15-1 und pSV2-puro	BD Clontech
MDCK C7	Epitheliale Nierenzelllinie des Hundes	Prof. Dr. Oberleithner, Universität Würzburg
CMT	Murine Epithelzelllinie, Rektalkarzinom	Prof. Dr. Kemler, MPI Freiburg
WEHI-3B	Murine Myelomonocytenzelllinie, Macrophagen-ähnlich	ATCC TIB-68
1G11	Murines Lungenendothel	(Dong et al., 1997)
SJLB.PLP3	CD4 positive Effektor-Gedächtnis T-Zelle Antigen: <i>myelin proteolipid protein</i> (PLP)	Prof. Dr. Engelhardt, TKI, University of Bern, Schweiz

3.1.12 Stabil transfizierte Zelllinien

Zelllinie	Konstrukt	Referenz
CHO dhfr ⁻	mESAM-pcDNA3	diese Arbeit
CHO dhfr ⁻	MCAR-pcDNA3	diese Arbeit
CHO dhfr ⁻	mESAM-hIgG ₁ -pcDNA3	diese Arbeit
CHO dhfr ⁻	MCAR-hIgG ₁ -pcDNA3	diese Arbeit
CHO dhfr ⁻	mJAM-A-pEF-6	Dr. Klaus Ebnet, dieses Labor
CHO dhfr ⁻	mJAM-B-pFLAG-CMV1	Dr. Klaus Ebnet, dieses Labor
CHO	mJAM-C S281A	Dr. Aurrand-Lions, CMU, Genf, Schweiz
MDCK C7	mESAM-pcDNA3	diese Arbeit
MDCK C7	mESAM Δ 5-pcDNA3	diese Arbeit
MDCK C7	pcDNA3	diese Arbeit
MDCK II Tet-off	mESAM-pTRE2hyg	diese Arbeit
MDCK II Tet-off	pTRE2hyg	diese Arbeit

3.1.13 Versuchstiere

New Zealand White Kaninchen

NMRI Mäuse

SJL Mäuse

3.1.14 Spezielle Geräte

Gerät

Hersteller

Mikroskope

Axiovert 25

Zeiss, Göttingen

Fluoreszenz-Mikroskop Axioskop 2

Zeiss, Göttingen

Digitalkamera: Model 2.1.1

Visitron Systems, Puchheim

Konfokales Laser Scanning Mikroskop TSC SP

Leica, Mannheim

Zentrifugen

Centrifuge 5417R

Eppendorf, Hamburg

Megafuge 1.0

Heraeus Instruments, Hanau

Sorval RC5C plus

Kendro, Rodenbach

Ultrazentrifuge OptimaTM TL

Beckmann Coulter, München

Ultrazentrifuge OptimaTM L-70K

Beckmann Coulter, München

Varifuge 3.0R

Heraeus Instruments, Hanau

Proteinbiochemie/Molekularbiologie

ABI® Prism 377 Sequenator
 Gene Pulser II, Pulse Controller II und
 Capacitance Extender II
 Mini-Protean II Gelelektrophoresesystem
 PCR-Cycler T-Gradient
 PCR-Cycler UNOII
 Power Supply, Phero-Stab 550
 Power Supply, Phero-Stab 0652
 TE Series Transphor Electrophoresis Unit

Trio-Thermoblock

Sonstige

BIO-TEK FL 600 / Lambda Fluoro 320
 CASY® 1 Model TT
 Cell Harvester
 CO₂ Inkubator BB6620 CU
 ELISA Reader E^{MAX}
 Entwickler Curix 60
 Fluorimeter FluoroMax-2
 FACSCalibur
 Impedanz Messgerät

 Inkubator Modell 500
 Milli-Q Plus PF
 Schüttelinkubator Innova 4300
 SpeedVac AES 1000
 Sterilbank
 Ultraschallprozessor
 UV-Spektralphotometer Gene Quant II

 Vis-Spektralphotometer UV-1202

Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA
 Bio-Rad, München

Bio-Rad, München
 Biometra, Göttingen
 Biometra, Göttingen
 Biotec-Fischer, Reiskirchen
 Biotec-Fischer, Reiskirchen
 Hoefer Scientific Instrument, Piscataway, USA
 Biometra, Göttingen

MWG-Biotech, Ebersberg
 Schärfe-System GmbH, Reutlingen
 Inotech AG, Dottikon, Schweiz
 Heraeus Instruments, Hanau
 MWG-Biotech, Ebersberg
 Agfa, Köln
 Jobin-Yvon, Grasbrunn
 Becton Dickinson, SanJose, USA
 AG Prof. Galla, Institut für Biochemie, Münster
 Memmert, Schwabach
 Millipore, Bedford, MA, USA
 Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
 Savant Instruments, Farmingdale, USA
 BDK, Sonnenbühl-Genkingen
 Dr. Hielscher GmbH, Stuttgart
 Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
 Shimadzu, Duisburg

3.1.15 Software und Internet-Adressen

Neben spezieller Software für einige der oben aufgeführten Geräte wurden noch folgende Software und Internet-Adressen für die vorliegende Arbeit verwendet:

Adobe Photoshop 5	Adobe Systems Inc., San Jose, USA
DNASTAR Lasergene Software	DNASTAR Inc., Madison, WI, USA
FreeHand 8.0	Macromedia, Inc., USA
MS Office	Microsoft Deutschland, Unterschleissheim
SigmaPlot 2001	SPSS GmbH Software, München

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc

www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos

www.cbs.dtu.dk/services/SignalP

www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0

www.ebi.ac.uk/clustalw

www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterienkulturen

Bakterien wurden auf Agarplatten bei 37°C im Wärmeschrank oder als Flüssigkultur im Schüttelinkubator bei 37°C und 200 rpm angezogen. Eine Selektion transformierter Bakterien erfolgte durch Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin. Zur langfristigen Lagerung bei -80°C wurden Bakterien einer frischen Flüssigkultur in Einfriermedium resuspendiert und schockgefroren.

Spezielle Materialien:

LB-Medium, LB-Agar

Einfriermedium: 25% Glycerin in LB-Medium
 Ampicillin-Stammlösung: 200 mg/ml Ampicillin in Methanol

3.2.1.2 Gesamt-RNA Isolierung

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mit TRIzol[®], einem Gemisch aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde jeweils 50-100 mg Gewebe in 1 ml Reagenz homogenisiert. Bei adhärent wachsenden Zellen wurde der konfluente Monolayer mit PBS gewaschen und die Zellen nach Zugabe von 1 ml TRIzol[®] pro 10 cm² durch auf- und abpipettieren direkt auf der Platte lysiert. In beiden Fällen folgte eine Inkubation für 5 Min bei RT, um eine vollständige Dissoziation des Nukleinsäure-Protein-Komplexes zu erzielen. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro 1 ml TRIzol[®] wurde die Probe für 15 Sek kräftig geschüttelt und für weitere 2-3 Min bei RT inkubiert. Es folgte eine Phasentrennung durch Zentrifugation bei 12000 x g und 4°C für 15 Min. Die obere wässrige Phase wurde unter Vermeidung der Interphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und die Gesamt-RNA durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol während einer 15-minütigen Inkubationszeit bei RT präzipitiert. Die durch eine Zentrifugation bei 12000 x g und 4°C für 10 Min pelletierte RNA wurde 2x mit 75% Ethanol gewaschen und dabei für jeweils 5 Min bei 7500 x g und 4°C zentrifugiert. Das Gesamt-RNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet, in DEPC-H₂O aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt.

Spezielle Materialien:

Chloroform, Isopropanol, TRIzol[®]

DEPC-H₂O: H₂O_{MilliQ} wurde mit 0,05% DEPC versetzen, über Nacht lichtgeschützt gerührt und anschließend zweimal autoklaviert

75% Ethanol: verdünnt mit DEPC-H₂O

3.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA oder RNA basiert auf dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm. Die Messung erfolgt in Quarzküvetten, da diese das UV-Licht nicht absorbieren. Ein Absorptionswert von $OD_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Da das Absorptionsmaximum von Proteinen, das auf der Absorption aromatischer Aminosäuren beruht, bei 280 nm liegt, kann anhand des Quotienten OD_{260}/OD_{280} die Reinheit der Nukleinsäure abgeschätzt werden. Eine reine DNA-Lösung hat dabei einen OD_{260}/OD_{280} –Wert von 1,8, eine reine RNA-Lösung von 2,0. Durch Kontamination mit Proteinen oder Phenol verringert sich der Wert. Die Konzentrationsbestimmung geringer Mengen DNA erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese (3.2.1.6) mit Ethidiumbromid und Konzentrationsstandard.

3.2.1.4 Reverse Transkription

Für eine Amplifikation mittels PCR ist es zunächst notwendig, RNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umzuschreiben. Hierzu wurden Gesamt-RNA und oligo dT₂₉V Primer in 20 μl DEPC-H₂O für 10 Min bei 65°C denaturiert, sofort auf Eis gestellt und RT Puffer, dNTP Mix, RNase Block Ribonuclease Inhibitor und MMLV Reverse Transkriptase hinzugefügt. Die eigentliche Reaktion erfolgte bei 37°C für 90 Min und wurde durch Inkubation bei 95°C für 5 Min beendet. Eine Standardreaktion setzte sich folgendermaßen zusammen:

1-2,5 μg	Gesamt-RNA
2,5 μM	oligo dT ₂₉ V Primer
1x	RT Puffer
500 μM	dNTP mix (125 μM each)
20 U	RNase Block Ribonuclease Inhibitor
<u>25 U</u>	<u>MMLV Reverse Transkriptase</u>
ad 50 μl	DEPC-H ₂ O

Spezielle Materialien:

DEPC-H₂O, dNTP mix, MMLV Reverse Transkriptase, oligo dT₂₉V Primer, RNase Block Ribonuclease Inhibitor, 10x RT Puffer

3.2.1.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifizierung von Nukleinsäuren. Nach einer Denaturierung der DNA binden Oligonukleotide an den zu amplifizierenden DNA-Einzelstrang (Annealing) und können an ihrem freien 3'-OH Ende von einer DNA-Polymerase verlängert werden (Extension). Durch Einsatz von zwei Primern, einen der am sense-Strang und einen der am Gegenstrang bindet, erhält man theoretisch bei jedem Reaktionszyklus eine Verdoppelung des zwischen den Primern befindlichen DNA-

Abschnittes. Zur Abschätzung der Annealingtemperatur der Primer wurde folgende Formel verwendet:

$$T_{AN} [^{\circ}\text{C}] = 4x (\text{nG} + \text{nC}) + 2x (\text{nA} + \text{nT}) - 5^{\circ}\text{C}$$

mit n = Anzahl der Basen

Reaktionsansatz:	40-100 ng	cDNA "Äquivalent" oder 10 ng Plasmid-DNA
	0,5 mM	dNTP mix (0,125 mM/dNTP)
	0,4 μM	sense Primer
	0,4 μM	antisense Primer
	1x	Platinum <i>Pfx</i> Puffer
	1 mM	MgSO ₄
	0,5 μl	Platinum <i>Pfx</i> DNA Polymerase
	ad 50 μl	H ₂ O _{MilliQ}

Reaktionszyklus der PCR:

Initiale Denaturierung 94°C 2 Min 30 Sek

35 Zyklen von:

Denaturierung 94°C 30 Sek

Annealing T_{AN} 30 Sek

Elongation 68°C 2 Min

Abschließende Elongation 68°C 7 Min

Pause 4°C

Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (3.2.1.6) aufgetrennt.

Spezielle Materialien:

Platinum *Pfx* DNA Polymerase, 10x PCR Puffer, 2,5 mM dNTP mix, 10 μM Primer, 50 mM MgSO₄

3.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte in 1%igen (w/v) Agarosegelen. Dazu wurde die benötigte Menge Agarose in 1x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst, nach Abkühlen auf 60°C mit 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid versetzt und in eine horizontale Gelapparatur gegossen. Das erstarrte Gel wurde mit 1x TBE überschichtet, die mit 5x DNA-Probenpuffer versetzten Proben in die Geltaschen pipettiert und bei 50-80 V aufgetrennt. Durch das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid konnten die DNA-Fragmente anschließend auf einem Transilluminator ($\lambda = 366 \text{ nm}$) sichtbar gemacht werden. Eine Konzentrationsbestimmung und Größenzuordnung erfolgte durch Vergleich mit den Fragmenten der SmartLadder, die neben einem Größen- auch einen Konzentrationsstandard darstellt. Für die Klonierung von PCR-Produkten wurden diese mit einem Skal-

pell ausgeschnitten und zur sich anschließenden Aufreinigung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Spezielle Materialien:

Agarose, 10 mg/ml Ethidiumbromid, SmartLadder

5x DNA-Probenpuffer: 0,25% (w/v) Bromphenol Blau
 0,25% (w/v) Xylencyanol FF
 30% Glycerin

3.2.1.7 Gelextraktion von Nukleinsäuren

Die Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (oder des Perfectprep Gel Cleanup Kit) wie vom Hersteller beschrieben durchgeführt. Im letzten Schritt wurde allerdings die DNA mit nur 50 µl (oder 30 µl) H₂O_{MilliQ} eluiert und ein Aliquot von 1-5 µl zur Kontrolle auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

Spezielle Materialien:

QIAquick Gel Extraction Kit, Perfectprep Gel Cleanup Kit

3.2.1.8 Restriktionsverdau

Zum Klonieren eines DNA-Fragments nach einer PCR mit Oligonukleotiden, die über eine Restriktionsschnittstelle verfügen, oder um ein DNA-Fragment in einen anderen Vektor umzuklonieren, wurden ein Restriktionsverdau durchgeführt. Der für die Reaktion verwendete Puffer entsprach den Angaben des Herstellers, bei einem Doppelverdau wurde der für beide Enzyme empfohlene Puffer eingesetzt. Bei dem Restriktionsverdau eines Plasmids wurden 5-10 µg DNA eingesetzt und 20 U pro Restriktionsenzym in einem Volumen von 50-100 µl. Bei einem PCR-Produkt hingegen wurden ungefähr 200 ng mit je 5 U Enzym in einem Volumen von 40 µl verdaut. Die Reaktion erfolgte in beiden Fällen bei 37°C für 2 h und wurde durch Hitzeinaktivierung bei 65°C für 10 Min beendet. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden durch Gelelektrophorese (3.2.1.6) der Größe nach aufgetrennt und anschließend aufgereinigt (3.2.1.7).

Spezielle Materialien:

10x Puffer, Restriktionsenzyme

3.2.1.9 Klenow-Reaktion

Zum Auffüllen kohäsiver Enden nach dem Restriktionsverdau eines DNA-Fragments und damit zur Erzeugung von stumpfen Enden wurde die DNA mit der DNA Polymerase I Large Fragment (Klenow) inkubiert. Die Reaktion erfolgte im Anschluss an einen Restriktionsverdau ohne vorherige Aufreinigung durch Zugabe von 33 µM dNTPs und 1 µg Klenow pro 1µg DNA. Nach Inkubation für 15 Min bei RT wurde die DNA Polymerase durch Zugabe von 10 mM EDTA inhibiert, und die Reaktion durch Inkubation bei 75°C für

20 Min beendet. Es folgte eine Auftrennung im Agarosegel und eine Aufreinigung des DNA-Fragments.

Spezielle Materialien:

DNA Polymerase I Large Fragment (Klenow), dNTP mix, 500 mM EDTA

3.2.1.10 Dephosphorylierung

Um die Religation eines Vektors zu minimieren und damit die Zahl der falsch positiven *E. coli* Klone zu reduzieren, falls nur mit einem Restriktionsenzym verdaut wurde oder der Doppelverdau unvollständig war, wurden seine 5'-Enden dephosphoryliert. Dazu wurde das Plasmid nach dem Restriktionsverdau ohne vorherige Aufreinigung mit 2x 1 µl Shrimp Alkaline Phosphatase versetzt und für jeweils 10 Min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Vektor auf einem Agarosegel aufgetrennt (3.2.1.6) und gelgereinigt (3.2.1.7).

Spezielle Materialien:

Shrimp Alkaline Phosphatase

3.2.1.11 Ligation

Die Ligation von 50 ng Vektor mit dem 3-fachen molaren Überschuss an DNA-Fragment erfolgte in einem Volumen von 35 µl nach Zugabe von 1x DNA Ligase Reaction Buffer und 0,5 U T4 DNA Ligase durch Inkubation für 3 h bei RT. Der Reaktionsansatz wurde anschließend in einer Elektrotransformation eingesetzt (3.2.1.12).

Alternativ zur oben beschriebenen Ligation wurde das Quick Ligation™ Kit verwendet, bei dem ebenfalls 50 ng Vektor und die 3-fache molare Menge an DNA-Insert eingesetzt wurden. Das Volumen wurde mit H₂O_{MilliQ} auf 10 µl aufgefüllt und 10 µl 2x Quick Ligation Puffer hinzugefügt. Nach sorgfältigem Mischen wurde 1 µl der Quick T4 DNA Ligase zugegeben und für 5 Min bei RT inkubiert. Der Ligationsansatz wurde sofort auf Eis gestellt und für die Transformation chemisch kompetenter Zellen verwendet (3.2.1.12) oder bei -20°C aufbewahrt.

Spezielle Materialien:

5x DNA Ligase Reaction Buffer, T4 DNA Ligase (GIBCO, 1 U/µl)

2x Quick Ligation Buffer, Quick T4 DNA Ligase

3.2.1.12 Transformation

Elektrotransformation von *E. coli*

Herstellung von elektrokompetenten Zellen:

Eine frische Übernachtskultur von *E. coli* (DH5α oder BL21) wurde 1:100 in 400 ml LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 - 0,7 kultiviert. Die Zellsuspension wurde daraufhin für mindestens 10 Min auf Eis abgekühlt, bevor die Bakterien bei 2800 x g und

2°C für 10 Min abzentrifugiert wurden. Für die nachfolgenden Schritte wurden alle Puffer und Reaktionsgefäße auf Eis vorgekühlt. Die Bakterien wurden zweimal mit je 200 ml 1 mM Hepes (pH 7,05) und einmal mit 50 ml 1 mM Hepes (pH 7,05)/10% Glycerin gewaschen. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 400 µl 1 mM Hepes (pH 7,05)/10% Glycerin resuspendiert, 40 µl Aliquots auf 0,6 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und sofort in einer Ethanol/Trockeneis Mischung schockgefroren. Die Lagerung der elektrokompenten Zellen erfolgte bei -80°C.

Elektrotransformation:

Bei einer Elektroporation wird die Zellmembran durch kurze elektrische Pulse hoher Feldstärke für hochmolekulare Moleküle wie DNA permeabel. Es wurden 5 µl des Ligationsansatzes mit 50 µl H₂O_{MiliQ} verdünnt und zusammen mit 40 µl auf Eis aufgetauten elektrokompenten *E. coli* in eine Elektroporationsküvette (0,2 cm Spaltbreite) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 2,5 kV, einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ω mit dem Gene Pulser II, Pulse Controller II und Capacitance Extender II von Bio-Rad. Anschließend wurden die elektroporierten Bakterien in 1 ml 37°C warmem LB-Medium aufgenommen und für 1 h unter Standardbedingungen (3.2.1.1) kultiviert. Von diesem Reaktionsansatz wurden 10% und 90% auf LB-Amp Platten ausplattiert und über Nacht inkubiert.

Für die Transformation elektrokompenter *E. coli* BL21 wurde statt des Ligationsansatzes 50 ng Plasmid-DNA eingesetzt.

Spezielle Materialien:

Elektroporationsküvette (0,2 cm), 1 mM Hepes (pH 7,05), 1 mM Hepes (pH 7,05)/10% Glycerin, LB-Medium, LB-Amp Platten,

Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*

Herstellung von chemisch kompetenten Zellen:

Eine frische Starterkultur von *E. coli* DH5α wurde 1:100 in 25 ml LB verdünnt, bis zu einer OD₆₀₀ = 0,3 - 0,5 bei Standardbedingungen (3.2.1.1) inkubiert und dann 10 Min auf Eis abgekühlt. Es folgte eine Zentrifugation bei 820 x g und 4°C für 15 Min. Das Bakterienpellet wurde in 3 ml eiskaltem TSS Puffer aufgenommen und sorgfältig resuspendieren. Die sofort kompetenten Zellen wurden als 100 µl Aliquots auf Reaktionsgefäße aufteilt und sofort eingesetzt.

Transformation von chemisch kompetenten Zellen:

Ein Aliquot von 100 µl chemisch kompetenter Zellen wurde mit 1-50 µl DNA-Lösung oder Ligationsansatz vermischt. Nach 30 Min auf Eis wurde der Reaktionsansatz für 5 Min bei 37°C inkubiert. Das Volumen wurde mit LB-Medium verdoppelt, die Zellen für weite-

re 30 Min bei 37°C im Wasserbad kultiviert und anschließend auf LB-Amp Platten ausplattiert.

Spezielle Materialien:

LB-Medium, LB-Amp Platten

TSS Puffer: 9 ml LB-Medium
 0,5 ml DMSO
 0,5 ml 1M MgCl₂
 1 g PEG 6000
 sterilfiltriert (0,2 µm Filter)

3.2.1.13 Klonierung mit dem TOPO-TA Cloning Kit

Anfügen von 3'A-Überhängen an PCR Produkte:

Durch Verwendung der Platinum *Pfx* DNA Polymerase fehlen 3'A Überhänge an den PCR-Produkten, um diese direkt im TOPO-TA Cloning Kit einzusetzen. Die SuperTaq DNA Polymerase hingegen besitzt eine Template-unabhängige Transferase-Aktivität und fügt Desoxyadenosin an die 3'-Enden von DNA-Fragmenten an. Nach Gelaufreinigung der PCR-Produkte (3.2.1.7) wurden deshalb circa 50 ng DNA-Fragment mit 1x SuperTaq Puffer, 1,7 mM MgSO₄, 3,3 mM dATP und 0,5 µl SuperTaq in einem Volumen von 15 µl H₂O_{MilliQ} für 10-15 Min bei 72°C inkubiert.

Ligation:

Ohne vorherige Aufreinigung wurden 4 µl PCR-Produkt mit 1 µl pCR® -TOPO® Vektor gemischt, für 5 Min bei RT inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 6x TOPO Cloning Stop solution beendet. Topoisomerase I ist kovalent an den linearisierten pCR® -TOPO® Vektor mit 3'T Überhang gebunden und bei Ausbildung der Phosphodiesterbindung wird das Enzym abgespalten. Bis zur Transformation wurde das Reaktionsgefäß auf Eis gestellt.

Transformation :

Für eine blau-weiß Selektion wurden 40 µl 40 mg/ml X-Gal und 40 µl 100 mM IPTG gleichmäßig auf LB-Amp Platten verteilt und diese bis zur Verwendung bei 37°C gelagert. Die TOP 10F' One Shot® Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 2 µl des Ligationsansatzes hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 30 Min auf Eis wurden die Bakterien für 30 Sek bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Das Reaktionsgefäß wurde sofort auf Eis gestellt und 250 µl RT warmes SOC-Medium hinzugeben. Unter Standardbedingungen (3.2.1.1) wurde 1 h inkubiert und dann pro Reaktionsansatz 50 µl und 250 µl auf vorbereitete LB-Amp Platten ausplattiert. Nach Kultivierung über Nacht bei 37°C wurden für weitere Analysen weiße Kolonien gepickt.

Spezielle Materialien:

50 mM dATP, 100 mM IPTG, pCR® -TOPO® Vektor, LB-Amp Platten, 50 mM MgSO₄, SOC-Medium, SuperTaq DNA Polymerase, 10x SuperTaq Puffer, 6x TOPO Cloning Stop solution

40 mg/ml X-Gal: 400 mg X-Gal
 10 ml Dimethylformamid

3.2.1.14 Plasmid-DNA Isolierung

Bei der Klonierung eines DNA-Fragments wurden zur Analyse der Klone nach der Transformation 10 Einzelkolonien gepickt und je 3 ml LB-Amp Medium angeimpft. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Quantum Prep® Plasmid Miniprep Kit, wenn mit dem ABI® Prism 377 Sequenator sequenziert wurde. Falls die Sequenzierung im Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster (UKM) erfolgte, wurde Plasmid-DNA mit Hilfe des High Pure Plasmid Isolation Kit nach Angaben des Herstellers isoliert. Allerdings wurde hierbei statt des Waschpuffers 1 500 µl Waschpuffer 2 eingesetzt und beim 2. Waschschrift nur 200 µl Waschpuffer 2 verwendet. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte in beiden Fällen mit H₂O_{MilliQ}. Größere Mengen Plasmid-DNA wurden mit dem QIAfilter Plasmid Maxi Präp Kit nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

Zusätzliche Materialien:

Quantum Prep® Plasmid Miniprep Kit (BIO-RAD)
 High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche)
 QIAfilter Plasmid Maxi Kit (QIAGEN)

3.2.1.15 Präzipitation von Nukleinsäuren

Zur Präzipitation von Plasmid-DNA aus verdünnter Lösung wurde 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen 96% Ethanol zugegeben. Nach gründlichem Mischen der Probe wurde bei 20000 x g und 4°C für 15 Min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, in der Speed Vac getrocknet, in der gewünschten Menge an H₂O_{MilliQ} aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

Zusätzliche Materialien:

3 M Natriumacetat (pH 5,2), 96% Ethanol, 70% Ethanol

3.2.1.16 DNA-Sequenzierung**Sequenzierung mit dem ABI® Prism 377 Sequenator:**

Reaktionsansatz: 0,8 µg Plasmid-DNA
 1 µM Primer
 2 µl ABI PRISM BigDye™ Premix
 ad 5 µl H₂O_{MilliQ}

Reaktionszyklus der PCR:

Initiale Denaturierung	96°C	1 Min
25 Zyklen von:		
Denaturierung	96°C	20 Sek
Annealing	T _{AN}	15 Sek
Elongation	60°C	4 Min
	4°C	Pause

Nach der PCR wurde 15 µl H₂O_{MilliQ} zum Reaktionsansatz hinzugefügt, und die DNA durch Zugabe von 2 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 55 µl 96% Ethanol gefällt. Es folgte eine Zentrifugation bei 20000 x g und RT für 15 Min. Das Pellet wurde mit 300 µl 75% Ethanol gewaschen und in der SpeedVac getrocknet. Die Probe wurde in 2 µl ABI Loading Buffer aufgenommen, kurz vor dem Auftragen auf das Gel bei 95°C für 2 Min denaturiert und dann sofort auf Eis gestellt.

Für das Sequenziergel wurden 25 ml Gellösung mit 200 µl 10% APS und 10 µl TEMED versetzt und das Gel in die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Nach vollständiger Polymerisation erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente in 1x TBE nach Angaben des Herstellers.

Spezielle Materialien:

ABI Premix, ABI Loading Buffer, 10% (w/v) APS, 96% Ethanol, 75% Ethanol, 3M Natriumacetat (pH 5,2), 1x TBE, TEMED

Gellösung: 180 g Harnstoff
 75 ml 30% Acrylamid-Lösung (Acrylamid/Bisacrylamid = 29:1)
 60 ml 10x TBE Puffer
 230 ml H₂O_{MilliQ}

Sequenzierung im Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster (UKM):

Sequenzierreaktion:	200-400 ng	Plasmid-DNA
	2 µl	ABI PRISM BigDye™ Premix
	<u>1 µl</u>	<u>10 µM Primer</u>
	ad 8 µl	H ₂ O _{MilliQ}

PCR-Bedingungen:

Initiale Denaturierung	96°C	5 Min
25 Zyklen von:		
Denaturierung	96°C	10 Sek
Annealing und Elongation	T _{AN}	4 Min
	4°C	Pause

Die PCR Probe wurde anschließend mit 10 µl H₂O_{MilliQ} versetzt und mit dem DyeEx 2.0 Spin Column nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die weiteren Schritte der Sequenzierung wurden im Zentrallabor des UKM durchgeführt.

Zusätzliche Materialien:

ABI PRISM BigDye™ Premix, DyeEx 2.0 Spin Column, 10 µM Primer

Die Analyse der DNA-Sequenzen erfolgte mit dem Software-Paket von DNASTar und den Diensten des NCBI.

3.2.2 Zellbiologische Methoden**3.2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen**

Die allgemeinen Kulturbedingungen der in dieser Arbeit verwendeten Zellen sind tabellarisch zusammengefasst.

Zelllinie	Medium	Kulturbedingungen
bEnd3	DMEM Vollmedium mit FCS (BioWest)	10% CO ₂ 0,2% Gelatine alle 3-4 Tage 1:3 splitten
bEnd5	DMEM Vollmedium mit FCS (BioWest) + 1mM Natriumpyruvat + 1% MEM Non-essential amino acids + 50 µM β-Mercaptoethanol	10% CO ₂ alle 14 Tage 1:3 splitten alle 3 Tage Mediumwechsel
CHO dhfr ⁻	α-MEM Vollmedium mit FCS (PAN)	10% CO ₂ alle 3 Tage 1:5-1:10 splitten
CMT	DMEM Vollmedium mit FCS (PAN)	10% CO ₂ alle 3-4 Tage 1:10 splitten
COS-7	DMEM Vollmedium mit FCS (PAN)	10% CO ₂ Alle 3 Tage 1:5 splitten
HUVECs	Medium 199 + 20% FCS (PAN) + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 100 ng/ml Heparin + 80 ng/ml ECSG	5% CO ₂ 0,5% Gelatine alle 3-4 Tage 1:3 splitten alle 2 Tage Mediumwechsel
Hybridome	DMEM Vollmedium mit FCS (PAN) 1x HAT Supplement Makrophagen	10% CO ₂ alle 2-3 Tage 1:2-1:3 splitten
MDCK C7	MEM Medium + 10% FCS (Gold) + 100 U/ml Penicillin	10% CO ₂ alle 7 Tage 1:10 splitten alle 3 Tage Mediumwechsel

	+ 100 µg/ml Streptomycin + 50 ng/ml Doxycyclin	
MDCK II Tet-off	DMEM Vollmedium mit FCS (PAN) + 100 µg/ml G418 + 1 µg/ml Puromycin	10% CO ₂ alle 7 Tage 1:10 splitten alle 3 Tage Mediumwechsel
MTD-1A	DMEM Vollmedium mit FCS (PAN)	10% CO ₂ alle 3-4 Tage 1:10 splitten
WEHI-3B	DMEM Vollmedium mit FCS (PAN)	10% CO ₂ alle 3 Tage 1:5-1:10 splitten
1G11	DMEM Vollmedium mit FCS (BioWest) + 1mM Natriumpyruvat + 1% MEM Non-essential amino acids + 100 ng/ml Heparin + 80 ng/ml ECSG	10% CO ₂ alle 3-4 Tage 1:3 splitten

Passagieren adhärent wachsender Zellen:

Bis auf die Hybridome wachsen alle oben aufgeführten Zellen adhärent. Im 37°C Wasserbad wurden PBS, PBS/5 mM EDTA, Trypsin/EDTA und das benötigte Vollmedium erwärmt. Der konfluente Zellmonolayer wurde mit PBS gewaschen und je nach Zelltyp für 1-20 Min mit Trypsin/EDTA Lösung inkubiert. Bei CHO und COS-7 Zellen war die Verwendung von PBS/5 mM EDTA ausreichend, während die MDCK C7 Zellen zuerst mit PBS/5 mM EDTA für 5 Min vorinkubiert und erst nach einer längeren Inkubationszeit mit Trypsin/EDTA abgelöst werden konnten. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von Vollmedium abgestoppt, die Zellen von der Platte bzw. Flasche abgespült und bei 209 x g für 5 Min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde im gewünschten Vollmedium resuspendiert und im oben angegebenen Splitverhältnis oder nach Bestimmung der Zellzahl mit definierter Zelldichte ausgesät. Die bEnd3 und HUVECs wurden auf Platten kultiviert, die zuvor mit 0,2% bzw. 0,5% Gelatine beschichtet worden waren (3.2.2.2).

Kyrokonservierung von Zellen:

Das Einfrieren von Zellen sollte schnell erfolgen, da das im Einfriermedium vorhandene DMSO nicht nur in die Zellen diffundiert und die Eiskristallbildung verhindert, sondern auch toxisch wirkt. In der Regel wurden 1/2 bis 1/3 der Zellen einer Zellkulturschale oder -flasche pro Cryoröhrchen eingefroren. Die gerade konfluenten Zellen wurden wie oben beschrieben von der Platte abgelöst, in Vollmedium bei 209 x g für 5 Min pelletiert und in kaltem Einfriermedium resuspendiert. Nach Überführung in ein Cryoröhrchen wurde die Zellsuspension zunächst in einer Styroporbox im -80°C Eisschrank eingefroren und nach einem Tag zur langfristigen Lagerung in den -196°C flüssigen Stickstoff Tank überführt.

Auftauen von Zellen:

Das Cryoröhrchen mit den eingefrorenen Zellen wurde aus dem Stickstofftank entnommen und zügig im 37°C Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden mit einer 2 ml Pipette entnommen und in 10 ml warmes Vollmedium gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei 209 x g für 5 Min, die Zellen wurden in frischem Vollmedium aufgenommen und in der gewünschten Dichte ausgesät.

Lebendzählung:

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer, die aus 9 Großquadraten mit einer Fläche von jeweils 1 mm² besteht. Es wurden die 4 äußeren Großquadrate ausgezählt, der Wert gemittelt und mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor 10⁴ Zellen/ml multipliziert. Zur Feststellung der Lebendzahl wurde die Zellsuspension mit dem gleichen Volumen an 0,4% Trypanblaulösung versetzt und für 3 Min bei RT inkubiert. Lebende Zellen färben sich nicht blau, weil sie hineindiffundiertes Trypanblau aktiv aus der Zelle transportieren.

Spezielle Materialien:

Einfriermedium, 0,4% Trypanblaulösung

PBS/EDTA: PBS

 5 mM EDTA

Trypsin/EDTA: 0,05% (w/v) Trypsin

 0,02% (w/v) EDTA

3.2.2.2 Beschichtung von Zellkulturschalen und Filtern**Beschichtung mit Gelatine:**

Die Gelatine-Gebrauchslösung wurde in die Zellkulturschale, die Vertiefung des Lab-Tek Chamber Slide oder auf den Transwell Filter pipettiert. Nach einer Inkubation für 30 Min im Brutschrank oder über Nacht bei RT wurde die Proteinlösung abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und im Anschluss die Zellen ausgesät.

Beschichtung mit Laminin:

Das zu beschichtende Material wurde mit ausreichend Laminin-Gebrauchslösung bedeckt und für 30 Min bei RT inkubiert. Die Flüssigkeit wurde vorsichtig abgesaugt, die Transwell Filter oder Lab-Tek Chamber Slides bei angekipptem Deckel für 1 h unter der Sterilbank getrocknet und dann die Zellen darauf ausgesät.

Beschichtung mit Fibronectin:

Die Fibronectin-Gebrauchslösung wurde auf die Transwell Filter oder die Lab-Tek Chamber Slides gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung vorsichtig abgesaugt, einmal mit Medium gewaschen und die Zellen ausgesät.

Spezielle Materialien:

Gelatine-Stammlösung:	2% (w/v) Gelatine
Gelatine-Gebrauchslösung:	0,2% oder 0,5% (w/v) Gelatine-Stammlösung in PBS
Laminin-Stammlösung:	1 mg/ml Laminin
Laminin-Gebrauchslösung:	50 µg/ml Laminin in PBS
Fibronectin-Stammlösung:	1 mg/ml Fibronectin
Fibronectin-Gebrauchslösung:	100 µg/ml Fibronectin in H ₂ O _{MilliQ}

3.2.2.3 Fixierung von Zellen

PFA-Fixierung:

Der Zellmonolayer wurde 3x mit PBS^{mc} gewaschen und mit 4% PFA-Lösung bedeckt. Nach einer Inkubation für 15-20 Min bei RT wurde die Lösung vorsichtig abgesaugt und erneut 3x mit PBS^{mc} gewaschen. Zum Quenchen des überschüssigen PFA folgte eine Inkubation mit 50 mM NH₄Cl-Lösung für 10 Min, gefolgt von 3 Waschstufen mit PBS^{mc}. Die fixierten Zellen konnten für einige Tage in PBS^{mc} mit 0,04% NaN₃ bei 4°C gelagert werden.

Methanol Fixierung:

Für eine Fixierung der Zellen mit Methanol wurde der Monolayer 3x mit PBS^{mc} gewaschen, die restliche Flüssigkeit entfernt, und für 10 Min in -20°C kaltem Methanol fixiert. Anschließend wurde der Zellmonolayer 3x mit PBS^{mc} gewaschen, für 1 h in PBS^{mc} rehydriert und konnte bis zur Immunfluoreszenz-Färbung für einige Tage in PBS^{mc} mit 0,04% NaN₃ bei 4°C aufbewahrt werden.

Spezielle Materialien:

PBS^{mc}, 10% NaN₃, 50 mM NH₄Cl, Methanol

4% PFA-Lösung: 4,00 g Paraformaldehyd in 40 ml H₂O_{MilliQ} unter dem Abzug unter Rühren langsam auf 60-70°C erhitzen. Zugabe von konzentrierter NaOH-Lösung bis die Lösung klar ist. 10 ml 10x PBS hinzufügen, pH-Wert auf pH 7,4 einstellen und ad 100 ml mit H₂O_{MilliQ}. Abkühlen lassen, pH-Wert kontrollieren, filtrieren und in Aliquots bei -20°C aufbewahren.

3.2.2.4 Stabile Transfektion

Das folgende Protokoll wurde für die stabile Transfektion von CHO dhfr⁻, MDCK C7 und MDCK II Tet-off verwendet. Eine 100 mm Zellkulturschale mit gerade konfluenten Zellen wurde 1x mit PBS gewaschen, der CHO dhfr⁻ Monolayer mit 3 ml PBS/5mM EDTA, bei

MDCK C7 und MDCK II Tet-off mit Trypsin/EDTA Lösung inkubiert. Die Zellen wurden mit 10 ml PBS von der Platte ab gespült und bei 209 x g für 5 Min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 600 µl PBS resuspendiert und nach Zugabe von 20 µg Plasmid-DNA in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,4 cm Spaltbreite) überführt. Der Reaktionsansatz wurde für 10 Min auf Eis inkubiert und bei einer Spannung von 250 V und einer Kapazität von 950 µF elektroporiert. Die Zellen wurden sofort in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und zweimal jeweils 2 ml, 1 ml, 500 µl, 250 µl oder 50 µl auf 100 mm Zellkulturschalen ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium von den Zellen entfernt und gegen Zellkulturmedium mit Selektionsantibiotikum ausgetauscht. Das Selektionsantibiotikum richtete sich nach der Zelllinie und dem verwendeten Vektor (siehe Tabelle). Am vierten und siebten Tag nach der Elektroporation wurde das Medium erneuert und spätestens nach elf Tagen Kolonien gepickt. Dazu wurde das Medium von der Zellkulturschale abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Autoklavierte Klonierringe wurden mit einer Pinzette in Laborfett getunkt und über eine sichtbare Kolonie gestülpt. In diese Ringe wurden 50 µl PBS/5 mM EDTA bzw. Trypsin/EDTA pipettiert und kurze Zeit im Brutschrank inkubiert. Die abgerundeten Zellen wurden in 200 µl Medium resuspendiert und in die Vertiefungen einer 24-well Platte überführt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mehrfach passagiert und mittels Immunfluoreszenz (3.2.3.16), Durchflusszytometrie (3.2.2.12) oder Immunoblotting (3.2.3.15) charakterisiert.

Stabil transfizierte Zelllinie	Selektionsantibiotikum
CHO dhfr ⁻ : mESAM-pcDNA3	800 µg/ml G418
CHO dhfr ⁻ : MCAR-pcDNA3	800 µg/ml G418
CHO dhfr ⁻ : mESAM-hIgG ₁ -pcDNA3	800 µg/ml G418
CHO dhfr ⁻ : MCAR-hIgG ₁ -pcDNA3	800 µg/ml G418
CHO dhfr ⁻ : mJAM-A-pEF-6	7 µg/ml Blasticidin
CHO dhfr ⁻ : mJAM-B-pFLAG-CMV1	330 U/ml Hygromycin B
CHO: mJAM-C S281A	800 µg/ml G418
MDCK C7: mESAM-pcDNA3	800 µg/ml G418
MDCK C7: mESAMΔ5-pcDNA3	800 µg/ml G418
MDCK C7: pcDNA3	800 µg/ml G418
MDCK II Tet-off: mESAM-pTRE2hyg	150 µg/ml Hygromycin
MDCK II Tet-off: pTRE2hyg	150 µg/ml Hygromycin

Spezielle Materialien:

10 mg/ml Blasticidin, DMEM Vollmedium, 200 mg/ml G418, 50 mg/ml Hygromycin B, PBS, PBS/5 mM EDTA, Trypsin/EDTA

3.2.2.5 Subklonierung

Alle in dieser Arbeit stabil transfizierten Zellen wurden durch Grenzverdünnung subkloniert, indem jeweils 0,7-0,8 Zellen in die Vertiefungen einer 96-well Platte ausgesät wurden. Dazu wurden konfluente Zellen von der Zellkulturschale abgelöst (3.2.2.1) und die Lebendzellzahl bestimmt. Anschließend wurde die Zellsuspension in einer seriellen Verdünnungsreihe mit Zehnerschritten bis zu einer Konzentration von 7-8 Zellen/ml verdünnt und 100 µl pro Vertiefung einer 96-well Platte ausplattiert. Nach einigen Tagen wurden Einzelklone mikroskopisch verifiziert, zum Erreichen höherer Zellzahlen mehrfach passagiert und anschließend erneut charakterisiert.

3.2.2.6 Präparation von Polymorphkernigen Leukozyten aus dem Knochenmark

Aus einer 7-12 Wochen alten weiblichen NMRI-Maus konnten ungefähr $5-7 \times 10^6$ Polymorphkernige Leukozyten (PMNs) isoliert werden. Alle Arbeitsschritte wurden bei RT und unter semisterilen Bedingungen durchgeführt. Es wurde ausschließlich Plastikmaterial aus Polypropylen verwendet, da die Zellen an Glas und Polystyrol stärker adhären.

Die Oberschenkelknochen (Femur) und Unterschenkelknochen (Tibia) der Maus wurden entnommen, sorgfältig freipräpariert und zwischenzeitlich in einer Petrischale mit HBSS^{-/-} aufbewahrt. Aus den frisch angeschnittenen Knochen wurde das Knochenmark mit Hilfe einer Spritze und 23-g Kanüle mit HBSS^{-/-} herausgespült. Die Knochenmarkzellen wurden mit Hilfe einer 10 ml Pipette weitestgehend resuspendiert, durch ein Zellsieb mit 70 µm Porenweite filtriert und für 10 Min bei 300 x g pelletiert. Bis auf 1 ml HBSS^{-/-} pro 2 NMRI Mäuse wurde der Puffer von den Zellen entfernt, diese darin resuspendiert und vorsichtig auf einen Doppelgradienten mit 4 ml Histopaque 1077, unterschichtet mit 4 ml Histopaque 1119, gegeben. Es folgte eine Zentrifugation für 30 Min bei 680 x g ohne Bremse. Die obere Phasengrenze mit den mononukleären Zellen wurde vorsichtig abgesaugt. Von der zweiten etwas gelblich aussehenden Interphase mit den PMNs wurde zweimal 1 ml entnommen, in ein neues 15 ml Zentrifugen-Röhrchen überführt und mit HBSS^{-/-} aufgefüllt. Nach einer Zentrifugation für 7 Min bei 300 x g wurden die Zellen erneut mit HBSS^{-/-} Puffer gewaschen und schließlich in 2 ml PMN-Medium resuspendiert. Die PMNs wurden in eine 35 mm Petrischale überführt und über Nacht bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert.

Spezielle Materialien:

Histopaque 1077, Histopaque 1119, 35 mm Petrischale, Zellsieb mit 70 µm Porenweite

HBSS^{-/-}: 1x HBSS Puffer (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺)
25 mM Hepes (pH 7,3)

PMN-Medium: 68% DMEM
20% FCS (BioWest, hitzeinaktiviert für 30 Min bei 56°C)
10% WEHI-3B konditioniertes Medium (sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C)
2mM L-Glutamin
100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

3.2.2.7 Präparation von Leukozyten aus dem peripheren Blut

Bei drei weiblichen 7-12 Wochen alten NMRI Mäusen wurde hinter dem Auge insgesamt 1 ml Blut abgenommen, wobei zur Verhinderung der Blutgerinnung 200 µl Citratpuffer in das 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt wurden. Das Blut wurde mit dem 3-fachen Volumen HBSS^{-/-} verdünnt. Es wurden vier Doppelgradienten angesetzt, indem in 15 ml Zentrifugen-Röhrchen 4 ml Histopaque 1077 mit 4 ml Histopaque 1119 unterschichtet wurden. Die Zellsuspension wurde vorsichtig auf die Gradienten verteilt und bei 680 x g und RT für 30 Min ohne Bremse zentrifugiert. Die obere Phasengrenze enthielt mononukleäre Zellen, die untere nur schwer erkennbare Phase die Polymorphkernigen Leukozyten. Von beiden Schichten wurden mit einer Gilson-Pipette je 1 ml entnommen, in ein neues Zentrifugen-Röhrchen überführt und mit HBSS^{-/-} aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 300 x g für 10 Min pelletiert und zweimal mit HBSS^{-/-} gewaschen. Dann wurde das Zellpellet in 5 ml 37°C warmem ACT Puffer resuspendiert und zur Lyse von Erythrozyten für 5 Min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde erneut bei 300 x g für 10 Min zentrifugiert und die Zellen mit HBSS^{-/-} gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1ml FACS-Puffer resuspendiert und die Zellzahl (3.2.2.1) bestimmt.

Spezielle Materialien:

0,106 M Citratpuffer, Histopaque 1077, Histopaque 1119

ACT-Puffer: 9 Volumen 0,83% (w/v) NH₄Cl
 1 Volumen 0,17 M Tris-HCl (pH 7,65)

FACS Puffer: PBS, 3% FCS (dialysiert gegen PBS) und 0,04% NaN₃

HBSS^{-/-}: 1x HBSS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺)
 25 mM Hepes (pH 7,3)

3.2.2.8 Präparation von T-Zellen aus Lymphknoten

Kopplung von α-CD19 Antikörpern an Dynabeads:

Es wurden 2x10⁸ sorgfältig resuspendierte Dynabeads M-450 Schaf α-Ratten IgG in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 ml Waschpuffer zugegeben. Im magnetischen Feld wurden die Dynabeads für 1 Min abgetrennt und der klare Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde 3-4 x wiederholt und die Dynabeads anschließend in 500 µl Waschpuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µg Ratte α-Maus CD19 mAb wurde der Reaktionsansatz über Nacht bei 4°C auf dem Über-Kopf-Schüttler inkubiert.

Präparation von Zellen aus Lymphknoten:

Von einer weiblichen 7-12 Wochen alten NMRI Maus wurden die inguinalen, axillären, cervicalen, poplietalen und mesenterialen Lymphknoten entnommen und in einer 100 mm Zellkulturschale in HBSS^{-/-} gesammelt. Die Lymphknoten wurden von Fett und Bindegewebe befreit und mit einer spitzen Schere klein geschnitten, um den Cortex zu öffnen. Mit dem Stempel einer 1 ml Spritze wurden das Gewebe durch ein Stahlsieb gedrückt und die-

ses mehrfach mit HBSS^{-/-} gespült. Die Zellsuspension wurde durch das Stahlsieb in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, die Zellkulturschale 2 x mit HBSS^{-/-} gespült und die restlichen Zellen dazugegeben. Es wurde bei 300 x g für 10 Min bei RT zentrifugiert, das hauptsächlich aus Lymphozyten bestehende Zellpellet zweimal mit HBSS^{-/-} gewaschen, in 2 ml Waschpuffer resuspendiert und die Lebendzellzahl (3.2.2.1) bestimmt.

Depletion von B-Zellen:

Die mit Ratte α -Maus CD19 mAb gekoppelten Dynabeads wurden mittels Magnet abgetrennt und der klare Überstand mit den ungebundenen mAbs verworfen. Die Dynabeads wurden auf die gleiche Weise 3x mit Waschpuffer gewaschen und anschließend in 1 ml Waschpuffer resuspendiert. Die Suspension wurde auf zwei 15 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und jeweils 6,5 ml Waschpuffer zugegeben. Pro Reaktionsgefäß wurden 5×10^7 Lymphozyten hinzugefügt und für 30 Min bei RT auf dem Über-Kopf-Schüttler inkubiert, um CD19 positive Zellen an die Dynabeads binden zu lassen. Zur Abtrennung der Dynabeads wurde das Reaktionsgefäß einem Magnetfeld ausgesetzt und der klare Überstand in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Dynabeads wurden mit je 3 ml Waschpuffer resuspendiert und der Vorgang wiederholt. Die Überstände mit den CD19 depletierten Zellpopulation wurden vereint und für 300 x g bei RT für 10 Min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml TMA Medium resuspendiert und die Lebendzellzahl (3.2.2.1) bestimmt. Zur Kontrolle der B-Zell Depletion wurde eine durchflusszytometrische Analyse (3.2.2.12) durchgeführt.

Spezielle Materialien:

Dynabeads M-450 Schaf α -Ratte IgG, Dynabead magnetic particle concentrator, Ratte α -Maus CD19 mAb, Stahlsieb

Waschpuffer:	PBS 0,1% (w/v) BSA
HBSS ^{-/-} :	1x HBSS Puffer w/o Mg ²⁺ und Ca ²⁺ 25 mM Hepes (pH 7,3)
TMA-Medium:	DMEM 10% FCS (Biowest, 30 Min bei 56°C hitzeinaktiviert) 2 mM L-Glutamin 25 mM Hepes (pH 7,3)

3.2.2.9 Restimulation von SJLB.PLP3 T-Zellen

Restimulation von T-Zellen:

Von 3 weiblichen SJL Mäusen wurde die Milz entnommen, grob zerkleinert und in Waschpuffer homogenisiert. Die Zellsuspension wurde über ein 100 μ m Netz in ein 50 ml Röhrchen überführt und auf Eis mit 45 Gray bestrahlt. Die Milzzellen wurden bei 300 x g für 10 Min abzentrifugiert, in Restimulationsmedium resuspendiert und auf 2×10^7 Zellen/ml eingestellt. Ein Cyroröhrchen mit SJLB.PLP3 T-Zellen wurde aufgetaut (3.2.2.1)

und die Lebendzellzahl bestimmt. In 60 mm Zellkulturschalen wurden 2×10^6 T-Zellen, 4×10^7 Milzzellen und 10 $\mu\text{g/ml}$ PLP-Stammlösung gegeben und für 3 Tage stimuliert.

Gradient:

Die Stimulation der SJLB.PLP3 T-Zellen wurde nach 3 Tagen am Mikroskop kontrolliert, wobei T-Zell Blasten an ihrer großen, unregelmäßigen Struktur zu erkennen waren. Die Zellen wurden bei 300 x g für 10 Min abzentrifugiert und pro 100 mm Zellkulturschale in 1,5 ml Waschpuffer resuspendiert. Jeweils 3 ml Zellsuspension wurden vorsichtig auf 5 ml Nycoprep 1.077 in ein 15 ml Röhrchen gegeben und bei 540 x g für 20 Min ohne Bremse zentrifugiert. Die Zellen aus der Phasengrenze wurden vorsichtig abgenommen und die Zellen von 2 Gradienten in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 20 ml Waschpuffer resuspendiert. Nach Zentrifugation für 10 Min bei 300 x g wurden die Zellen 3x mit je 20 ml Waschpuffer gewaschen und in TCGF Medium aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden $3,0 \times 10^6$ Zellen pro 100 mm Zellkulturschale in 10 ml TCGF Medium ausplattiert. Am nächsten Tag wurden Aliquots von 3×10^6 Zellen eingefroren und einen Tag vor dem Transmigrationsassay aufgetaut.

Spezielle Materialien:

ConA Überstand, PLP-Stammlösung

Restimulationsmedium:	RPMI 10% FCS (hitzeinaktiviert für 30 Min bei 56°C) 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin 1mM Natriumpyruvat 1x MEM Nichtessentielle Aminosäuren 50 nM β -Mercaptoethanol
TCGF-Medium:	Restimulationsmedium ConA Überstand
Waschpuffer:	HBSS 10% FCS (hitzeinaktiviert für 30 Min bei 56°C) 25mM HEPES (pH 7,3)

3.2.2.10 Zelloberflächen ELISA

Zur Bestimmung der Expression von Zelloberflächenmolekülen wurden $3-6 \times 10^4$ bEnd3 oder $1-2 \times 10^5$ bEnd5 Zellen pro Vertiefung auf einer 96-well Flachbodenplatte ausgesät, 5-7 Tage kultiviert und ggf. für 1-4 h oder 16-20 h mit 5 nM humanem TNF- α stimuliert. Die 96-well Platte wurde für 15 Min zum Abkühlen auf Eis gestellt, das Medium vorsichtig abgesaugt und 5-20 $\mu\text{g/ml}$ Primärantikörper in DMEM Vollmedium auf die Zellen gegeben. Nach Inkubation für 30-60 Min auf Eis wurde der Monolayer 3x mit kaltem PBS^{mc} gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 4% PFA für 15 Min bei 4°C fixiert und erneut 3x mit PBS^{mc} gewaschen. Anschließend wurde 1:1000 – 1:5000 in DMEM-Vollmedium verdünnter PO-konjugierter Sekundärantikörper zugegeben und für 30-60 Min bei RT inkubiert. Nach 5x Waschen mit PBS^{mc} wurde 100 μl Entwicklungslösung pro Vertiefung zupi-

pettiert und bis zur gewünschten Farbintensität im Dunkeln entwickelt. Die Umsetzung von o-Phenylendiamin bei Anwesenheit von H_2O_2 zu einem gelben Farbstoff wurde durch Zugabe von 50 μl 3M HCl abgestoppt. Die Messung der Absorption bei 492 nm erfolgte im ELISA-Reader.

Spezielle Materialien:

DMEM Vollmedium, 3 M HCl, 500 nM humanes TNF- α , 4% PFA, PBS^{mc}

Entwicklungslösung:	2,5 ml 1 M K_2HPO_4
(lichtempfindlich!)	1,25 ml 1 M Zitronensäure
	1 Tablette OPD (30 mg)
	40 μl H_2O_2 (kurz vor der Entwicklung)
	ad 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$

3.2.2.11 ELISA zur Detektion und Quantifizierung von hIgG₁ Konstrukten

Die Vertiefungen einer MaxiSorp Mikrotiterplatte wurden über Nacht bei 4°C oder für 1 h bei 37°C mit 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ F(ab')₂ Fragment Kaninchen α human IgG (Fc γ) in PBS beschichtet. Es wurde 4x mit PBS gewaschen und freie Bindungsstellen mit PBS/1% BSA für 1-2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C blockiert. Nach der Entfernung der Proteinlösung wurde für 1-2 h bei RT mit dem zu untersuchenden Konstrukt inkubiert und 4x mit PBS/1% BSA gewaschen. Dann wurden 1:1000 - 1:2000 in PBS/1% BSA verdünnter PO-gekoppelter F(ab')₂ Fragment Ziege α human IgG (Fc γ) zugegeben und für 30 Min bei RT inkubiert. Nach 5x Waschen mit PBS/0,1% Tween 20 wurde die Konzentration an gebundenem Antikörper mit der oben beschriebenen OPD-Reaktion (3.2.2.10) detektiert. Um die Konzentration von hIgG₁-Fusionsproteinen zu bestimmen, wurde eine Eichreihe mit humanem IgG mitgeführt.

Spezielle Materialien:

F(ab')₂ Fragment Kaninchen α human IgG (Fc γ), PBS, PBS/1% BSA, PBS/0.1% Tween 20 , PO-gekoppelter F(ab')₂ Fragment Ziege α human IgG (Fc γ)

Entwicklungslösung:	2,5 ml 1M K_2HPO_4
Achtung: lichtempfindlich!	1,25 ml 1M Zitronensäure
	1 Tablette OPD (30 mg)
	40 μl H_2O_2 (kurz vor der Entwicklung)
	ad 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$

3.2.2.12 Durchflusszytometrie

Bei der durchflusszytometrischen Analyse stabil transfizierter Zellen (3.2.2.4), zur Kontrolle der B-Zell Depletion nach der Aufreinigung von T-Zellen aus Lymphknoten (3.2.2.8) und für die Charakterisierung von Leukozyten-Populationen (3.2.2.6, 3.2.2.7) wurden zwischen 2×10^5 - 10^6 Zellen pro Probe eingesetzt.

Die Zellen wurden in die Vertiefungen einer 96-well Platte pipettiert, durch Zentrifugation bei 260 x g und 4°C für 3 Min pelletiert und in 100 µl FACS Puffer pro well resuspendiert. Bei Leukozyten wurden die Zellen mit 1 µg/10⁶ Zellen Fc-Block für 5 Min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde der Erstantikörper in einer Konzentration von 10 µg/ml ohne vorherigen Waschschrift hinzugegeben. Als Negativkontrolle wurden Proben mitgeführt, die ohne Primärantikörper oder mit unspezifischen Antikörpern desselben Isotyps inkubiert wurden. Nach einer Inkubation von 15-30 Min auf Eis wurden die Zellen 2x mit FACS Puffer gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit 1:100–1:500 verdünntem Fluoreszenz- oder Biotin-gekoppeltem Sekundärantikörper für 15-30 Min auf Eis. Die Proben wurden erneut 2x mit FACS Puffer gewaschen und bei Verwendung von Biotin-gekoppeltem Sekundärantikörper mit 1:200 Fluoreszenz-gekoppeltem Streptavidin für 15-30 Min auf Eis inkubiert. Direkt gekoppelte Antikörper wurden im letzten Inkubationsschritt in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Die Proben wurden erneut 2x mit FACS Puffer gewaschen und nach Verdünnung mit PBS sofort gemessen. Alternativ wurde das Zellpellet in 1x Cell Fix aufgenommen und die Proben für maximal 3 Tage bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Die Auswertung erfolgte an einem Durchflussscytometer unter Verwendung des Programms CellQuest 3.1f.

Spezielle Materialien:

FACS-Röhrchen, 96-well Platte (V-Form)

FACS Puffer: PBS
 3% FCS (dialysiert gegen PBS)
 0,04% NaN₃

1x Cell Fix: 10% 10x Cell Fix
 90% H₂O_{MiliQ}

3.2.3 Proteinchemie und immunbiochemische Methoden

3.2.3.1 Herstellung und Aufreinigung von GST- und MBP-Fusionsproteinen

Induktion der Proteinexpression in *E. coli* BL21:

Die Expression der GST- und MBP-Fusionsproteine wurde im Protease-defizienten *E. coli* Stamm BL21 durchgeführt. Es wurde 1 l LB-Amp Medium mit einer frischen Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 kultiviert. Dann wurde die Flüssigkultur bis zum Erreichen der RT auf einen Kreisschüttler gestellt und durch Zugabe von 60 µM IPTG die Expression des Fusionsproteins induziert. Nach Kultivierung über Nacht bei RT folgte eine Zentrifugation bei 3800 x g und 4°C für 20 Min. Die sedimentierten Bakterien wurden in PBS resuspendiert, in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut bei 2500 x g und 4°C für 20 Min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde entweder bei –20°C gelagert oder direkt lysiert.

Bakterienlyse durch Lysozym und Ultraschallbehandlung:

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis oder bei 4°C und mit vorgekühltem Puffer und Zentrifugen durchgeführt. Das Bakterienpellet wurde mit Lysepuffer ad 30 ml aufgefüllt, kräftig geschüttelt, bis die Zellen resuspendiert waren, und für 1 h inkubiert. Zur vollständigen Lyse wurden die Zellen mit Ultraschall (Einstellung: halbmaximale Power, 50% Intervall) aufgeschlossen. Das Lysat wurde zuerst bei 460 x g für 10 Min und sofort im Anschluss bei 48000 x g für 30-60 Min zentrifugiert.

Äquilibrierung der Glutathion-Agarose:

Die benötigte Menge an Glutathion-Agarose wurde für 30 Min in kaltem PBS resuspendiert und bei 460 x g und 4°C für 5 Min abzentrifugiert. Das PBS wurde vorsichtig abgesaugt und eine 1:1 Suspension mit PBS hergestellt. Die äquilibrierte Glutathion-Agarose konnte für einige Tage bis wenige Wochen bei 4°C nach Zusatz von 0,04% NaN₃ aufbewahrt werden.

Äquilibrierung der Amylose beads:

Das Säulenmaterial wurde zur Entfernung des Ethanol 3x mit je 50 ml PBS gewaschen und dabei bei 460 x g und 4°C für 5 Min zentrifugiert. Es wurde ebenfalls eine 1:1 Suspension mit PBS hergestellt, die wie die Glutathion-Agarose kurzfristig gelagert werden konnte.

Affinitätsaufreinigung der GST- und MBP-Fusionsproteine:

Das Bakterienlysat wurde nach der Zentrifugation in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und 1-2 ml des zuvor äquilibrierten Säulenmaterials zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 5 Min auf dem Überkopfschüttler im Kühlraum. Dann wurde das Säulenmaterial mit dem gebundenen Fusionsprotein bei 460 x g und 4°C für 5 Min pelletiert, je 2x mit PBS und danach mit PBS/1M NaCl gewaschen und in eine Chromatographiesäule überführt. Es wurde erneut 2x mit je 10 ml PBS/1M NaCl und 1x mit 10 ml PBS gewaschen, mit ½ Volumen Säulenmaterial voreluert und eine Elution mit 3 ml Elutionspuffer pro ml Säulenmaterial durchgeführt.

Regeneration des Säulenmaterials:

Das Säulenmaterial wurde nach der Elution 3x mit je 10 ml PBS/1M NaCl und 3x mit je 10 ml PBS gewaschen und in PBS/0,04% NaN₃ bei 4°C aufbewahrt. Die Glutathion-Agarose und die Amylose Beads konnten bis zu 4x wiederverwendet werden.

Spezielle Materialien:

Probenauftragspuffer: (frisch hergestellt)	1x SDS-PAGE Probenpuffer 4 M Harnstoff
Lysepuffer:	50 ml PBS 10 ml Lysozym-Lösung (20 mg/ml in H ₂ O _{MiliQ}) 10 mM EDTA 1 mM DTT 10 µg/ml Aprotinin 10 µg/ml Leupeptin 1 µg/ml Pepstatin 1 mM PMSF
Elutionspuffer I:	PBS 5 mM Glutathion neutralisiert mit 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
Elutionspuffer II:	PBS 10 mM Maltose

3.2.3.2 Herstellung und Aufreinigung von hIgG₁-Fusionsproteinen

Die Expression von hIgG₁-Fusionsproteinen erfolgte entweder in transient transfizierten COS-7 Zellen oder stabil transfizierten CHO dhfr⁻ Zellen. In beiden Fällen wurde das Protein sezerniert und der Zellkulturüberstand zur Abtrennung von Zelltrümmern und Aggregaten bei 3800 x g und 4°C für 20 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert und konnte nach Zugabe von 0,04% NaN₃ für mehrere Monate bei 4°C aufbewahrt werden. Die Affinitätsreinigung der hIgG₁-Fusionsproteine erfolgte analog der Aufreinigung von mAbs aus Hybridoma-Überständen mit Protein G Sepharose (3.2.3.3).

3.2.3.3 Affinitätsreinigung von mAb aus Hybridoma-Überständen

Für die Aufreinigung von mAbs aus Hybridoma-Überständen wurden die Zellen 1:1 in Protein-freies Hybridoma-Medium gesplittet und bis zum Absterben der Zellen bei 10% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Der Zellkulturüberstand wurde bei 3800 x g und 4°C für 15 Min zentrifugiert, anschließend durch einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert und zur Lagerung mit 0,04% NaN₃ versetzt.

Vorbereitung der Protein G Sepharose 4 Fast Flow:

Die Bindungskapazität von Protein G Sepharose beträgt 7 mg Ratten IgG pro 1 ml beads. Die benötigte Menge an Säulenmaterial wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit PBS aufgefüllt. Nach einer Zentrifugation bei 460 x g und 4°C für 5 Min folgten zwei weitere Waschschrte mit PBS. Danach wurden die Protein G Sepharose beads in 1 Volumen PBS resuspendiert.

Affinitätsreinigung der mAb mit Protein G Sepharose:

Eine ausreichende Menge gewaschener Protein G Sepharose wurde für 20-30 Min bei 4°C mit dem filtrierten Hybridoma-Überstand inkubiert und dabei alle 5 Min vorsichtig geschwenkt. Dann wurden Überstand und Säulenmaterial in eine Chromatographiesäule überführt. Die Protein G Sepharose mit den gebundenen Antikörpern wurde 2x mit je 10 ml PBS, 3x mit je 10 ml PBS/1M NaCl und erneut 1x mit 10 ml PBS gewaschen. Es folgte eine Vorelution mit 1/2 Säulenvolumen Elutionspuffer und die eigentliche Elution mit 3-4 ml Elutionspuffer pro 1ml Säulenvolumen. Das Eluat wurde sofort mit 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) auf einen pH-Wert von 7-8 eingestellt.

Regeneration der Protein G Sepharose Säule:

Nach der Elution wurde das Säulenmaterial 2x mit je 10 ml Elutionspuffer gewaschen und mit PBS äquilibriert. Die Protein G Sepharose wurden ungefähr 4x wiederverwendet und in PBS mit 0,04% NaN₃ bei 4°C gelagert.

Spezielle Materialien:

PBS, PBS/1M NaCl, 10% NaN₃, Protein G Sepharose, 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)

Elutionspuffer: 0,1 M Glycin (pH 2,5)

3.2.3.4 Wessel-Flügge Fällung

Die Wessel-Flügge Fällung ist eine Methode zur quantitative Präzipitation von löslichen und hydrophoben Proteinen aus verdünnter Lösung. Sie wird durch Detergentien, Lipide, Salze, Puffersubstanzen und β-Mercaptoethanol nicht beeinflusst und wurde für die Abschätzung der IgG und IgM Konzentrationen in Hybridoma Überständen verwendet (Wessel & Flugge, 1984).

Es wurden 150 µl Hybridoma-Überstand mit 600 µl Methanol und 150 µl Chloroform vermischt und nach Zugabe von 450 µl H₂O_{MilliQ} für 30 Sek kräftig geschüttelt. Nach einer Zentrifugation bei 20000 x g für 2 Min bei RT wurde vorsichtig die obere Phase abgenommen und verworfen. Es folgte die Zugabe von 450 µl Methanol, 10 Sek kräftiges Schütteln und eine erneute Zentrifugation bei 20000 x g für 2 Min bei RT. Die obere Phase wurde verworfen und das Präzipitat unter dem Abzug für ungefähr 15 Min getrocknet. Die Proteine wurden durch Zugabe von 20 µl 1x SDS-PAGE Probenpuffer (3.2.3.12) und Inkubation für 30 Min bei 50°C in Lösung gebracht und anschließend für 5 Min bei 95°C denaturiert, bevor sie mit der SDS-PAGE Gelelektrophorese aufgetrennt wurden.

Spezielle Materialien:

Chloroform, Methanol, 1x SDS-PAGE Probenpuffer

3.2.3.5 Dialyse

Es wurden Slide-A-Lyzer[®] Dialyserahmen mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Nach der Affinitätsreinigung eines Fusionsproteins (3.2.3.1, 3.2.3.2), von monoklonalen (3.2.3.3) oder polyklonalen Antikörpern (3.2.3.8) wurde die verdünnte Proteinlösung 4x für mindestens 4 h gegen jeweils 5 l PBS dialysiert. Das beim Calcium-switch Experiment (3.2.4.5) eingesetzte FCS wurde zunächst bei 56°C für 45 Min hitzeinaktiviert. Die Dialyse erfolgte hier gegen ein mindestens 100-faches Volumen Puffer für jeweils 12-24 h. Im zweiten von vier Dialyseschritten wurde dem Dialyse-Puffer zur Komplexbildung zweiwertiger Kationen 0,2 mM EDTA zugesetzt. Anschließend wurde das FCS sterilfiltriert und in Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

Spezielle Materialien:

Slide-A-Lyzer[®] Dialysis Cassette, PBS

Dialyse-Puffer: 0,15 M NaCl
 5 mM Hepes (pH 7,5)

3.2.3.6 Konzentrierung von Proteinlösungen

Nach der Dialyse wurden die verdünnten Proteinlösungen mit Hilfe der Centricon YM-10 basierend auf den Anweisungen des Herstellers eingeeengt.

3.2.3.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

UV-Spektroskopische Konzentrationsbestimmung:

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde durch Bestimmung der Absorption bei 280 nm abgeschätzt, weil bei dieser Wellenlänge Proteine ihr Absorptionsmaximum haben. Dabei wurde folgende Formel verwendet:

$$c \text{ [mg/ml]} = OD_{280} * 1,4 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

BCA-Test:

Beim BCA-Test wird die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Proteine in alkalischem Medium (Biuret-Reaktion) mit der Chelatisierung von Cu^+ durch zwei Moleküle BCA kombiniert. Der wasserlösliche Komplex besitzt eine starke Absorption bei 562 nm, die linear mit steigender Proteinkonzentration im Bereich zwischen 20 und 2000 $\mu\text{g/ml}$ Protein verläuft. Die unbekannte Konzentration einer Proteinlösung wurde durch Vergleich mit einem Albumin-Standard nach Standardprotokoll des Herstellers bestimmt.

Spezielle Materialien:

BCA Protein Assay Kit

3.2.3.8 Polyklonale Kaninchen Antikörper

Immunisierung der Kaninchen

Sieben Tage vor der Immunisierung von New Zealand White Kaninchen wurde 20 ml Präserum aus einer Ohrvene abgenommen, um später eine Aussage über die Spezifität der polyklonalen Antikörper treffen zu können. Bei der ersten Immunisierung wurde 0,6-1 mg des affinitätsgereinigten und dialysierten Fusionsproteins mit dem gleichen Volumen vollständigem Freund Adjuvans gemischt und intradermal und subkutan im Nackenbereich injiziert. Nach 28 Tagen erfolgte die 1. Nachimmunisierung mit 0,6-1 mg Fusionsprotein in unvollständigem Freund Adjuvans. Am 36. und 40. Tag wurde jeweils 40 ml Blut aus einer Ohrvene abgenommen. Nach 56 Tagen erfolgte die 2. Nachimmunisierung wie oben beschrieben. Am 64. und 68. Tag wurde erneut eine Blutabnahme durchgeführt. Weitere Immunisierungen und Blutungen geschahen nach Bedarf. Das Kaninchen wurde innerhalb von 3 Monaten nach der letzten Nachimmunisierung final geblutet.

Spezielle Materialien:

unvollständiges Freund Adjuvans, vollständiges Freund Adjuvans

Kaninchen-Serum

Das Kaninchen-Blut wurde zur vollständigen Blutgerinnung für 1 h bei 37°C oder mehrere Stunden bei RT inkubiert und dann über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Anschließend wurde es zweimal bei 2500 x g und 4°C für 20 Min zentrifugiert, um den Blutkuchen abzutrennen. Das Serum wurde in Aliquots mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

Kopplung eines Proteins an CNBr-Sepharose

Alle Proteinlösungen wurden vor der Kopplung an CNBr-Sepharose 3x gegen PBS und 1x gegen Kopplungspuffer dialysiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration auf ungefähr 5 mg/ml Kopplungspuffer eingestellt.

Die benötigte Menge CNBr-Sepharose wurde auf einem 250 ml Sterilfilter mit 1 l 1 mM HCl für ungefähr 15 Minuten gewaschen, in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 460 x g für 5 Min bei RT pelletiert. Die CNBr-Sepharose wurden in Kopplungspuffer resuspendiert, durch die pH-Wert Änderung aktiviert und für nur 2 Min zentrifugiert. Daraufhin wurde die gegen Kopplungspuffer dialysierte Proteinlösung zügig hinzugefügt und der pH-Wert gegebenenfalls mit Kopplungspuffer auf $\text{pH} \geq 8$ eingestellt. Die Kopplung erfolgte für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler. Die verbleibenden aktiven Gruppen wurden durch eine sich anschließende Inkubation bei RT oder 4°C über Nacht hydrolysiert und danach mit Blockierungspuffer gewaschen. Nach einer weiteren Inkubation für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C wurde das Säulenmaterial 3x mit PBS äquilibriert. Die mit Protein-gekoppelte CNBr-Sepharose wurde abwechselnd

dreimal mit je 10 ml Elutionspuffer und Blockierungspuffer zur Entfernung von ungebundenem Protein gewaschen.

Spezielle Materialien:

CNBr-Sephrose, 1mM HCl (pH 2-3), 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)

Kopplungspuffer: 0,1M NaHCO₃ (pH 8,4)
0,5M NaCl

Blockierungspuffer: Kopplungspuffer
75 mM Tris-HCl (pH 8,8)

Elutionspuffer: 0,1M Glycin (pH 2,5)

Caprylsäure-Fällung von Kaninchen-Serum

Unter leicht sauren Bedingungen führt die Zugabe von kurzkettigen Fettsäuren wie der Caprylsäure (Oktansäure) zur Präzipitation der meisten Serumproteine mit Ausnahme der IgG Moleküle. In Kombination mit anderen Aufreinigungsschritten führt diese Methode zu einer relativ reinen Antikörperpräparation (Russ, 1983; Steinbuch & Audran, 1969).

Die benötigte Menge Kaninchen-Serum wurde bei RT aufgetaut und mit 2 Volumen 30 mM Natriumacetat (pH 4,0) versetzt. Der pH-Wert der Lösung wurde überprüft und falls erforderlich auf pH 4,8 eingestellt. Unter ständigem Rühren wurde langsam und tropfenweise 0,75 ml Oktansäure pro 10 ml Originalvolumen Kaninchen-Serum zugegeben. Die Lösung wurde für weitere 30 Min bei RT gerührt und bei 48000 x g und 4°C für 10 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, der pH-Wert mit 1M Tris (pH ~ 9) neutralisiert und die Lösung sterilfiltriert.

Spezielle Materialien:

Caprylsäure, 30 mM Natriumacetat (pH 4,0), 1M Tris (pH ~ 9)

Affinitätsreinigung von polyklonalen Kaninchen Antikörpern

Affinitätsreinigung: Fusionsprotein gekoppelt an CNBr-Sephrose:

Für die Affinitätsaufreinigung der polyklonalen Kaninchen Antikörper wurde CNBr-Sephrose verwendet, an die das MBP-Fusionsprotein oder das zum Immunisieren verwendete hIgG₁-Fusionsprotein gekoppelt wurde. Der Überstand nach der Caprylsäure-Fällung wurde 3x über die Säule gegeben. Zur Entfernung von ungebundenem Protein wurde das Säulenmaterial 3x mit 10 ml PBS, 3x mit 10 ml PBS/1M NaCl und 1x mit 10 ml PBS gewaschen. Die Elution der spezifischen Antikörper erfolgte durch Zugabe von 5x 1ml Elutionspuffer. Der pH-Wert des Eluats wurde sofort mit 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) auf pH 7-8 eingestellt. Zur Regeneration des Säulenmaterials wurde 3x 3 ml Elutionspuffer, 10 ml PBS/1M NaCl und 10 ml PBS über die Säule gegeben. Die Aufbewahrung erfolgte in PBS/0,04% NaN₃ bei 4°C.

Postadsorption: Bovines und humanes IgG gekoppelt an CNBr-Sepharose:

Falls ein spezifisches hIgG₁-Fusionsprotein zum Immunisieren verwendet worden war, enthielt das Eluat nach der Affinitätsreinigung noch Antikörper, die gegen den hIgG₁-Fusionspartner gerichtet waren. Deshalb wurden jeweils humanes und bovines IgG kovalent an CNBr-Sepharose gekoppelt und das Eluat der Antigen-spezifischen Säule wurde 3x über jede Postabsorptionssäule gegeben, wobei der Durchlauf aufgefangen wurde. Dann wurde 1/2 Säulenvolumen PBS zugegeben, um keine spezifischen Antikörper im Ausschlussvolumen des Säulenmaterials zu verlieren. Für jede Postabsorptionssäule wurde dieser Vorgang 2-4x wiederholt, bis bei der Regeneration des Säulenmaterials keine Antikörper mehr eluiert wurden. Dazu wurde 10 ml PBS, 10 ml PBS/1M NaCl, 3x 3 ml Elutionspuffer und 10 ml PBS über die Säule gegeben. Die CNBr-Sepharose mit kovalent gebundenen Fusionsproteinen wurde in PBS/0,04% NaN₃ bei 4°C gelagert.

Spezielle Materialien:

10% NaN₃, PBS, PBS/1M NaCl, 1,5M Tris-HCl (pH 8,8)

Elutionspuffer: 0,1 M Glycin (pH 2,5)

Affinitätsreinigung von Kaninchen IgG aus Präserum

Vorbereitung der Protein A Sepharose CL-4B:

Die gefriergetrocknete Protein A Sepharose CL-4B wurde für 30 Min in 50 ml eiskaltem vorgekühltem PBS quellen gelassen und nachfolgend bei 460 x g und 4°C für 5 Min sedimentiert. Die Protein A Sepharose wurde 3x mit je 50 ml PBS gewaschen, eine 1:1 Suspension mit PBS hergestellt und in eine 10 ml Chromatographiesäule überführt.

Affinitätsreinigung von Kaninchen IgG

Es wurden 2 ml Präserum mit dem gleichen Volumen PBS verdünnt, 5x über die vorbereitete Protein A Sepharose Säule gegeben und 3x mit je 10 ml PBS, 3x mit je 10 ml PBS/1M NaCl und 1x mit 10 ml PBS gewaschen. Es folgte eine Vorelution mit 1/2 Volumen des Säulenmaterials und die eigentliche Elution mit 5x 1ml Elutionspuffer. Das Eluat wurde mit 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) auf pH 7-8 eingestellt, gegen PBS dialysiert (3.2.3.5) und mit einer Centricon YM-10 eingengt (3.2.3.6).

Spezielle Materialien:

PBS, PBS/1M NaCl, Protein A Sepharose CL-4B, 1,5M Tris-HCl (pH 8,8)

Elutionspuffer: 0,1 M Glycin (pH 2,5)

3.2.3.9 Zelllysate

Triton-Lysate

Nach dem Ernten der Zellen (3.2.3.10) wurde das Zellpellet mit dem gleichen Volumen Lysepuffer I versetzt, sorgfältig resuspendiert und für 1 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler lysiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 1840 x g für 10 Min bei 4°C und eine Ultrazentrifugation bei 136.000 x g und 4°C für 10 Min. Vom Überstand wurde ein Aliquot abgenommen, um es 1:5 verdünnt für einen BCA-Test (3.2.3.7) einzusetzen. Das restliche Lysat wurde mit 3x SDS-PAGE Probenpuffer versetzt, für 5 Min bei 95°C denaturiert und bei -20°C aufbewahrt. Falls es nicht notwendig war, die Proteinkonzentration des Lysats zu bestimmen, wurde Lysepuffer II verwendet, dessen Inhibitoren den BCA-Test stören.

Spezielle Materialien:

Lysepuffer I:	PBS 1 mM EDTA 2% (w/v) Triton X-100
Lysepuffer II:	20 mM Imidazol-HCl (pH 6,7) 100 mM NaCl 5 mM EDTA 1 mM DTT 2% (w/v) Triton X-100 10 µg/ml Aprotinin 10 µg/ml Leupeptin 1 µg/ml Pepstatin 1 mM PMSF

Urea-Totallysate

Der Zellmonolayer wurde 3x mit TBS gewaschen und die Zellen durch Zugabe von 150 µl heißem Extraktionspuffer pro 10 cm² und kreisende Bewegungen mit einer Pipettenspitze direkt auf der Zellkulturschale lysiert. Das Zelllysate wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, bei 100°C für 5 Min denaturiert und 10 µl für einen BCA-Test abgenommen. Aliquots wurden bei -20°C aufbewahrt und vor Verwendung in der SDS-PAGE (3.2.3.12) mit 3x SDS-PAGE Probenpuffer versetzt.

Spezielle Materialien:

TBS	
Extraktionspuffer:	8 M Harnstoff
(frisch angesetzt)	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2% SDS

3.2.3.10 Ernten von adhärent wachsenden Zellen

Zum Ernten von adhärent wachsenden Zellen wurde der konfluente Zellmonolayer zunächst zweimal mit PBS gewaschen und 3 ml Erntepuffer pro 150 mm Zellkulturschale zugegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Schale abgelöst, in ein vorgekühles 14 ml Reaktionsgefäß aus Polypropylen überführt und bei 294 x g und 4°C für 5 Min sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Zellpellet entweder sofort für Immunpräzipitationen oder die Herstellung von Zelllysaten verwendet oder nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Spezielle Materialien:

Erntepuffer: PBS
 20 µg/ml Aprotinin
 20 µg/ml Leupeptin
 2 µg/ml Pepstatin
 2 mM PMSF
 2mM DTT

3.2.3.11 Immunpräzipitation

Herstellung von Zelllysaten für die Immunpräzipitation:

Alle verwendeten Lösungen waren vorgekühlt, und die Durchführung erfolgte bei 4°C. Die bei -80°C aufbewahrten Zellpellets (3.2.3.10) wurden am Vortag zu -20°C überführt, auf Eis aufgetaut und in 1 ml Lysepuffer pro 150 mm Zellkulturschale resuspendiert. Nach einer Inkubation von 1-2 h auf dem Überkopfschüttler wurde die Detergenz-unlösliche Cytoskelett- und Kernfraktion durch Zentrifugation bei 48000 x g für 30 Min pelletiert. Das Zelllysate wurde anschließend zur Abtrennung von DNA bei 126000 x g für mindestens 1 h zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und auf die verschiedenen Proben verteilt.

Vorbereitung der Protein G Sepharose 4 Fast Flow:

Die benötigte Menge Protein G Sepharose 4 Fast Flow wurde 3x mit jeweils 50 ml PBS gewaschen, in Waschpuffer aufgeschlämmt und für 30 Min bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verringern. Nach einer Zentrifugation bei 460 x g für 5 Min wurde die Protein G Sepharose im gleichen Volumen Waschpuffer resuspendiert.

Immunpräzipitation:

Pro Immunpräzipitation wurden Zellen von 2-4 150 mm Zellkulturschalen und 5-10 µg mAb pro 150 mm Schale eingesetzt. In einem 15 ml Reaktionsgefäß wurde die vorbereitete Protein G Sepharose zusammen mit den Antikörpern und dem Zelllysate für 1 h bis über Nacht bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde bei 460 x g

zentrifugiert und 5x mit Waschpuffer gewaschen. Zur Elution der gebundenen Proteine wurde 1x SDS-PAGE Probenpuffer zugegeben und für 5 Min bei 95°C aufgeköcht. Die Proben wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel (3.2.3.12) elektrophoretisch aufgetrennt und konnten bei -20°C gelagert werden.

Spezielle Materialien:

Protein G Sepharose 4 Fast Flow:

Waschpuffer: 20 mM Imidazol-HCl (pH 6,7)
100 mM NaCl
5 mM EDTA
1 mM DTT
0,5% (w/v) Triton X-100

Lysepuffer: Waschpuffer
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin
1 µg/ml Pepstatin
1 mM PMSF

3.2.3.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Dabei wurden 8-12%ige Flachbett Mini-Gele mit 1,5 mm Spacer (Mini-Protean II, Biorad, München) verwendet. Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen ist in der folgenden Tabelle angegeben:

Stammlösung	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid/N,N'-Methylen-bis-acrylamid (30%/8% (w/v))	4% (w/v)	8-12% (w/v)
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	125 mM	
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)		375 mM
10% (w/v) APS	0,05% (w/v)	0,05% (w/v)
TEMED	0,05% (v/v)	0,1% (v/v)

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proteinproben mit 1-3x SDS-PAGE Probenpuffer versetzt und für 5 Min bei 95°C denaturiert. Der Lauf wurde bei 80V durchgeführt, bis die Lauffront das Trenngel erreicht hatte, danach bei 160V.

Spezielle Materialien:

Broad, high and low range marker, prestained marker

1x SDS-PAGE Probenpuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 6,8)
2% (w/v) SDS
10% (v/v) Glycerin

	50 mM DTT
	0,01% (w/v) Bromphenolblau
Gelelektrophorese-Puffer:	30 g Tris
	144 g Glycin
	10 g SDS
	ad 1 l mit H ₂ O _{MilliQ}

3.2.3.13 Coomassie Brilliant Blue R250 Färbung

Das Polyacrylamidgel mit den gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen wurde für 30 Min in Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde es unter mehrmaligem Wechsel des Entfärbers bis zur gewünschten Farbtintensität entfärbt. Vor dem Trocknen des Gels wurde es für mindestens 1 h in 2% Glycerin aufbewahrt.

Spezielle Materialien:

2% Glycerin

Färbelösung:	0,25% (w/v) Coomassie Brillant Blue R250
	45% (v/v) Methanol
	10% (v/v) Essigsäure
	45% (v/v) H ₂ O _{MilliQ}
Entfärber:	40 % (v/v) Ethanol
	10 % (v/v) Essigsäure
	50 % (v/v) H ₂ O _{MilliQ}

3.2.3.14 Silberfärbung

Das Polyacrylamidgel wurde für 30 Min bis über Nacht in Fixierlösung inkubiert und dreimal für mindestens 30 Min bis über Nacht mit 50% Ethanol gewaschen. Zur Sensibilisierung wurde das Gel für genau 1 Min mit der Thiosulfat-Gebrauchslösung inkubiert und nachfolgend dreimal für jeweils exakt 20 Sek mit dH₂O gewaschen. Für die Imprägnierung wurde das Proteingel 20 Min mit der Silberlösung inkubiert. Nach zwei Waschstritten mit dH₂O für je genau 20 Sek wurde das Gel bis zur gewünschten Farbtiefe mit Entwickler inkubiert, was von der aufgetragenen Proteinmenge abhing und bis zu 10 Minuten dauern konnte. Anschließend wurde das Gel erneut zweimal für je 2 Min mit dH₂O gewaschen und für 10 Min mit Fixierer inkubiert. Um das Gel anschließend gut trocknen zu können, wurde es für 1 h in 2% Glycerinlösung gelegt.

Spezielle Materialien:

2% Glycerin, 50% Ethanol

Fixierlösung:	50% Methanol
	10% Essigsäure
	40% H ₂ O _{MilliQ}
Thiosulfat-Stammlösung: (frisch angesetzt)	344 mM Na ₂ SO ₃
Thiosulfat-Gebrauchslösung:	75 µl Thiosulfat-Stammlösung

(frisch verdünnt)	ad 50 ml H ₂ O _{MilliQ}
Silberlösung:	0,1 g AgNO ₃ ad 50 ml H ₂ O _{MilliQ}
Entwickler:	3 g Na ₂ CO ₃ 25 µl Formaldehyd 2,5 µl Thiosulfat-Stammlösung ad 50 ml H ₂ O _{MilliQ}

3.2.3.15 Immunoblotting

Der Transfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte mit einer Tankblot Apparatur bei 30 mA über Nacht oder bei 250 mA für 2 h mit vorgekühltem Blotpuffer bei 4°C. Zur Überprüfung des Transfers wurden die Proteine durch Inkubation für 3 Min mit Ponceau S Lösung auf der Nitrocellulosemembran angefärbt und anschließend wieder in dH₂O entfärbt. Es folgte eine Inkubation mit TBST für 15 Min bis 24 h. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für mindestens 1 h bei RT in TBST/10% Milchpulver inkubiert. Mit 1-2 µg/ml affinitätsgeinigtem Antikörper oder 1:500 – 1:2000 verdünntem Serum in TBST/10% MP wurde für 1-2 h inkubiert und die Membran im Anschluss 2-3x kurz mit TBST gespült und dann für 2x 5 Min und 1x 20 Min mit TBST unter Schwenken gewaschen. Der PO-gekoppelte Sekundärantikörper wurde 1:10000 in TBST/10% MP verdünnt eingesetzt und die Membran damit für 30-60 Min inkubiert. Anschließend wurde diese auf die gleiche Weise erneut mit TBST gewaschen. Die Membran wurde für 2 Min mit ECL-Reagenz inkubiert und möglichst gut abgetropft mit Folie bedeckt. Zur Detektion des Bandenmusters wurde ein ECL Hyperfilm verwendet.

Spezielle Materialien:

ECL Hyperfilm, Nitrocellulosemembran, Ponceau S Lösung

Blotpuffer:	14,4 g Glycin 3 g Trizma Base 400 ml Methanol ad 2 l H ₂ O _{MilliQ}
TBS:	40 g NaCl 15g Tris (pH 7,4) 1 g KCl ad 5 l H ₂ O _{MilliQ}
TBST:	TBS 0,1% (v/v) Tween 20
TBST/10% MP	TBST 10% (w/v) Milchpulver
ECL-Reagenz: (frisch angesetzt)	5ml Luminol/Enhancer 5ml Peroxidase solution

3.2.3.16 Immunfluoreszenz

Adhärenz wachsende Zellen wurden in der gewünschten Zelldichte auf Transwell Filtern oder Lab-Tek Chamber Slides ausgesät und bis zur erforderlichen Konfluenz kultiviert. Dann wurden sie je nach Verwendungszweck mit 4% PFA oder Methanol fixiert (3.2.2.3). Zur Detektion intrazellulärer Proteine wurden die mit 4% PFA-fixierten Zellen durch Inkubation mit 0,1% Triton X-100 in PBS^{mc} für 5 Min bei RT permeabilisiert und anschließend 3x mit PBS^{mc} gewaschen. Der Primärantikörper wurde in einer Konzentration von 5-10 µg/ml in PBS^{mc} /2% BSA verwendet. Nach einer Inkubation für 1 h bei RT wurde der Monolayer 3x mit PBS^{mc} gewaschen. Der 1:200 - 1:1000 in PBS^{mc}/2% BSA verdünnte Sekundärantikörper wurde für 1 h bei RT zugegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS^{mc} wurde die restliche Flüssigkeit vorsichtig entfernt und das Präparat mit DAKO Fluorescent Mounting Medium eingedeckelt. Das Objekt wurde nach Antrocknen des Einbettmediums am Fluoreszenzmikroskop oder am konfokalen Mikroskop analysiert.

Spezielle Materialien:

DAKO Fluorescent Mounting Medium, PBS^{mc}, PBS^{mc} /2% BSA, 0,1% Triton X-100 in PBS^{mc}

3.2.3.17 Filipin-Färbung

Die Transwell Filter wurden nach dem Transmigrationsassay mit 4% PFA fixiert (3.2.2.3) und entweder sofort verwendet oder in PBS/0,04% NaN₃ aufbewahrt. Pro Filter (A=0,33 cm²) wurde 50 µl Filipin-Gebrauchslösung verwendet und für 45 Min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nicht gebundenes Reagenz wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS^{mc} entfernt. Die Membran wurde vorsichtig ausgeschnitten und mit den Zellen nach oben auf einen Objektträger gelegt. Die Zellen wurden mit DAKO Fluorescent Mounting Medium eingedeckelt und die Integrität des Monolayers am Fluoreszenzmikroskop kontrolliert.

Spezielle Materialien:

DAKO Fluorescent Mounting Medium, PBS^{mc}, PBS^{mc}/2% BSA

Filipin-Stammlösung: 2,5 mg/ml Filipin in DMSO
Lagerung bei -20°C, lichtempfindlich

Filipin-Gebrauchslösung: 50 µg/ml Filipin in PBS^{mc}/2%BSA
(frisch angesetzt)

3.2.4 Funktionelle Experimente

3.2.4.1 Mixed Cell Culture Assay

Es sollte festgestellt werden, ob die Moleküle mESAM, MCAR, mJAM-A, mJAM-B und mJAM-C heterophile Interaktionen *in trans* eingehen können. Zu diesem Zweck wurden jeweils zwei stabil transfizierte CHO Zelllinien zusammen ausgesät. Um einen subkonfluenten Monolayer zu erhalten, wurden die Zellen 1:1 auf Lab-Tek Chamber Slides

gesplittet und nach 6 h mit Methanol (3.2.2.3) fixiert. Um die Expression der Zelloberflächenmoleküle in einem konfluenten Monolayer zu untersuchen, wurden die Zellen 1:5 gesplittet und erst nach 3 Tagen fixiert. Die Zellen konnten für einige Tage in PBS^{mc}/0,04% NaN₃ bei 4°C aufbewahrt werden, bevor die Lokalisation der ektopisch exprimierten Moleküle mittels Immunfluoreszenz (3.2.3.16) bestimmt wurde.

3.2.4.2 Transmigrationsassay

Transmigrationsassay mit Polymorphkernigen Leukozyten

Für die Transmigrationsassays wurden konfluente bEnd5 Zellen bis zur Passage 30 verwendet. Die Transwell Filter wurden mit Laminin beschichtet (3.2.2.2), pro Filter 4×10^4 Zellen in 200 µl Medium ausgesät und die Zellen unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 2 Tagen wurde das Medium sorgfältig von den Zellen abgesaugt und pro Filter 50 µl 10-50 µg/ml Antikörper in TMA-Medium zugegeben. Die Filter wurden für 30 Min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Einige Zellen waren vor Beginn der Antikörperinkubation für 16-20 h mit 5 nM humanem TNF-α stimuliert worden.

In der Zwischenzeit wurden die über Nacht in WEHI-3B konditioniertem Medium kultivierten PMNs (3.2.2.6) sorgfältig von der Petrischale ab gespült und bei 300 x g und RT für 10 Min pelletiert. Die Zellen wurden in TMA-Medium aufgenommen, die Lebendzellzahl bestimmt und die Zellsuspension auf $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt.

Nach der Antikörperinkubation wurden 600 µl TMA-Medium in die leeren äußeren Vertiefungen der 24-well Platte pipettiert. Die Filter wurden luftblasenfrei umgesetzt und 50 µl PMN-Zellsuspension auf den bEnd5 Monolayer pipettiert. Falls die Antikörper während der Transmigration nicht mehr vorhanden sein sollten, wurde vor Zugabe der PMNs die Antikörperverdünnung vorsichtig vom Filter abgenommen, einmal gewaschen und 50 µl frisches TMA-Medium zugegeben.

Nach einer Inkubation von 30-60 Min im Brutschrank wurde die Migrationsrate mikroskopisch abgeschätzt. Zum Beenden der Transmigration wurden die Filter aus den Vertiefungen herausgenommen und dabei leicht am Rand abgestreift, um die unter dem Filter hängende Flüssigkeit ins untere Kompartiment tropfen zu lassen.

Die Bestimmung der Zellzahl wurde am CASY1 TT cell counter durchgeführt. Dafür wurde 9,5 ml CASY ton pro CASY Messbecher vorgelegt. Das TMA-Medium mit den transmigrierten PMNs im unteren Kompartiment wurde gut resuspendiert, 500 µl Zellsuspension in den CASY Messbecher überführt und gut gemischt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer 150 µm Kapillare, durch zweifache Messung von jeweils 400 µl zwischen 6-20 µm.

Zur Kontrolle der Integrität des bEnd5 Monolayers wurde dieser mit 4% PFA fixiert (3.2.2.3) und eine Filipin-Färbung (3.2.3.17) durchgeführt.

Spezielle Materialien:

CASY ton, humanes TNF- α , Transwell Filter (6,5 mm Durchmesser, 5 μ m Porengröße)

TMA-Medium: DMEM
 10% FCS (Biowest, hitzeinaktiviert für 30 Min bei 56°C)
 25 mM Hepes (pH 7,3)
 2 mM L-Glutamin

Transmigrationsassay mit naiven T-Zellen

Der Transmigrationsassay mit naiven T-Zellen wurde bis auf wenige Modifikationen wie mit Polymorphkernigen Leukozyten durchgeführt. Die aus Lymphknoten isolierten naiven T-Zellen (3.2.2.8) wurden direkt nach der Präparation mit 10^5 Zellen pro Filter eingesetzt. Außerdem wurde als Chemoattraktant 100 ng/ml SDF-1 α ins untere Kompartiment gegeben, um eine ausreichende Migrationsrate zu erhalten. Die transendotheliale Migration wurde nach 4 h beendet und die Zellzahl am CASY1 TT cell counter in dem Cursorbereich von 5,2-20 μ m bestimmt.

Spezielle Materialien:

40 μ g/ml SDF-1 α

Transmigrationsassay mit PLP3 T-Zellen

Auch der Transmigrationsassay mit PLP3 T-Zellen stimmte nahezu mit den Experimenten mit Polymorphkernigen Leukozyten überein. Pro Filter wurden 10^5 autoreaktive T-Zellen verwendet, die Transmigration nach mikroskopischer Beurteilung für 2-4 h durchgeführt und die Zellzahl am CASY1 TT cell counter im Cursorbereich 5,2-20 μ m gemessen.

3.2.4.3 Permeabilitätsassay mit FITC-Dextran

Die Permeabilität von Zell-Zell Kontakten wurde über die Diffusion von 10 kDa oder 40 kDa FITC-Dextran durch einen konfluenten Monolayer bestimmt. Dazu wurden verschiedene Zelllinien in bestimmten Dichten (siehe Tabelle) auf Transwell Filter mit 0,4 μ m Porengröße ausgesät und für mehrere Tage unter Standardbedingungen kultiviert.

Zelllinie	Zellzahl/Filter	Beschichtung	Kultivierungsdauer
CHO dhfr ⁻	$1,5 \times 10^4$	keine	3 Tage
bEnd3/bEnd5	$4,0 \times 10^4$	keine	2 Tage
MDCK II Tet-off	$3,3 \times 10^4$	Fibronektin	3 Tage

Das Medium wurde vorsichtig von den Filtern abgenommen und 90 μ l frisches Medium auf die Filter pipettiert. Dann wurde 600 μ l Medium in die leeren äußeren Vertiefungen der 24-well Platte gefüllt und die Filter luftblasenfrei umgesetzt. Nach einer Inkubation für 1 h bei 37°C im CO₂-Brutschrank wurde 10 μ l FITC-Dextran Gebrauchslösung in das obere Kompartiment gegeben und erneut für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Filter aus

den Vertiefungen genommen und dabei leicht am Rand abgestreift. Das Medium aus dem unteren Kompartiment wurde gut resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 1:1 mit Medium verdünnt. Die Messung erfolgte am Fluorimeter bei einer Anregungswellenlänge von 492 nm, einer Emissionswellenlänge von 520 nm und einer Bandbreite von 2 nm. Alternativ dazu wurde die Fluoreszenz der Proben im Fluoreszenz-Reader bestimmt. Der Zellmonolayer wurde mit 4% PFA fixiert (3.2.2.3) und die Plasmamembran zur Kontrolle mit Filipin angefärbt (3.2.3.17).

Spezielle Materialien:

Transwell Filter (6,5 nm Durchmesser, 0,4 nm Porengröße)

40 kDa FITC-Dextran Gebrauchslösung: 10 mg/ml in Medium
(frisch angesetzt)

10 kDa FITC-Dextran Gebrauchslösung: 10 mg/ml in Medium
(frisch angesetzt)

3.2.4.4 ECIS-Messung

Funktionelle Veränderungen an den Zell-Zell-Kontakten im Verlauf der Calcium-switch (3.2.4.5) und Aussaat-Experimente (3.2.4.6) wurden mit Hilfe von ECIS-Messungen verfolgt und analysiert. Bei ECIS (*electric cell-substrate impedance sensing*) handelt es sich um ein elektrochemisches Verfahren, das auf der Messung des Wechselstromwiderstandes/Impedanz einer mit Zellen bedeckten Goldelektrode beruht (Giaever & Keese, 1993). Dafür werden Zellkulturschalen verwendet, auf die zuvor ein 100 nm dicker Goldfilm aufgedampft wurde, der nicht nur als Wachstumssubstrat, sondern auch als Elektrode dient. Es wurden kommerziell erhältliche ECIS Elektroden Arrays der Firma Applied Bio Physics verwendet (<http://www.biophysics.com>), die 8 individuelle Vertiefungen mit je $0,9 \text{ cm}^2$ Wachstumsfläche haben. Arbeitselektrode und Gegenelektrode sind koplanar angeordnet und über das Zellkulturmedium in den einzelnen wells leitend miteinander verbunden. Die Arbeitselektrode von $5 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ (8W10E) ist ungefähr hundertmal kleiner als die Gegenelektrode, wodurch der gemessene elektrische Widerstand fast ausschließlich von den Verhältnissen der kleineren Arbeitselektrode bestimmt wird (Abbildung 3).

Die Impedanz einer zellbewachsenen Elektrode erhöht sich im Vergleich zu einer leeren Elektrode, da sich die Zellen wie Isolatoren verhalten, die den zuvor ungehinderten Stromfluss von Elektrode über Elektrolyt zur Gegenelektrode verändern. Dadurch ergeben sich drei zusätzliche elektrische Widerstände, die verschiedenen Bereichen zugeordnet werden können (Abbildung 4):

- Der Spalt zwischen der Oberfläche der Goldelektrode und der Unterseite des Zellmonolayers ist häufig schmaler als $0,1 \text{ }\mu\text{m}$ und wird in der Nomenklatur der ECIS-Technik durch den Parameter α repräsentiert. Veränderungen des Zell-Substrat-Kontakts, welche eine Änderung des Abstandes hervorrufen, spiegeln sich in α wider.

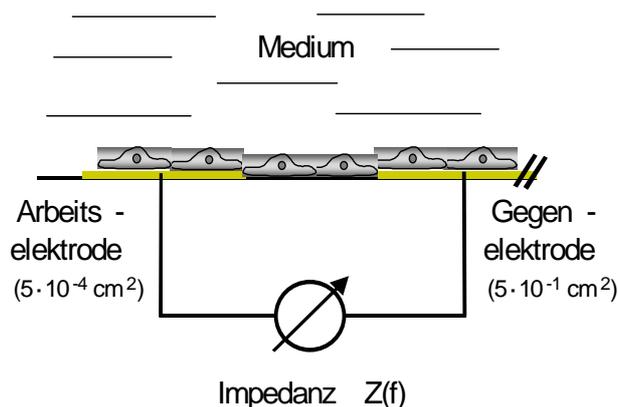


Abb. 3: Schematische Zeichnung zum Messprinzip der ECIS-Technik. Adhärent wachsende Zellen werden auf einer dünnen Goldfilmelektrode kultiviert. Aus der Messung des Wechselstromwiderstandes dieser Zellen werden Informationen über die dreidimensionale Form der Zellen abgeleitet.

- Der Zellkontaktbereich zwischen zwei benachbarten Zellen mit häufig weniger als $0,1 \mu\text{m}$ Breite wird durch den Parameter R_b dargestellt. R_b repräsentiert den Widerstand des Interzellularspaltes inklusive der Abdichtung durch die Tight Junctions, wobei diese den Parameter dominieren.
- Die Zellmembran verhält sich wie ein Plattenkondensator. Deshalb kann bei hohen Frequenzen der angelegten Wechselspannung ein Teil des Stromes kapazitiv durch die Zelle fließen. Die dafür representative Kapazität der Zellmembran C_m lässt Rückschlüsse auf die Größe der Zelloberfläche (Mikrovilli) zu.

Die Beiträge der transzellulären und parazellulären Impedanz zum gesamten Wechselstromwiderstand können durch Messung bei verschiedenen Frequenzen voneinander getrennt werden.

Die zur ECIS-Messung eingesetzten Wechselspannungen von 10 mV Amplitude (rms) sind gering im Vergleich zu den natürlich auftretenden Membranpotentialen, wodurch die Methode als nicht-invasiv einzuordnen ist. Das ECIS Elektroden Array mit den zu untersuchenden Zellen blieb während der gesamten Messung im Brutschrank. Bei 16 parallel untersuchten Proben wurde automatisiert, computerkontrolliert und bei dem unten beschriebenen Messvorgang mit einer zeitlichen Auflösung von 14 Minuten gemessen.

Die ECIS-Messung wurde am Institut für Biochemie der Universität Münster in Zusammenarbeit mit Dr. Joachim Wegener durchgeführt. Die Impedanzdaten wurden in einem Frequenzbereich zwischen $1-10^6$ Hz unter Verwendung des Impedanzspektrometers SI-1260 der Firma Solatron (Farnborough, GB) aufgenommen. Ein Computer-gesteuertes Relais wurde zur individuellen Ansteuerung der einzelnen Arbeitselektroden mit zugehöriger Gegenelektrode verwendet. Das Impedanzspektrometer und das Relais wurden über eine Software kontrolliert, die auf Basis der Software-Plattform LabView 6 (National Instruments) im Institut für Biochemie der Universität Münster programmiert wurde. Wäh-

rend des Experiments blieb der ECIS Elektroden Array im Brutschrank. Auf die Anpassung eines mathematischen Modells an die Impedanz-Rohdaten zur Berechnung der Parameter R_b , α und C_m soll hier nicht näher eingegangen werden (Giaever & Keese, 1991; Wegener et al., 2000). Bei den Aussaat-Experimenten konnten die Messwerte nicht gefittet werden, weil die Anpassung des Modells an die Messdaten nur für zellbedeckte Elektrode erlaubt sind. Deshalb wurde in diesem Fall der gemessene Widerstand R bei 400 Hz als Maß für den Aufbau des Zell-Zell Kontakts im Verlauf der Zeit angegeben.

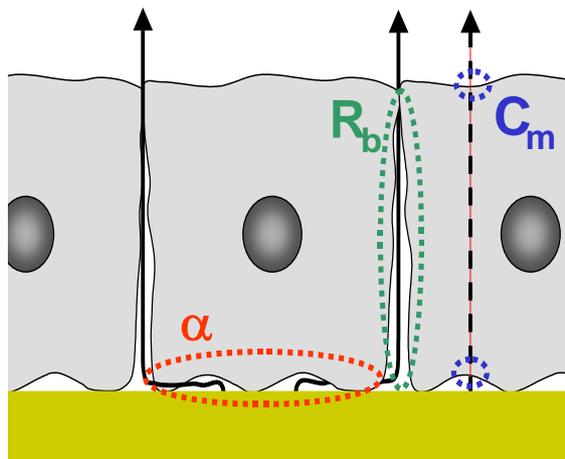


Abb. 4: Schematische Darstellung des Stromflusses auf einer zellbedeckten Arbeitselektrode. Bei hoher Frequenz verhält sich die Zellmembran wie ein Plattenkondensator und der Strom fließt kapazitiv durch die Zelle. Die Kapazität C_m der Plasmamembran lässt sich aus der Analyse dieses Strombeitrags ableiten. Bei mittleren und niedrigen Frequenzen tragen hauptsächlich Zell-Substrat Kontakte, repräsentiert durch den Modellparameter α , sowie Zell-Zell Kontakte, repräsentiert durch den Parameter R_b , zur erhöhten Impedanz einer zellbedeckten Goldelektrode bei.

3.2.4.5 Calcium-switch Experiment

Calcium-switch Experiment mit MDCK II Tet-off Transfektanten:

Es wurden 10^5 Zellen/cm² auf Fibronectin beschichteten ECIS Elektroden Arrays ausgesät und für 3 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Dann wurde das Medium abgenommen, der Monolayer 2x mit PBS/5 mM EDTA gewaschen und 400 μ l LC-Medium (MDCK II Tet-off) pro Vertiefung hinzugegeben. Nach einer Inkubation für 20 h wurden je 200 μ l abgenommen und 200 μ l Ca-Medium (MDCK II Tet-off) hinzupipettiert, um eine Endkonzentration von 1,8 mM CaCl₂ zu erreichen. Die ECIS-Messung (3.2.4.4) erfolgte über einen Zeitraum von 24 h.

Calcium-switch Experiment mit CMT Zellen:

Die ECIS Elektroden Arrays wurden mit Fibronectin beschichtet, $1,7 \times 10^5$ CMT Zellen/cm² ausgesät und unter Standardbedingungen für 3 Tage kultiviert. Am dritten Tag wurde das Medium von den Zellen abgenommen, 2x vorsichtig mit PBS/5 mM EDTA gewaschen und 400 µl LC-Medium (CMT) pro well hinzugegeben. Nach 3 h wurde das LC-Medium vollständig abgenommen und 200 µl Ca-Medium (CMT) mit 0,3-40 µg/ml polyklonalem Antikörper oder 20 µg/ml hIgG₁-Fusionsprotein hinzugegeben. Die ECIS-Messung (3.2.4.4) erfolgte für mindestens 20 h.

Spezielle Materialien:

PBS/5 mM EDTA, ECIS Elektroden Arrays (8W10E)

LC-Medium (CMT): DMEM ohne Ca²⁺
5% FCS (PAN, dialysiert, hitzeinaktiviert)
100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin
2 mM L-Glutamin
3 µM CaCl₂

Ca-Medium (CMT): LC-Medium (CMT)
1,8 mM CaCl₂

LC-Medium (MDCK II Tet-off): DMEM ohne Ca²⁺
10% FCS (Clontech, dialysiert, hitzeinaktiviert)
100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin
2 mM L-Glutamin
150 µg/ml Hygromycin B
100 µg/ml G418
1 µg/ml Puromycin
5 µM CaCl₂
+/- 50 ng/ml Doxycyclin

Ca-Medium (MDCK II Tet-off): LC-Medium (MDCK II Tet-off)
3,6 mM CaCl₂

3.2.4.6 Aussaat-Experiment

Bei diesem Experiment wurden die Zellen in so hoher Zelldichte auf die 8W10E Arrays ausgesät, dass die Zellen nach dem Spreiten auf der Elektrodenoberfläche ohne vorherige Zellteilung einen konfluenten Monolayer ausbilden konnten.

Zelllinie	Zellen/cm ²	Beschichtung	Bemerkung
CHO dhfr ⁻	8×10^5	keine	8W1E Array
MDCK C7	5×10^5	Fibronectin	2% CO ₂
MDCK II Tet-off	5×10^5	Fibronectin	2% CO ₂

Die Änderung der Impedanz (3.2.4.4) durch das Spreiten der Zellen auf der Goldelektrode und die Ausbildung der Zell-Zell Kontakte wurde über einen Zeitraum von 24 h gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung und Charakterisierung von ESAM

4.1.1 Vorarbeiten

Auf der Suche nach bisher unbekanntem Membranproteinen, die spezifisch im Zellkontaktbereich von Endothelzellen exprimiert werden, stellte Dr. Ulrike Samulowitz im Rahmen ihrer Doktorarbeit an diesem Institut monoklonale Antikörper (mAk) gegen TNF- α stimulierte bEnd3 Zellen her. Die Ratten mAk wurden im Zelloberflächen-ELISA mit derselben murinen Endotheliomazelllinie auf die Erkennung von Oberflächenantigenen untersucht (Morgan et al., 1999). Immunhistochemische Untersuchungen an Maus-Zunge ergaben in einigen Fällen endothelspezifische Färbungen und wurden deshalb von Dr. Stefan Butz weiter charakterisiert. Dazu wurden sie affinitätsgereinigt und in Immunpräzipitationen mit endothelialen Zelllysaten von bEnd3 Zellen eingesetzt. Als Kontrolle wurde die Epithelzelllinie CMT verwendet. Mit dem Ratten mAk V1G8 konnte ein 55 kDa Protein aus bEnd3 Lysaten präzipitiert werden. Das 1G8 Antigen wurde durch präparative Immunpräzipitation isoliert und von Dr. Bernhard Küster (Cell Zone AG, Heidelberg) massenspektrometrisch analysiert. Mit Hilfe von *matrix-assisted laser desorption ionization* (MALDI) wurde nach einem tryptischen Verdau des 1G8 Antigens eine *peptide mass map* erstellt. Ein Vergleich mit der Datenbank des European Bioinformatics Institute (Hinxton, UK) führte nicht zur Identifizierung eines bekannten Proteins. Deshalb wurde eine Peptidsequenzierung mittels Tandem-Massenspektrometrie durchgeführt und die erhaltenen Daten mit den entsprechenden NCBI Datenbanken verglichen. Wie in Abbildung 5 dargestellt, sind drei Peptid-Sequenzen des 1G8 Antigens zu dem EST gi|2260876 einer *Toxoplasma gondii library* homolog, von der bekannt ist, dass sie einige murine ESTs enthält. Das C-terminale Peptid ist hochhomolog (77% Identität) zu dem murinen Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptor (MCAR).

Während der Experimente für die vorliegende Arbeit wurde von der Arbeitsgruppe Quermous das Molekül *endothelial cell-selective adhesion molecule* (ESAM) beschrieben (Hirata et al., 2001), dessen Sequenz mit dem hier analysierten 1G8 Antigen übereinstimmt. Da wir diese Bezeichnung in unserer Publikation (Nasdala et al., 2002) übernommen haben und um unnötige Verwirrungen bezüglich des Namens zu vermeiden, wird im Folgenden die Bezeichnung ESAM anstelle von 1G8 Antigen verwendet.

```

1 TGAGTGCAAC ATGACCTTGG ACGTGATGAC AGGGTCCAAG GCTGCAGTGG TCGCTGGAGC
61 AGTTGTGGGC ACTTTTGTG GGTGGTGCT GATAGCTGGG CTGGTCCTGT TGTACCAGCG
121 CCGGAGCAAG ACCTTGGAAG AGCTGGCCAA TGATATCAAG GAAGATGCCA TTGCTCCCCG
181 GACCTTGCCT TGGACCAAAG GCTCAGACAC AATCTCCAAG AATGGGACAC TTTCTTCGGT
241 CACCTCAGCA CGAGCTCTGC GGCCACCCAA GGCTGCTCCT CCAAGACCTG GCACATTTAC
301 TCCCACACCC AGTGTCTCTA GCCAGGCCCT GTCCTCACCA AGACTGCCCA GGGTAGATGA
361 ACCCCACCT CAGGCAGTGT CCCTGACCCC AGGTGGGGTT TCTTCTTCTG CTCTGAGCCG
421 CATGGGTGCT GTGCCTGTGA TGGTGCCTGC GCAGAGTCAG GCTGGGTCTC TTGTGTGATA
481 GCCCAGGCAC TCATTAGCTA CATCTGGTAT CTGACCTTTC TGTAAGGTC TCCTTGTGGC
541 ACAGAGGACT CAATCTTTGG AGGATGCCCA CATTCTAGAA CTCCAGTCCT TTGCTCCTAC
601 CTCCTTCTAT TGTTGGAATA CTGGGGCTCA GTAAGACTAA AATCTGGGTC

1 ECNMTLDVMT GSKAAVVAGA VVGTFVGLVL IAGLVLLYQR RSKTLEELAN DIKEDAIAPR
61 TLPWTKGSDT ISKNGLSSV TSARALRPPK AAPPRPGTFT PTPSVSSQAL SSPRLPRVDE
121 PPPQAVSLTP GGVSSSALSR MGAVPVMVPA QSQAGSLV . . PRHSLATSGI .PFCKGLLVA
181 QRTQSLEDAH ILELQSFAPT SFYCWNTGAQ .D.NLG

```

Abb. 5: Nukleotidsequenz und abgeleitete Proteinsequenz des EST gi|2260876. Nukleotidsequenzen, die für die mittels MALDI-TOF sequenzierten Peptide codieren, sind rot gekennzeichnet, die putative Transmembranregion blau. Das C-terminale Peptid mit hoher Homologie zu MCAR ist unterstrichen dargestellt.

4.1.2 Die monoklonalen Ratten Antikörper V1G8 und V4C10 erkennen ein 55 kDa Protein in Lysaten der Endotheliazelllinie bEnd3

Die Ratten mAk V1G8 und V4C10 wurden aus den Hybridoma-Überständen affinitätsgereinigt und in Immunpräzipitationen mit Triton X-100 Lysaten der murinen Endotheliazelllinie bEnd3 und der Epithelzelllinie CMT eingesetzt. Die Proteine wurden mit Hilfe der SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt, und anschließend wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Dabei präzipitierten beide Antikörper ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 55 kDa aus bEnd3, aber nicht aus CMT Lysaten (Abbildung 6). Aufgrund der relativ unscharfen Bande könnte es sich um ein posttranslational modifiziertes, vermutlich glykosyliertes Protein handeln. Die Immunpräzipitation mit dem Kontrollantikörper 6D7.3 zeigte keine vergleichbare Proteinbande. Durch Immunoblotting konnte nicht nachgewiesen werden, ob es sich um dasselbe Antigen handelte, weil beide mAk unter Standardbedingungen nicht funktionierten (Daten nicht gezeigt).

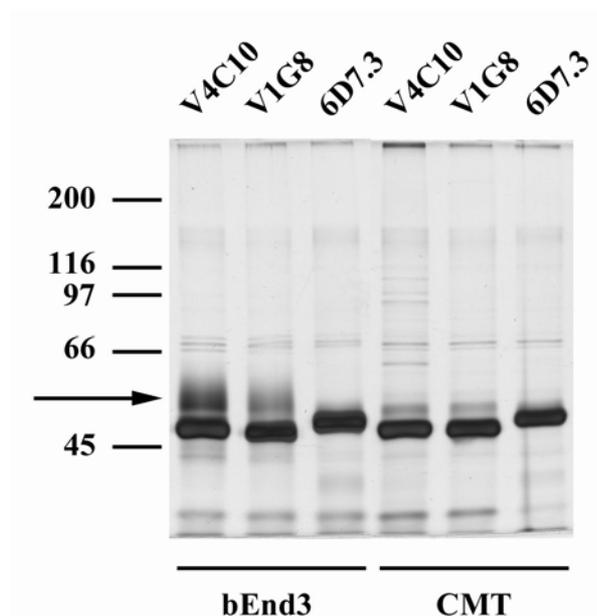


Abb. 6: Identifizierung eines endothelialen 55 kDa Proteins mit den monoklonalen Antikörpern V1G8 und V4C10. Immunpräzipitation mit den monoklonalen Antikörpern V1G8, V4C10 und der Negativkontrolle 6D7.3 aus Triton X-100 Lysaten der murinen Endotheliomazelllinie bEnd3 und der Epithelzelllinie CMT. Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Das von V1G8 und V4C10 präzipitierte 55 kDa Protein ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Position der Molekulargewichtsmarker ist auf der linken Seite in kDa angegeben.

4.1.3 Klonierung von ESAM

Um das zu diesem Zeitpunkt noch unbekanntes Protein ESAM zu klonieren, wurden mit dem EST gi|2260876 der *Toxoplasma gondii* library Sequenzvergleiche mit Hilfe des Programms BLAST durchgeführt, um mit Hilfe überlappender ESTs die vollständige Sequenz von ESAM zu erhalten. Dabei wurde von Dr. Stefan Butz das EST des IMAGE Konsortiums IMAG p998A042169 gefunden, das möglicherweise Signalpeptid und Start-Codon enthielt. Für die Klonierung des 1G8 Antigens wurde dieses EST beim Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD, Berlin) bestellt.

Aufgrund der vorliegenden Sequenzdaten wurde mit den Primern SB3 und SB19 sowie Gesamt-RNA aus bEnd3 eine RT-PCR durchgeführt. Dies führte zur Amplifikation eines 1370 bp DNA-Fragments, welches mittels TOPO TA Klonierung in den pCR[®]2.1-TOPO Vektor ligiert wurde. Die beiden Enden des rekombinanten Plasmids wurden sequenziert, wobei sich herausstellte, dass das aus bEnd3 klonierte DNA-Fragment ein putatives Start- und Stopp-Codon enthielt und die Sequenz mit der des ESTs übereinstimmte. Somit konnte gezeigt werden, dass das EST die vollständige codierende Sequenz von murinem ESAM

enthält. Das EST IMAG p998A042169 wurde daraufhin mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XbaI* verdaut und in den pCMV5 Vektor kloniert. Eine sorgfältige Sequenzierung des rekombinanten Plasmids ESAM-pcDNA3 führte zu der in Abbildung 7 dargestellten Nukleotidsequenz von ESAM.

```

1 GAATTCGGCA CGAGGCGCCG CTCACCCACA ACACCTGTAG ACACCGTGTG TCCAACCTCTC
61 CCTGAGTACT CCGGGCCAAG GAGGGCCATG ATTCTTCAGG CTGGAACCCC CGAGACCAGC
121 TTGCTGCGGG TTTTGTTCCT GGGACTGAGT ACCCTTGCTG CTTTCTCCG AGCTCAGATG
181 GAGTTGCACG TGCCCCCGGG CCTCAACAAA TTGGAAGCGG TAGAGGGAGA AGAAGTGGTG
241 CTCCCCGCCT GGTACACGAT GGCACGGGAG GAGTCGTGGT CCCACCCCG GGAGGTGCCC
301 ATCCTGATCT GGTTCCTGGA ACAAGAAGGG AAGGAACCAA ACCAGGTGTT GTCTTACATT
361 AATGGAGTCA TGACAAATAA ACCTGGAACA GCCCTGGTCC ACTCTATCTC TTCACGGAAT
421 GTGTCCCTGC GCCTGGGGGC ACTCCAGGAG GGAGACTCTG GGACTTACCG CTGTTCTGTG
481 AATGTGCAGA ATGATGAAGG CAAAAGTATA GGCCACAGCA TCAAAAGCAT AGAGCTCAAA
541 GTGCTGGTTC CTCCAGCTCC TCCATCCTGT AGTTTACAGG GTGTACCCTA TGTCCGGACC
601 AATGTGACCC TGAAGTCAA GTCCCCAAGG AGTAAACCTA CTGCTCAGTA CCAGTGGGAG
661 AGGCTGGCCC CATCCTCCCA GGTCTTCTTT GGACCAGCCT TAGATGCTGT TCGTGGATCT
721 TTAAAGCTCA CTAACCTTTC CATTGCCATG TCTGGAGTCT ATGTCTGCAA GGCTCAAAAC
781 AGAGTGGGCT TTGCCAAGTG CAACGTGACC TTGGACGTGA TGACAGGCTC CAAGGCTGCA
841 GTGGTCGCTG GAGCAGTTGT GGGCACTTTT GTTGGGTGG TGCTGATAGC TGGGCTGGTC
901 CTGTTGTACC AGCGCCGGAG CAAGACCTTG GAAGAGCTGG CCAATGATAT CAAGGAAGAT
961 GCCATTGCTC CCCGGACCTT GCCTTGACC AAAGGCTCAG ACACAATCTC CAAGAATGGG
1021 ACACTTTCTT CGGTACCTC AGCACGAGCT CTGCGGCCAC CCAAGGCTGC TCCTCCAAGA
1081 CCTGGCACAT TTACTCCAC ACCCAGTGTC TCTAGCCAGG CCCTGTCCTC ACCAAGACTG
1141 CCCAGGGTAG ATGAACCCCC ACCTCAGGCA GTGTCCCTGA CCCAGGTGG GGTCTTCTCT
1201 TCTGCTCTGA GCCGCATGGG TGCTGTGCCT GTGATGGTGC CTGCACAGAG TCAGGCTGGG
1261 TCTCTTGTGT GATAGCCAG GCACTCATTA GCTACATCTG GTATCTGACC TTTCTGTAAA
1321 GGTCTCCTTG TGGCACAGAG GACTCAATCT TGGGAGGATG CCCACATCT AGA

```

Abb. 7: Nukleotidsequenz von murinem ESAM. Nukleotidsequenz von 1373 bp des EST IMAG p998A042169, das für die Klonierung von murinem ESAM verwendet wurde. Der offene Leserahmen mit 1185 bp ist durch das unterstrichene Start- und Stopp- Codon gekennzeichnet. Die Nukleotide sind auf der linken Seite nummeriert.

Die aus dem EST IMAG p998A042169 klonierte Sequenz von murinem ESAM umfasst 1373 bp. Dem Start-Codon ATG mit der leicht modifizierten (AGG)GCCATGA Kozak-Sequenz (Kozak, 1987) folgt ein offener Leserahmen (*open reading frame*, ORF) von 1185 bp, der mit dem Stopp-Codon TGA endet. Weil sich im EST *upstream* des Start-Codons im gleichen Leserahmen ein Stopp-Codon befindet, kann davon ausgegangen wer-

den, dass es sich um die vollständige codierende Sequenz von murinem ESAM handelt. Der ORF codiert für ein Protein mit 394 Aminosäuren (Abbildung 8) mit einem abgeleiteten Molekulargewicht von 45,7 kDa. Da der mAk V1G8 ein 55 kDa Protein aus bEnd3 Lysaten präzipitiert, scheint ESAM posttranslational modifiziert zu werden. Mit Hilfe verschiedener Programme und Internetadressen wurde die Aminosäuresequenz weiter analysiert. Das Programm Signal P sagt ein Signalpeptid mit 29 Aminosäuren voraus, die putative Schnittstelle der Signalpeptidase befindet sich zwischen A₂₉ und Q₃₀. Basierend auf Hydrophobizitätsanalysen des Programms TMHMM handelt es sich um ein Typ I Transmembranprotein mit Transmembrandomäne zwischen V₂₅₂ und Y₂₇₄. Mit Net O Gyc (Hansen et al., 1997) und Net Phos wurden 8 potentielle O-Glykosylierungs- und 21 mögliche Phosphorylierungsstellen identifiziert. Die putative Extrazellulärdomäne von murinem ESAM enthält außerdem vier Konsensussequenzen (N-X-T/S) für N-Glykosylierungen (N₁₁₁, N₁₇₂, N₂₁₆ und N₂₃₉). Das Protein besitzt ein Typ I PDZ-Domänen Bindungsmotiv, da die letzten vier Aminosäuren G-S-L-V dem Typ I Konsensusmotiv S/T-X-Φ (Φ: hydrophobe Aminosäure) entsprechen (Vaccaro & Dente, 2002).

```

1  MILQAGTPET SLLRVLFLGL STLAAFSRAQ MELHVPPGLN KLEAVEGEEV VLPAWYTMAR
61  EESWSHPREV PILIWFLEQE GKEPNQVLSY INGVMTNKPG TALVHSISSR NVSLRLGALQ
121 EGDSGTYRCS VNVQNDEGKS IGHSIKSIEL KVLVPPAPPS CSLQGVPYVG TNVTLNCKSP
181 RSKPTAQYQW ERLAPSSQVF FGPALDAVRG SLKLTNLSIA MSGVYVCKAQ NRVGFAKCNV
241 TLDVMTGSKA AVVAGAVVGT FVGLVLIAGL VLLYQRRSKT LEELANDIKE DAIAPRTLTPW
301 TKGSDTISKN GTLSSVTSAR ALRPPKAAPP RPGTFTPTPS VSSQALSSPR LPRVDEPPPQ
361 AVSLTPGGVS SSALSRMGAV PVMVPAQSQA GSLV.

```

Abb. 8: Abgeleitete Aminosäuresequenz von murinem ESAM. Das von SignalP V2.0 vorausgesagte Signalpeptid und die von dem Programm TMHMM berechnete Transmembrandomäne von murinem ESAM sind unterstrichen. Das Typ I PDZ-Domänen Bindungsmotiv am C-Terminus ist fett dargestellt.

4.1.4 Proteinstruktur und Charakterisierung von ESAM

Der Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptor, der vor allem im cytoplasmatischen Bereich hohe Sequenzhomologie zu ESAM aufweist, wird der von Chretien und DuPasquier beschriebenen CTX Genfamilie (Chretien et al., 1998) zugeordnet, die eine Unterfamilie der Immunglobulin Superfamilie darstellt. Sie ist charakterisiert durch eine V-Domäne, ein J-like Segment und eine C2-Domäne.

Tabelle 4: Domänenstruktur von Mitgliedern der CTX Genfamilie, einer Unterfamilie der Immunglobulin Superfamilie (IgSF). Die Einteilung der einzelnen Domänen basiert auf Ergebnissen der Programme SignalP V2.0 und TMHMM.

Protein	Extrazelluläre Domäne	Transmembran Domäne	Cytoplasmatische Domäne	Genbank Accession No.
mESAM	Q ₃₀ - A ₂₅₁	V ₂₅₂ - Y ₂₇₄	Q ₂₇₅ -V ₃₉₄	gi 13991772
hESAM	Q ₃₀ - A ₂₄₇	V ₂₄₈ - L ₂₇₀	Y ₂₇₁ - V ₃₉₀	gi 13959017
MCAR	L ₂₀ - R ₂₃₅	A ₂₃₆ - F ₂₅₈	C ₂₅₉ - V ₃₆₅	gi 1881466
HCAR	L ₂₀ - R ₂₃₅	A ₂₃₆ - F ₂₅₈	C ₂₅₉ - V ₃₆₅	gi 20149514
mBT-IgSF	L ₂₃ - S ₂₃₉	V ₂₄₀ - S ₂₆₂	G ₂₆₃ - V ₄₂₈	gi 22266680
hBT-IgSF	S ₂₂ - G ₂₄₅	A ₂₄₆ - W ₂₆₈	R ₂₆₉ - V ₄₂₁	gi 22266678
mJAM-A	K ₂₇ - G ₂₃₈	I ₂₃₉ - Y ₂₆₁	S ₂₆₂ - V ₃₀₀	gi 3462454
hJAM-A	S ₂₈ - V ₂₃₈	I ₂₃₉ - Y ₂₆₁	S ₂₆₂ - V ₂₉₉	gi 13124448
mJAM-B	F ₂₉ - D ₂₃₃	V ₂₃₄ - L ₂₅₆	G ₂₅₇ - I ₂₉₈	gi 12055359
hJAM-B	F ₂₉ - S ₂₃₈	G ₂₃₉ - A ₂₆₁	Q ₂₆₂ - I ₂₉₈	gi 10864028
mJAM-C	V ₃₂ - G ₂₄₄	I ₂₄₅ - Y ₂₆₇	R ₂₆₈ - I ₃₁₀	gi 12963612
hJAM-C	K ₃₅ - G ₂₄₄	I ₂₄₅ - Y ₂₆₇	R ₂₆₈ - I ₃₁₀	gi 15593993
mCLMP	T ₁₈ -M ₂₃₂	V ₂₃₃ -I ₂₅₅	R ₂₅₆ -V ₃₇₃	gi 30144663
hCLMP	T ₁₉ -M ₂₃₃	V ₂₃₄ -I ₂₅₆	R ₂₅₇ -V ₃₇₃	gi 38195095
hJAML	L ₂₀ -N ₂₇₃	Q ₂₇₄ -V ₂₉₆	K ₂₉₇ -F ₃₉₄	gi 33386541
mJAM4	S ₂₃ -W ₂₃₈	A ₂₃₉ -F ₂₆₁	C ₂₆₂ -V ₃₇₀	gi 31339733

Für Sequenzanalysen von Mitgliedern der CTX Genfamilie wurden zunächst die putativen Domänen der Proteine anhand der Programme SignalP V2.0 und TMHMM identifiziert (Tabelle 4). Die Proteine sind Typ I Transmembranproteine und durch zwei Immunglobulin-Domänen, eine V- und eine C2-Domäne, mit unterschiedlicher Anzahl von Cystinbrücken gekennzeichnet. Der cytoplasmatische Teil ist innerhalb der CTX Genfamilie variabel und ein Definitionskriterium von Unterfamilien.

Tabelle 5: Sequenzvergleich zwischen humanen und murinen Proteinen der CTX Genfamilie. Das Programm Meg Align des DNASTAR Lasergene Software Pakets mit der Clustal Methode (PAM 250 residue weight table) wurde verwendet. Die Angaben sind in % Identität und die Unterteilung der Domänen basiert auf den in Tabelle 4 gezeigten Ergebnissen.

Protein	Vollständige Sequenz	Extrazelluläre Domäne	Transmembran Domäne	Cytoplasmatische Domäne
ESAM	70,3%	65,6%	82,6%	76,9%
CAR	89,6%	90,3%	78,3%	94,4%
BT-IgSF	88,1%	95,4%	47,8%	83,5%
CLMP	91,2%	96,7%	95,7%	83,9%
JAM-A	65,7%	64,9%	87,0%	74,4%
JAM-B	77,3%	76,6%	69,6%	84,2%
JAM-C	86,2%	87,1%	87,0%	84,1%

Der Sequenzvergleich zwischen humanen und murinen Proteinen zeigt große Unterschiede in der Sequenzhomologie zwischen humanen und murinen Proteinen (Tabelle 5). Murines ESAM ist zu 70,3% mit humanem ESAM identisch, während CAR mit 89,6% Identität die am höchsten konservierte Aminosäuresequenz innerhalb der untersuchten Proteine besitzt. Die Homologie für ESAM, CAR, JAM-A, JAM-B und JAM-C ist bei Betrachtung der cytoplasmatischen Domäne etwas höher, aber dies trifft nicht generell auf alle Mitglieder der CTX Genfamilie zu.

Tabelle 6: Sequenzvergleich von Proteinen der CTX Genfamilie. Für den Sequenzvergleich der murinen Proteine wurde das Programm Meg Align des DNASTAR Lasergene Software Pakets mit der Clustal Methode (PAM 250 residue weight table) verwendet. Die Unterteilung der Domänen basiert auf den in Tabelle 4 gezeigten Ergebnissen und die Angaben sind in % Identität.

Protein	Vollständige Sequenz	Extrazelluläre Domäne	Transmembran Domäne	Cytoplasmatische Domäne
ESAM – MCAR	24,9%	23,1%	43,5%	31,5%
ESAM – BT-IgSF	25,3%	26,7%	34,8%	28,9%
ESAM – CLMP	22,2%	21,4%	47,8%	21,8%
ESAM – JAM4	15,1%	14,8%	26,1%	17,3%
ESAM – JAM-A	15,3%	16,5%	30,4%	17,5%
ESAM – JAM-B	16,7%	17,1%	26,1%	16,3%
ESAM – JAM-C	17,0%	18,8%	26,1%	15,9%
JAM-A – MCAR	16,6%	16,0%	30,4%	15,0%
JAM-A – BT-IgSF	14,0%	17,9%	17,4%	15,0%
JAM-A – CLMP	16,3%	16,0%	34,8%	20,0%
JAM-A – JAM4	14,3%	13,2%	26,1%	20,0%
JAM-A – JAM-B	30,1%	33,2%	17,4%	30,0%
JAM-A – JAM-C	27,2%	27,8%	43,5%	27,5%

ESAM zeigt eine größere Sequenzhomologie zu MCAR, BT-IgSF und CLMP als zu JAM-A, JAM-B, JAM-C und JAM4 (Tabelle 6). Sowohl ESAM, MCAR als auch BT-IgSF und JAM4 haben, wie in Abbildung 9 gezeigt, einen mit 107-166 AA längeren cytoplasmatischen Teil und C-terminal ein PDZ-Domänen Bindungsmotiv Typ I, wodurch sie einer Unterfamilie innerhalb der CTX Genfamilie zugeordnet werden können. JAM-A, JAM-B und JAM-C bilden eine weitere Unterfamilie, die durch ein PDZ-Domänen Bindungsmotiv Typ II und eine mit 39-42 AA kürzere cytoplasmatische Domäne gekennzeichnet ist (Abbildung 9).

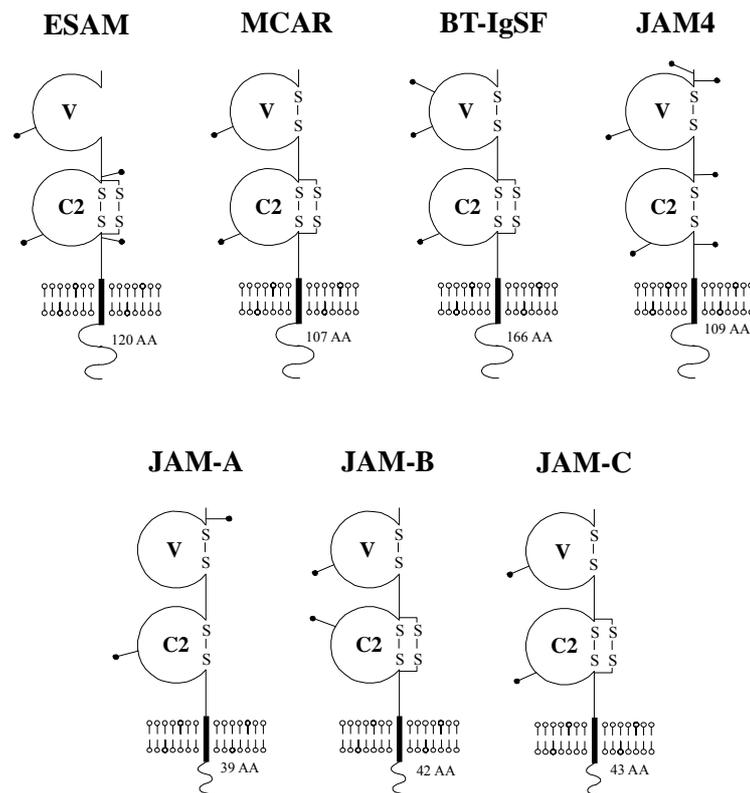


Abb. 9: Domänenstruktur von Mitgliedern der CTX Genfamilie. Die Mitglieder der CTX Genfamilie besitzen eine variable (V) und eine konstante (C2) Immunglobulin-domäne. Potentielle N-Glykosylierungsstellen (—●) und Cystinbrücken (S-S) sind gekennzeichnet. Die Anzahl der Aminosäuren des cytoplasmatischen Teils ist angegeben.

4.1.5 Klonierung von MCAR

Die cDNA von MCAR wurde mit Hilfe der Information aus der NCBI-Datenbank unter gi|1881466 kloniert. Dazu wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben der Maus isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend konnte das Gen mit den Primern SB5 und SB6 aus Herz Gesamt-RNA amplifiziert werden und in den Vektor pFLAG-CMV1 kloniert werden. Dabei wurde eine Kozak-Sequenz vor den ORF von 1098 bp eingefügt und das entstandene Konstrukt MCAR-pFLAG-CMV1 durch Sequenzierung überprüft.

4.1.6 Herstellung und Charakterisierung polyklonaler Antikörper gegen die cytoplasmatische Domäne von ESAM

Polyklonale Antikörper gegen die cytoplasmatische Domäne von ESAM wurden zu einem Zeitpunkt generiert, als durch das EST gi|2260876 der *Toxoplasma gondii* library begrenzt Sequenzinformationen vorlagen. Dazu wurden die rekombinanten Plasmide ESAM_2+4_pMAL-c2 und ESAM_2+4_pGEX-KG kloniert, die für ein Maltose-bindendes Protein (MBP) bzw. ein Glutathion-S-Transferase (GST) Fusionsprotein codie-

ren, die jeweils den cytoplasmatischen Teil von murinem ESAM mit den Aminosäuren 278-373 umfassen. Die 21 C-terminalen Aminosäuren von ESAM sind in den Konstrukten nicht enthalten, um eine Kreuzreaktivität der polyklonalen Antikörper gegen MCAR zu vermeiden. Die Fusionsproteine wurden in *E.coli BL21* exprimiert, affinitätsgereinigt und anschließend gegen PBS dialysiert. Das ESAM-GST Fusionsprotein wurde zur Immunisierung eines Kaninchens der Rasse New Zealand White verwendet. Zur Affinitätsreinigung wurde das Antiserum VE2 einer Caprylsäure-Fällung unterzogen und mit Hilfe einer CNBr-Sepharose Säule affinitätsgereinigt, an die zuvor das ESAM-MBP Fusionsprotein kovalent gekoppelt worden war.

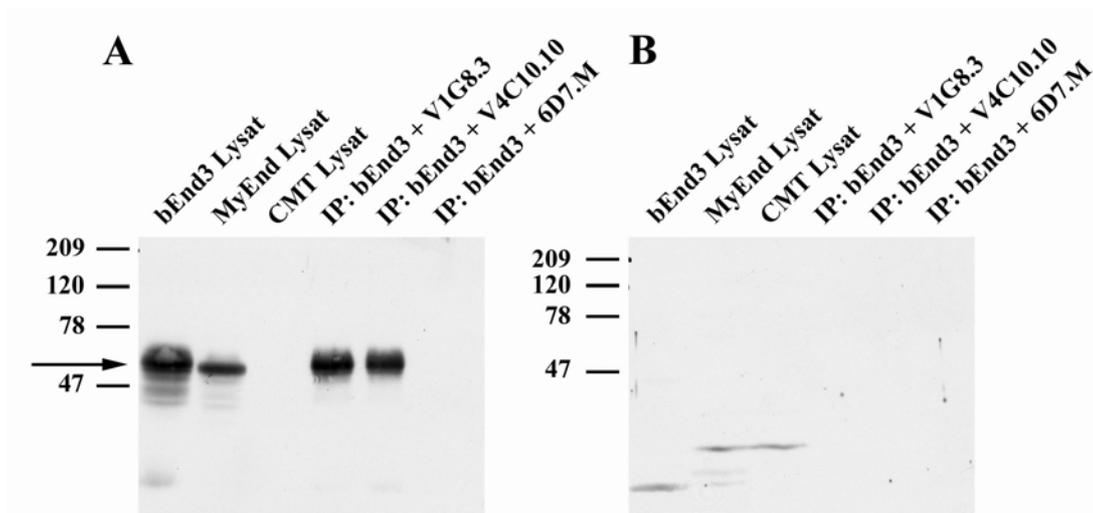


Abb. 10: Charakterisierung des gegen den cytoplasmatischen Teil von ESAM gerichteten polyklonalen Antikörpers VE2. **A:** Immunpräzipitate der monoklonalen Antikörpern V1G8.3, V4C10.10 sowie der Negativkontrolle 6D7.M aus bEnd3 Lysaten und Triton-Lysaten der Endotheliomazelllinien bEnd3 und MyEnd sowie der Epithelzelllinie CMT wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Das 55 kDa Protein ESAM (Pfeil) wurde mit Hilfe des affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörpers VE2 detektiert, der gegen das ESAM-GST Fusionsprotein hergestellt wurde. **B:** Ein identischer Immunoblot wurde mit Präserum des gleichen Kaninchens inkubiert. Die Position des Molekulargewichtsstandards ist auf der linken Seite in kDa angegeben.

Die Spezifität des polyklonalen Antikörpers VE2, der gegen die cytoplasmatische Domäne von ESAM gerichtet ist, wurde im Immunoblot getestet (Abbildung 10). Der affinitätsgereinigte pAk VE2 erkennt spezifisch das 55 kDa Protein ESAM. Bei Verwendung eines Kontrollantikörpers kann auf dieser Höhe keine entsprechende Bande detektiert werden. Der pAk VE2 erkennt dabei das von den mAk V1G8.3 und V4C10.10 präzipitierte ESAM. Zudem wurde in Triton-Lysaten der Endotheliomazelllinien bEnd3 und MyEnd, aber nicht in der epithelialen Zelllinie CMT das Protein ESAM detektiert. Somit kann man zusam-

menfassen, dass sowohl der mAk V1G8.3 als auch V4C10.10 ESAM erkennen und dass der pAk VE2 ESAM spezifisch in Lysaten von Endotheliumzellen, aber nicht Epithelzellen detektieren kann.

4.1.7 Herstellung und Charakterisierung polyklonaler Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von ESAM und MCAR

Für die Durchführung weiterer biochemischer und funktioneller Analysen wurden Fusionsproteine mit den extrazellulären Domänen von ESAM beziehungsweise MCAR und einem Fragment des humanen hIgG₁ Proteins hergestellt, das aus der Hinge, der C_{H2}- und der C_{H3}-Domäne der schweren Kette bestand.

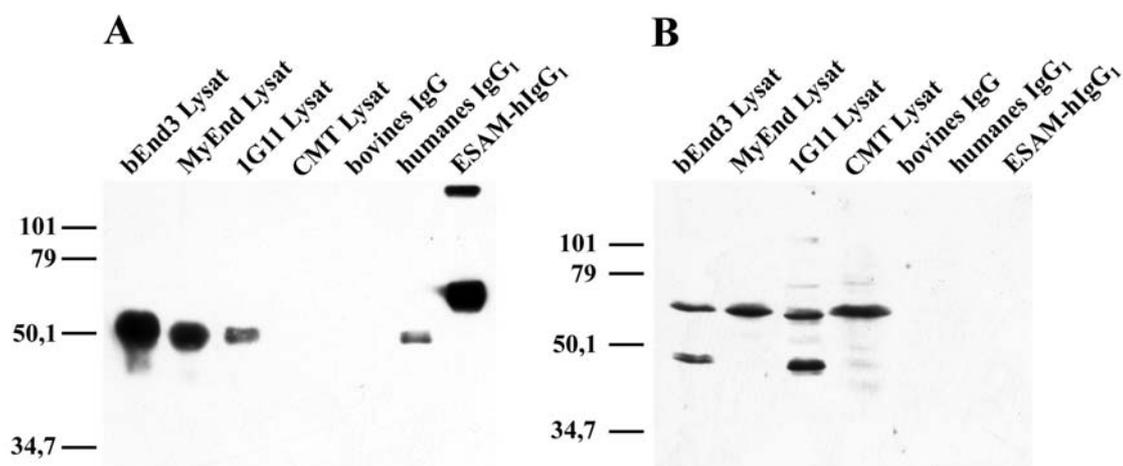


Abb. 11: Charakterisierung des gegen die extrazelluläre Domäne von murinem ESAM gerichteten polyklonalen Antikörpers VE19. A: Triton-Lysate der Endotheliumzelllinien bEnd3, MyEnd und 1G11 sowie der Epithelzelllinie CMT wurden gemeinsam mit bovinem IgG, humanem IgG₁ und dem rekombinanten ESAM-hIgG₁ Fusionsprotein durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion des 55 kDa Proteins ESAM erfolgte mit dem affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörper VE19. **B:** Eine identische Membran wurde mit Präserum des gleichen Kaninchens inkubiert. Die Position des Molekulargewichtsstandards ist auf der linken Seite in kDa angegeben.

Die Expression des ESAM-hIgG₁ Fusionsproteins in stabil transfizierten CHO Zellen wurde mittels ELISA quantifiziert. Mit dem stabil transfizierten CHO Subklon 3.24 konnte eine Proteinausbeute von 0,25 – 0,5 µg/ml erzielt werden. Das Fusionsprotein wurde mit Protein G Sepharose affinitätsgereinigt, gegen PBS dialysiert und aufkonzentriert. Zwei Kaninchen der Rasse New Zealand White (Antiserum VE19 und VE20) wurden mit dem

ESAM-hIgG₁ Konstrukts immunisiert und die spezifischen Antikörper sowie das Präserum der Kaninchen affinitätsgereinigt.

Der affinitätsgereinigte polyklonale Antikörper VE19 erkennt in den bEnd3, MyEnd und 1G11 Lysaten spezifisch das 55 kDa Protein ESAM (Abbildung 11). Bei der Negativkontrolle CMT ist keine spezifische Bande auf derselben Höhe zu detektieren. Zudem wird das zum Immunisieren verwendete lösliche rekombinante ESAM-hIgG₁ Fusionsprotein erkannt. Aufgrund eines schwachen Signals bei humanem IgG₁ kann davon ausgegangen werden, dass der affinitätsgereinigte Antikörper VE19 noch Reste von anti-hIgG₁ Antikörpern enthält. Bei der Inkubation eines identischen Blots mit Präserum gab es kein spezifisches Signal.

Zur Herstellung des MCAR-hIgG₁ Fusionsproteins wurden CHO dhfr⁻ Zellen mit MCAR-hIgG₁-pcDNA3 stabil transfiziert. Das MCAR-hIgG₁ Fusionsprotein im Zellkulturüberstand wurde mit Hilfe eines ELISA quantifiziert. Dabei konnte bei den CHO Subklonen 5.6 und 17.12 eine Proteinausbeute von 0,25 – 0,5 µg/ml erzielt werden. Das Fusionsprotein wurde mit Protein G Sepharose affinitätsgereinigt, gegen PBS dialysiert und aufkonzentriert. Für die Immunisierung von zwei New Zealand White Kaninchen (Antiserum VE15 und VE16) wurden pro Immunisierung 0,6-1 mg Protein eingesetzt.

Die Antiseren wurden mittels Immunoblot getestet, exemplarisch ist in Abbildung 12 die Charakterisierung des pAk VE15 gezeigt. Die Ergebnisse mit dem Antiserum VE16 waren identisch. Der gegen die extrazelluläre Domäne von MCAR gerichtete pAk VE15 erkennt spezifisch das 50 kDa MCAR in Triton-Lysaten der murinen Epithelzelllinie CMT, aber nicht in den Lysaten der Endothelzellen. Zudem wird das Protein in stabil mit MCAR (4.1.9), aber nicht in den mit einem irrelevanten Protein transfizierten CHO Zellen detektiert. Bei einem mit Präserum inkubierten identischen Immunoblot ist keine spezifische Bande zu erkennen. Der zuvor mit Präserum inkubierte Blot wurde mit dem affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörper VE19 reinkubiert, der spezifisch ESAM in bEnd3 und MyEnd Lysaten erkennt, aber nicht MCAR, welches von CMT Zellen und stabil mit MCAR transfizierten CHO Zellen exprimiert wird.

Somit ist das Antiserum VE15 spezifisch für MCAR, das von Epithelzellen, aber nicht von Endothelzellen exprimiert wird. Der affinitätsgereinigte VE19 Antikörper wiederum erkennt spezifisch ESAM und zeigt keine Kreuzreaktivität mit MCAR.

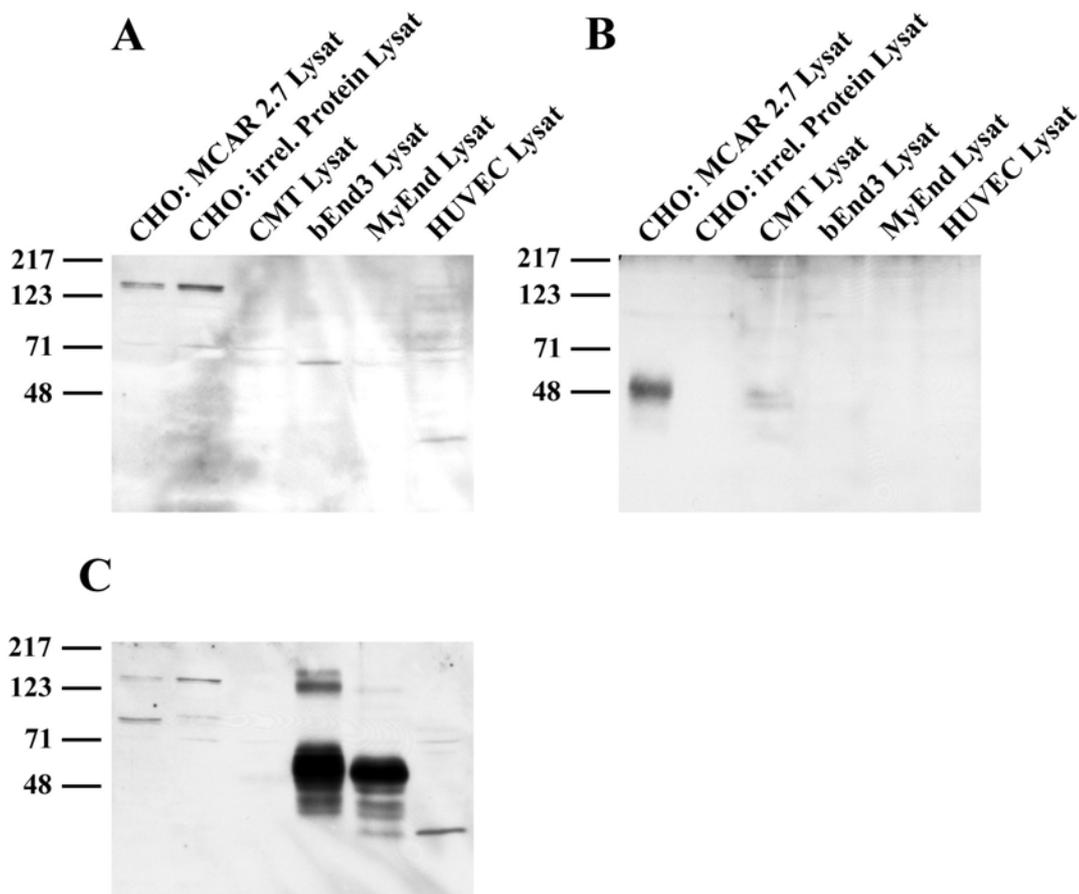


Abb. 12: Charakterisierung des gegen das rekombinante MCAR-hIgG₁ Fusionsprotein hergestellten Antikörpers VE15. **A:** Triton-Lysate der stabil mit MCAR oder einem irrelevanten Protein transfizierten CHO Zellen sowie von der murinen Epithelzelllinie CMT und den murinen Endotheliomazelllinien bEnd.3 und MyEnd sowie den primären Endothelzellen HUVEC wurden unter denaturierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Immunoblot wurde mit Präserum inkubiert. **B:** MCAR wurde mit Hilfe des Antiserums VE15 detektiert, das gegen das MCAR-hIgG₁ Fusionsprotein hergestellt wurde. **C:** Reinkubation des Immunoblots von A mit dem affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörpers VE19, der gegen die extrazelluläre Domäne von ESAM gerichtet ist. Die Position des Molekulargewichtsstandards ist auf der linken Seite in kDa angegeben.

Die Antiseren VE15 und VE16 wurden affinitätsgereinigt und im Immunoblot charakterisiert (Abbildung 13). Es wurden sowohl Signale bei dem zum Immunisieren verwendeten MCAR-hIgG₁ Fusionsprotein als auch bei stabil mit MCAR transfizierten CHO Zellen sowie CMT Zellen detektiert. Die gegen den hIgG₁-Fusionspartner gerichteten Antikörper wurden durch die Affinitätsreinigung entfernt, weil weder bei rekombinantem E-Selektin-hIgG₁ noch bei hIgG₁ eine Bande zu erkennen ist. Allerdings besteht eine geringe Kreuzreaktivität gegenüber dem ESAM-hIgG₁ Fusionsprotein. Dies könnte durch Modifikationen zu erklären sein, die CHO Zellen bei der Expression von hIgG₁-Fusionsproteinen anfügen, weil ESAM in bEnd3 Zellen von dem pAk VE15 nicht erkannt wird.

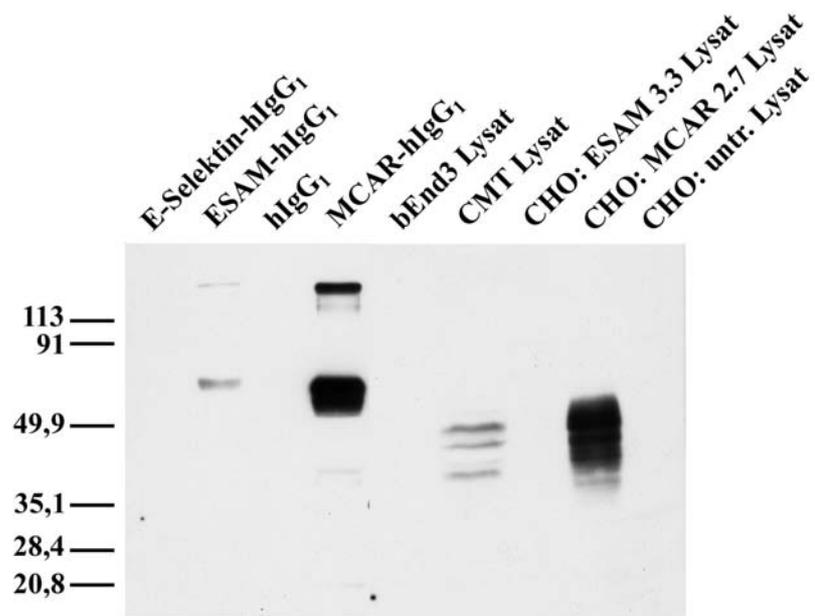


Abb. 13: Charakterisierung des gegen die extrazelluläre Domäne von MCAR gerichteten affinitätsgereinigten pAk VE15. Rekombinante lösliche hIgG₁ Fusionsproteine von MCAR, ESAM und E-Selektin, hIgG₁, Triton-Lysate von bEnd3 und CMT Zellen sowie von mit MCAR und ESAM transfizierten oder untransfizierten CHO Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde der Immunoblot mit dem affinitätsgereinigten polyklonalen MCAR Antikörper VE15 analysiert. Die Position des Molekulargewichtsstandards ist auf der linken Seite in kDa angegeben.

4.1.8 Herstellung und Charakterisierung stabil mit ESAM transfizierter CHO Zellen

Zur weiteren Charakterisierung von ESAM wurden CHO dhfr⁻ Zellen stabil mit ESAM-pcDNA3 transfiziert. Die Charakterisierung der Subklone erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

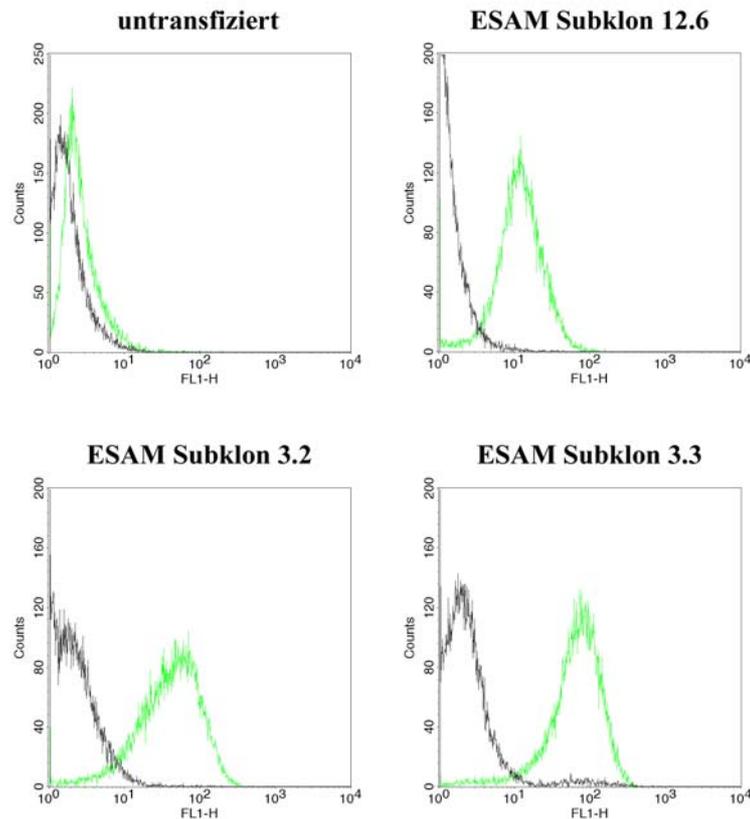


Abb. 14: Charakterisierung der stabil mit ESAM transfizierten CHO Subklone. Die Expression von ESAM in den stabil transfizierten CHO Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Schwarz: V5C7.8 (Isotypkontrolle), grün: V1G8.2 (ESAM).

In Abbildung 14 sind die FACS-Ergebnisse derjenigen mit ESAM transfizierten CHO Subklone gezeigt, die in Permeabilitätsexperimenten (4.2.1) und bei Impedanz-Messungen (4.2.2) eingesetzt wurden. Aufgrund der stärkeren Verschiebung der Fluoreszenzsignale bei den Subklonen 3.2 und 3.3 als bei Subklon 12.6 kann auf eine höhere ESAM-Expression in diesen Zellen geschlossen werden.

4.1.9 Herstellung und Charakterisierung stabil mit MCAR transfizierter CHO Zellen

CHO dhfr⁻ Zellen wurden stabil mit dem rekombinanten Plasmid MCAR-pcDNA3 transfiziert und die erhaltenen Subklone mit Hilfe des affinitätsgereinigten pAk VE15, der gegen die extrazelluläre Domäne von MCAR gerichtet ist, in der Durchflusszytometrie (Abbildung 15) analysiert.

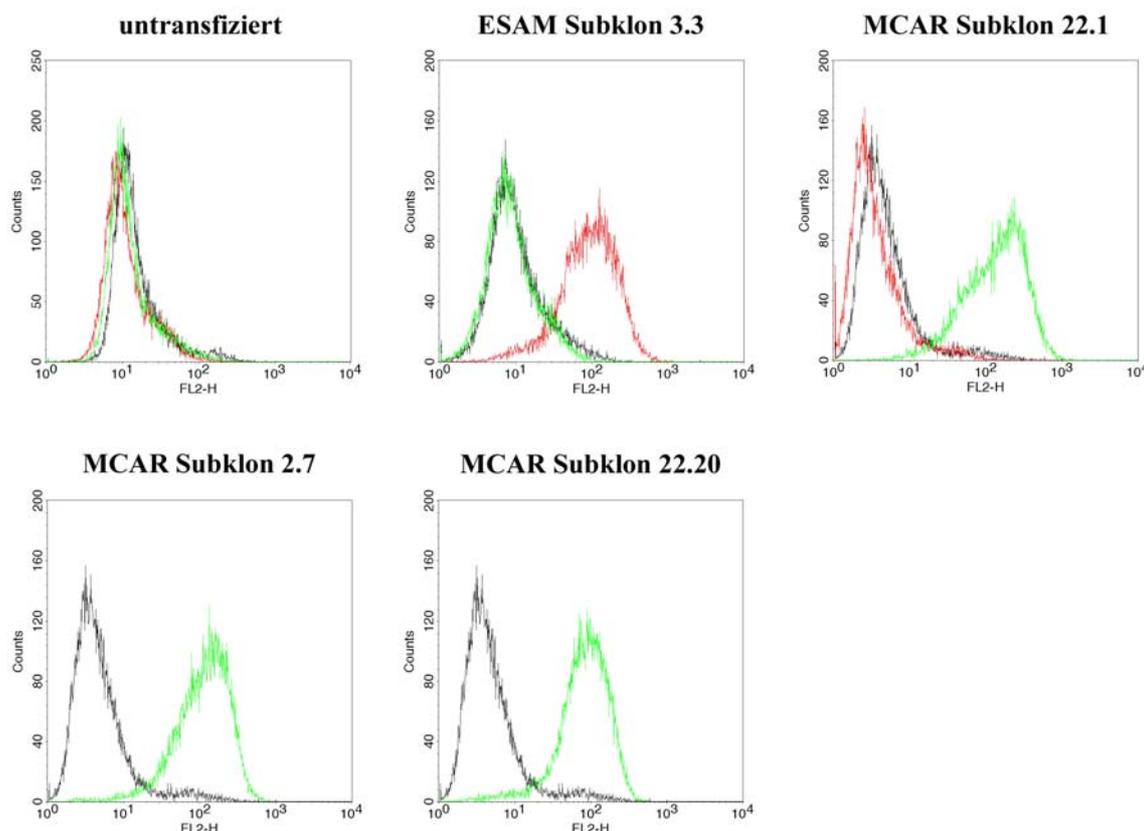


Abb. 15: Charakterisierung der stabil mit MCAR transfizierten CHO Zellen. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Expression von MCAR in stabil transfizierten CHO Zellen und die Kreuzreaktivität des polyklonalen ESAM Antikörpers VE19 und des polyklonalen MCAR Antikörpers VE15 analysiert. Schwarz: Präserum (Isotypkontrolle), grün: VE15 (MCAR), rot: VE19 (ESAM).

Die MCAR-Expression ist in den für weitere Analysen verwendeten Subklonen 2.7 und 22.20 sowohl in Bezug auf die Homogenität als auch die Menge identisch, bei Subklon 22.1 ist die Verteilung nicht so homogen. Der affinitätsgereinigte pAk VE15 erkennt spezifisch MCAR, aber nicht ESAM in stabil transfizierten Zellen. Der gegen ESAM gerichtete Antikörper VE19 ist wiederum nicht kreuzreaktiv mit MCAR.

4.1.10 Homophile und heterophile Interaktionen zwischen Proteinen der CTX Genfamilie

Es sollte systematisch untersucht werden, ob die in diesem Labor untersuchten Zelladhäsionsmoleküle ESAM, MCAR, JAM-A, JAM-B und JAM-C heterophile Interaktionen *in trans* eingehen können. Dazu wurden jeweils zwei mit verschiedenen Molekülen transfizierte CHO Zelllinien gemeinsam ausgesät, bis zur gewünschten Konfluenz kultiviert, mit Methanol fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Die mit Wildtyp JAM-A und JAM-B stabil transfizierten CHO dhfr⁻ Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Klaus Ebnet, die mit der Mutante JAM-C S281A stabil transfizierten CHO Zellen von Dr. Michel Aurrand-Lions (Centre Medical Universitaire, Genf, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

Das in CHO Zellen exprimierte ESAM ist ausschließlich im Zellkontaktbereich von stabil transfizierten CHO Zellen lokalisiert, wie in Abbildung 16 dargestellt. Somit kann eine homophile Interaktion von ESAM *in trans*, aber keine heterophile Interaktion von ESAM mit JAM-A, JAM-B, JAM-C oder MCAR nachgewiesen werden.

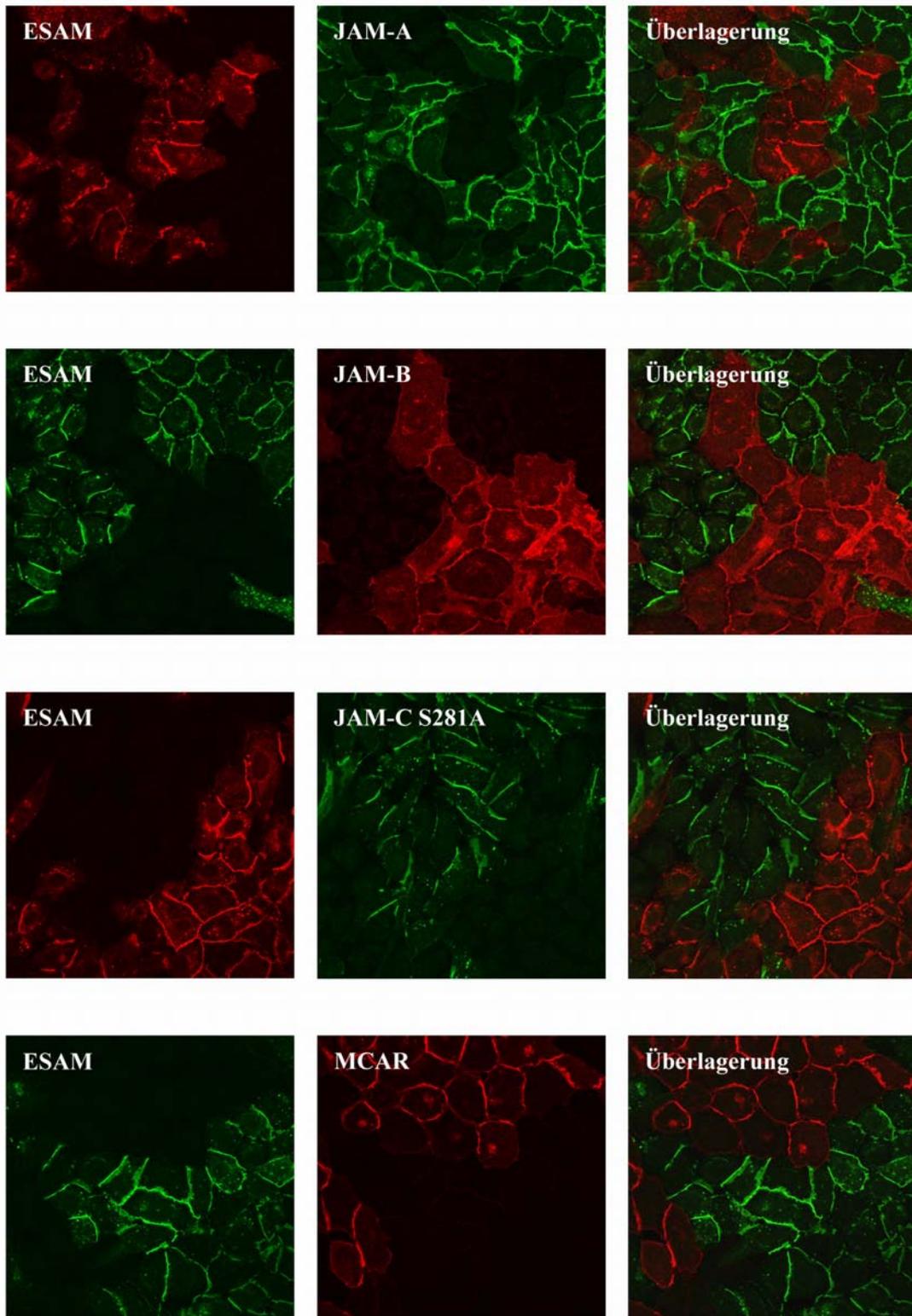


Abb. 16: Homophile, aber keine heterophile Interaktion von ESAM *in trans*. Stabil transfizierte CHO Zellen wurden 1:5 gesplittet, für 3 Tage kultiviert und mit Methanol fixiert. Nach einer Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischen Antikörpern wurden die Proben am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert.

Wie in Abbildung 17 dargestellt kann bei der Kokultivierung von MCAR mit JAM-A, JAM-B oder JAM-C exprimierenden CHO Zellen nur eine homophile Interaktion der Moleküle *in trans* gezeigt werden, da diese Proteine nur im Zellkontaktbereich von Zellen lokalisieren, die jeweils dasselbe Molekül exprimieren.

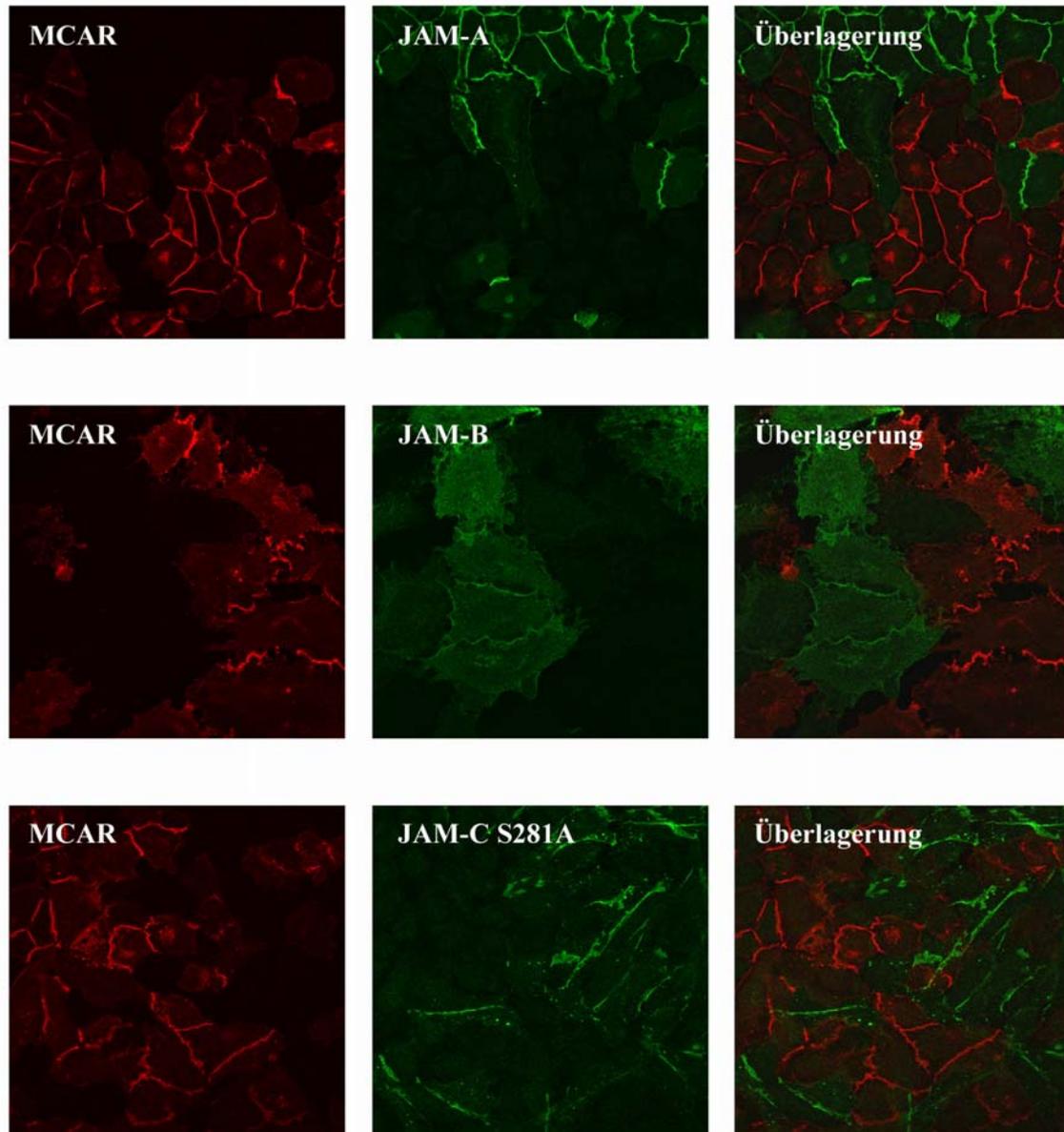


Abb. 17: Homophile, aber keine heterophile Interaktion von MCAR *in trans*. Stabil transfizierte CHO Zellen wurden 1:1 auf Chamber Slides ausgesät und 6 h später mit Methanol fixiert. Die ektopisch exprimierten Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert und der Zellmonolayer am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert.

Bei der Untersuchung der JAM Moleküle (Abbildung 18) konnte nur die schon publizierte heterophile Interaktion zwischen JAM-B und JAM-C bestätigt werden (Arrate et al., 2001). Somit konnte gezeigt werden, dass ESAM, MCAR, JAM-A, JAM-B und JAM-C homophile Interaktionen *in trans* eingehen, aber nur für JAM-B und JAM-C konnte eine heterophile Interaktion nachgewiesen werden.

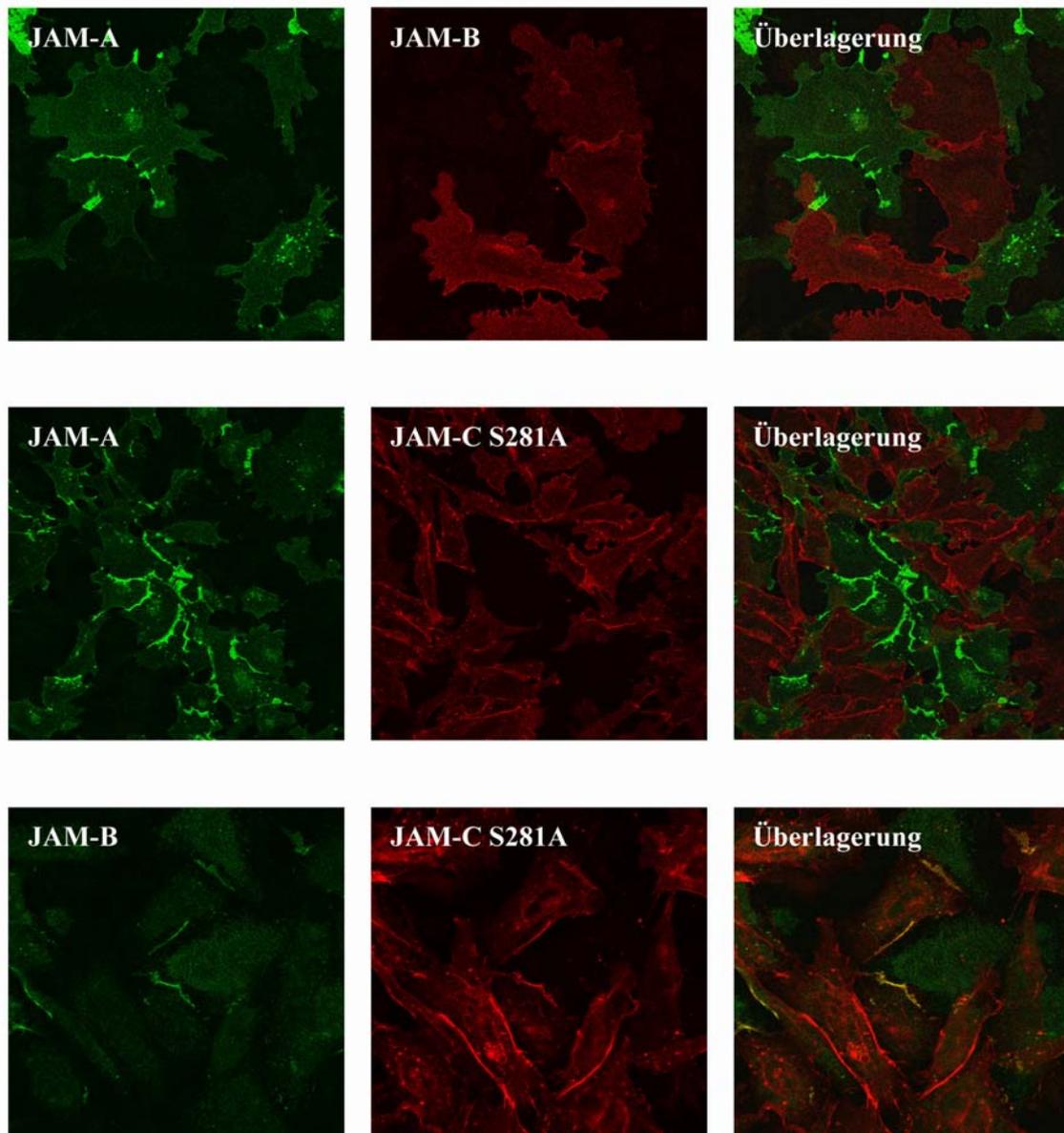


Abb. 18: Heterophile Interaktion zwischen JAM-B und JAM-C *in trans*. Stabil transfi-
zierte CHO Zellen wurden 1:1 gesplittet und nach 6 h mit Methanol fixiert. Nach
einer Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischen Antikörpern wurden die Proben
am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert. Die Gelbfärbung bei der
Überlagerung zeigt eine Kolokalisation an.

4.1.11 ESAM ist ein Tight Junction Protein

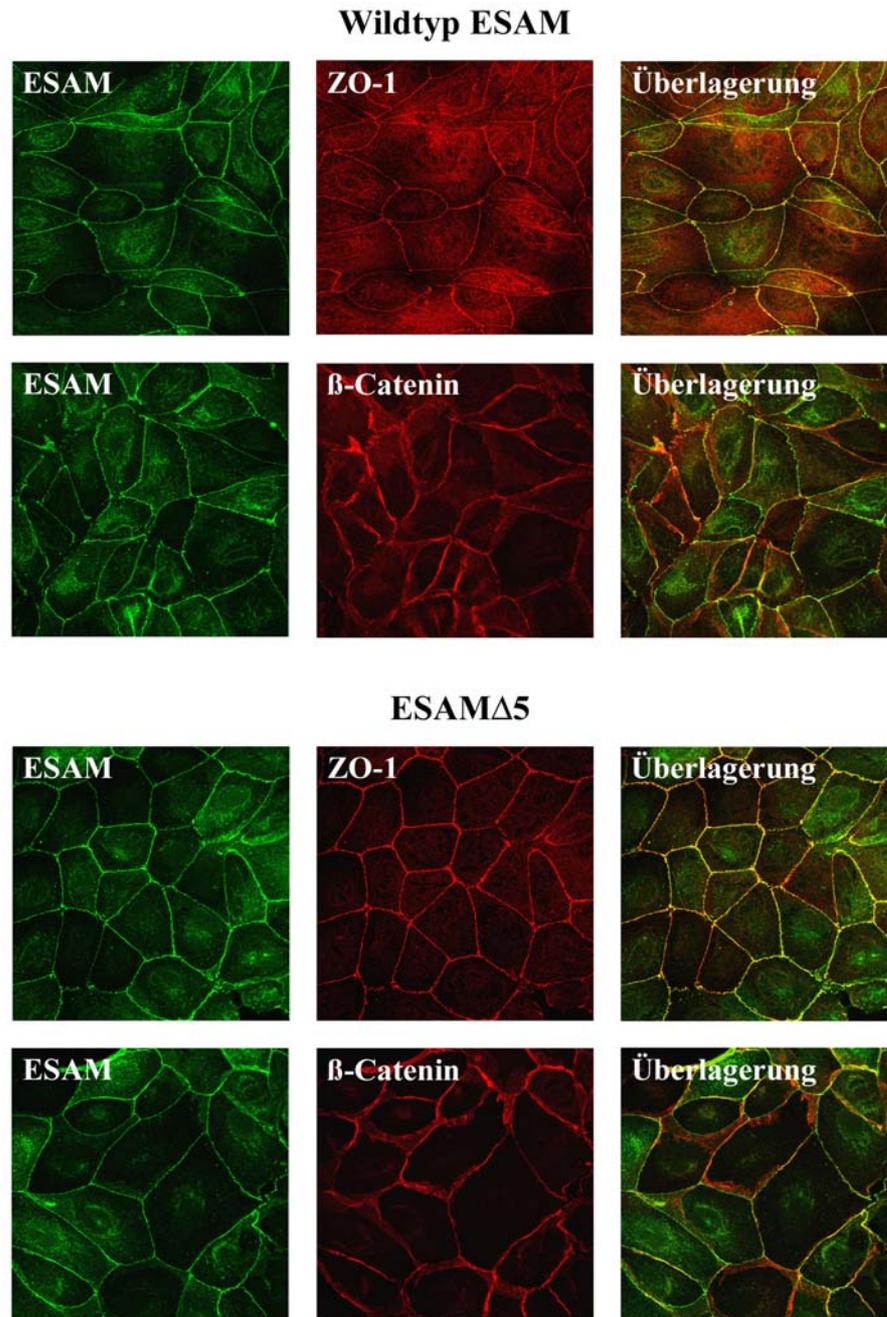


Abb. 19: ESAM kolokalisiert in MDCK C7 Transfektanten mit ZO-1, aber nicht mit β -Catenin. MDCK C7 Transfektanten, die entweder Wildtyp ESAM oder die Deletionsmutante ESAM Δ 5 exprimieren, wurden auf Transwell Filtern kultiviert und im subkonfluenten Zustand mit Methanol fixiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen ESAM (V1G8.2, DTAF) und ZO-1 (pAk, Cy3) oder β -Catenin (mAk, Cy3) durchgeführt und im Konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert. Die gelbe Farbe in der Überlagerung zeigt eine Kolokalisation an. xyz-Scan

Die genaue zelluläre Lokalisation von ESAM wurde in der caninen Epithelzelllinie MDCK C7 analysiert, die zu diesem Zweck mit ESAM-pcDNA3 oder dem Deletionskonstrukt ESAM Δ 5-pcDNA3 stabil transfiziert wurde.

MDCK C7 Transfektanten wurden auf Polycarbonat Filtern ausgesät, um eine optimale Polarisierung mit deutlich voneinander getrennten Tight und Adherens Junctions zu gewährleisten. Bei der Analyse mittels Immunfluoreszenz (Abbildung 19 und 20) konnte eindeutig gezeigt werden, dass ESAM mit ZO-1 und nicht mit β -Catenin kolokalisiert. Dies trifft auch für das ESAM Δ 5 Protein zu. Somit scheint das PDZ-Domänen Bindungsmotiv am C-Terminus nicht für die zelluläre Lokalisation erforderlich zu sein. In Abhängigkeit von der Konfluenz verringert sich die Expression von ESAM in stabil transfizierten MDCK C7 Zellen (4.1.12), so dass sie für funktionelle Analysen nicht geeignet sind.

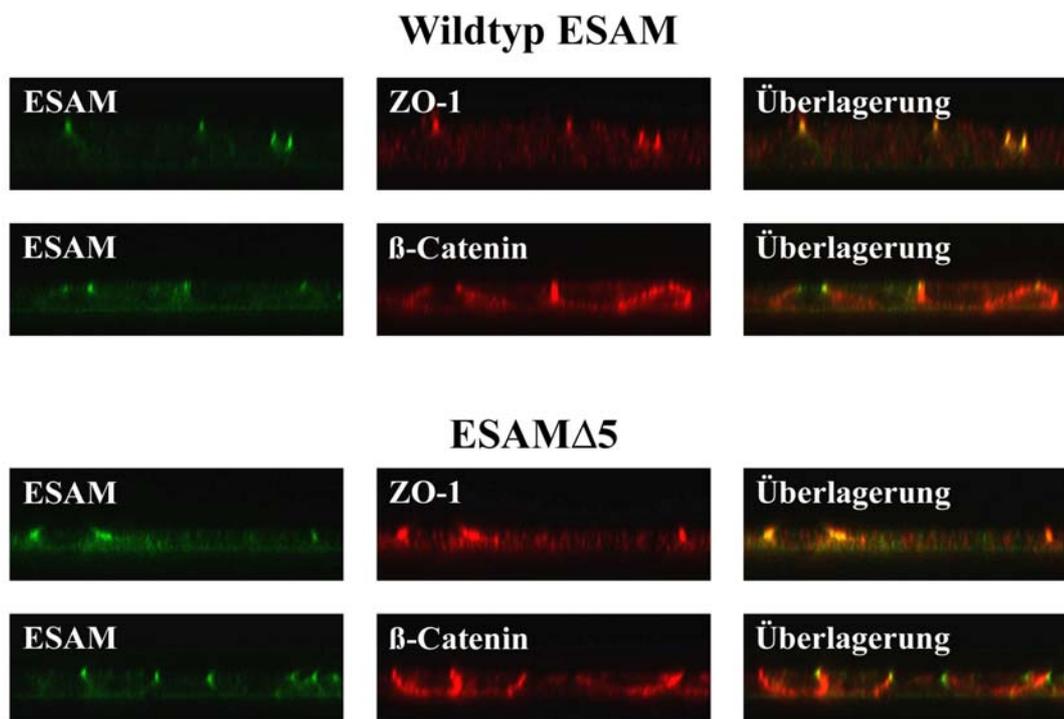
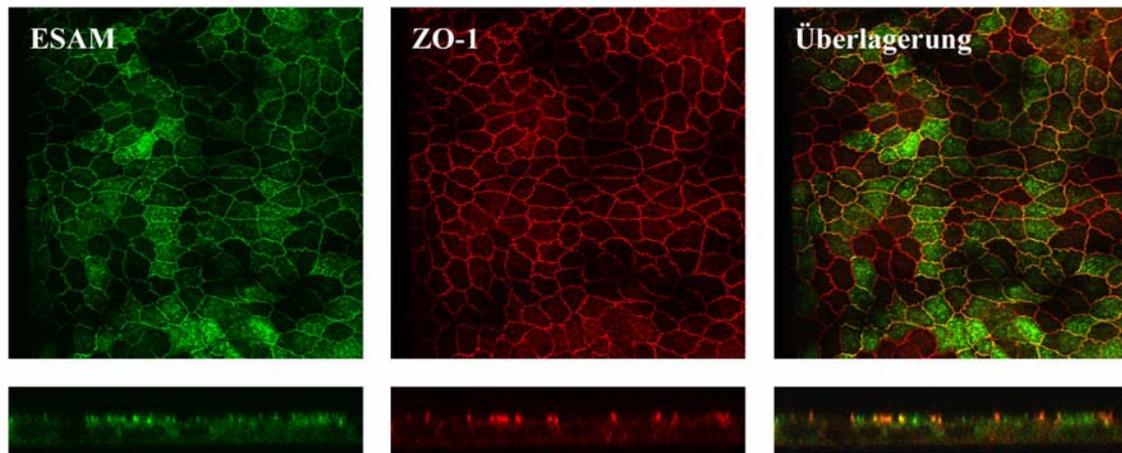


Abb. 20: ESAM kolokalisiert in MDCK C7 Transfektanten mit ZO-1, aber nicht mit β -Catenin. MDCK C7 Transfektanten, die entweder Wildtyp ESAM oder die Deletionsmutante ESAM Δ 5 exprimieren, wurden auf Transwell Filtern kultiviert und im subkonfluenten Zustand mit Methanol fixiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen ESAM (V1G8.2, DTAF) und ZO-1 (pAk, Cy3) oder β -Catenin (mAk, Cy3) durchgeführt und im Konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert. Die gelbe Farbe in der Überlagerung zeigt eine Kolokalisation an. zxy-Scan

ESAM wurde stabil in MDCK II Tet-off Zellen transfiziert (4.1.13), weil von der Arbeitsgruppe Quertermous in diesen Zellen eine Kolokalisation von ESAM mit dem Adherens Junctions-assoziierten β -Catenin gezeigt wurde (Hirata et al., 2001). Außerdem sollte eine epitheliale Zelllinie für funktionelle Analysen hergestellt werden, in der die Expression von ESAM nicht konfluenzabhängig ist.

A



B

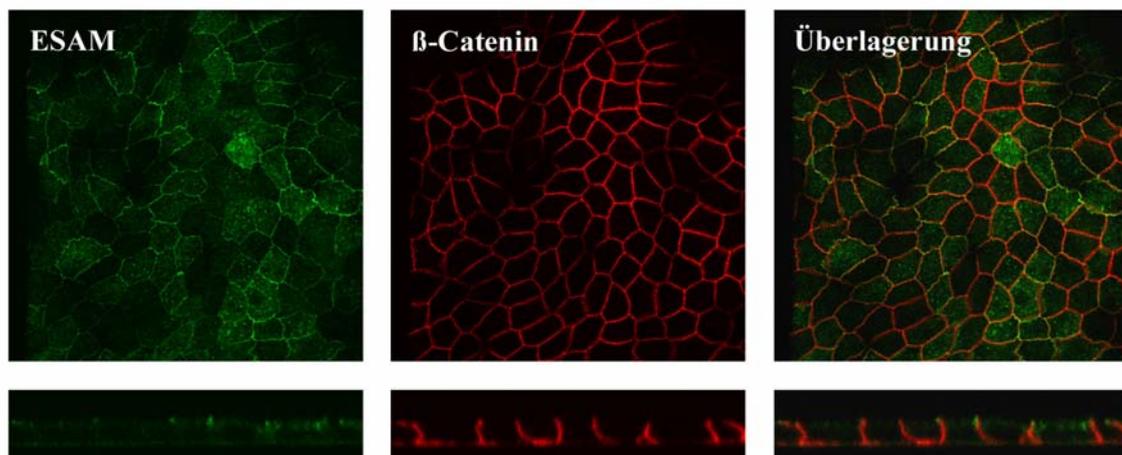


Abb. 21: Exogenes ESAM kolokalisiert mit ZO-1 in transfizierten MDCK II Tet-Off Zellen. Stabil mit ESAM-pTRE2hyg transfizierte MDCK II Tet-Off Zellen wurden zur vollständigen Induktion der ESAM-Expression 14 Tage ohne Doxycyclin kultiviert, auf Polycarbonat Filter ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz wachsen gelassen. Dann wurden die Zellen mit PFA fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und mit Antikörpern gegen ESAM (V1G8.2, DTAF), ZO-1 (mAk von BD, Cy3) oder β -Catenin (pAk von Zymed, Cy3) inkubiert und am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert. Die gelbe Farbe in der Überlagerung zeigt eine Kolokalisation an.

Monolayer mit stabil transfizierten MDCK II Tet-off Zellen mussten nach einer PFA-Fixierung für 5 Min mit 0,5% Triton X-100 permeabilisiert werden. Bei einer geringeren Triton-Konzentration konnte die Expression des Transmembranproteins ESAM trotz Verwendung des monoklonalen Antikörpers V1G8.2, der gegen die Extrazellulärdomäne gerichtet ist, in der Immunfluoreszenz nur schwach und mit zunehmender Konfluenz gar nicht mehr nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 21 gezeigt, wurde auch bei der ektopischen Expression von ESAM in den MDCK II Zellen eine Kolo-kalisation von ESAM mit ZO-1 im apikalen Bereich der Zelle festgestellt. Die Färbung von β -Catenin hingegen erstreckte sich über den vollständigen Zellkontaktbereich. Zusammenfassend kann man sagen, dass ESAM ein Tight Junction Protein ist.

4.1.12 Die Expression von ESAM in stabil transfizierten MDCK C7 ist konfluenzabhängig

Bei der Untersuchung der zellulären Lokalisation von ESAM in stabil transfizierten MDCK C7 Zellen wurden subkonfluente Monolayer verwendet, weil die Expression von ESAM mit zunehmender Konfluenz der Zellen abnahm, obwohl der verwendete eukaryotische Expressionsvektor pcDNA3 den konstitutiv aktiven CMV Promoter enthält. Dabei war unklar, ob dies durch Degradation der mRNA oder Proteolyse des Proteins hervorgerufen wird. Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurden MDCK C7 Zellen, die stabil mit ESAM-pcDNA3, der Mutante ESAM Δ 5-pcDNA3 oder pcDNA3 transfiziert waren, ausgesät und in verschiedenen Konfluenzstadien direkt auf der Platte mit einem Harnstoff-SDS Puffer lysiert. Zur Kontrolle wurde ein konfluenter Monolayer mit der Endotheliazelllinie bEnd3, bei dem die ESAM Expression konstitutiv ist, auf die gleiche Weise behandelt. Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit Hilfe eines BCA-Tests überprüft und äquivalente Proteinmengen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Blots mit Antikörpern gegen ESAM oder β -Catenin inkubiert (Abbildung 22). Dabei war das Signal für β -Catenin bei allen Proben identisch. ESAM konnte in den bEnd3 Lysaten, aber nicht in den Lysaten der mit Leervektor transfizierten Epithelzellen detektiert werden. Bei den MDCK C7 Zellen, die ESAM oder ESAM Δ 5 exprimierten, verringerte sich die Proteinmenge mit zunehmender Konfluenz und war nach spätestens vier Tagen im Immunoblot nicht mehr nachweisbar. Dies entsprach einem Zeitpunkt, als die Zellen nach mikroskopischer Beurteilung bereits Konfluenz erreicht hatten. Die Untersuchung dieser Ergebnisse wurde nicht weiterverfolgt, weil zum einen die biologische Relevanz fraglich war, denn die ESAM Expression in bEnd3 Zellen ist konstitutiv. Zum anderen hatte man in der Arbeitsgruppe von Prof. Beat Imhof (Centre Medical Universitaire, Genf, Schweiz) bei einer ähnlichen Situation zeigen können, dass nach Umklonierung eines Konstrukts mit CMV-Promotor in einen Vektor mit β -Actin Promotor das Phänomen der konfluenzabhängigen Expression nicht mehr auftrat.

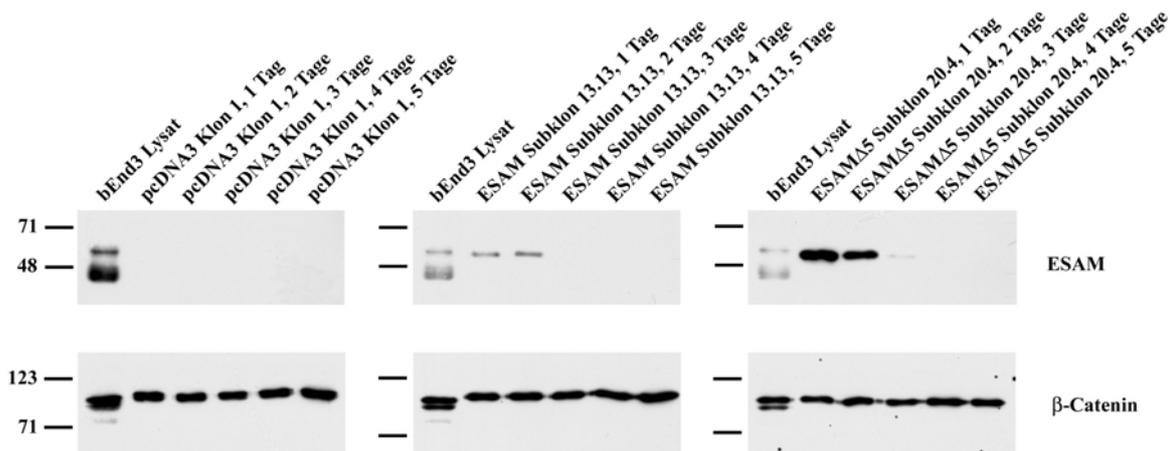


Abb. 22: Die ektopische Expression von ESAM in transfizierten MDCK C7 ist konfluenzabhängig. Die mit ESAM stabil transfizierte Epithelzelllinie MDCK C7 wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach dem Aussäen der Zellen mit SDS-Harnstoff Puffer lysiert, die Proteinkonzentration mittels BCA-Test bestimmt, äquivalente Proteinmengen gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose gebロットet. Als Positivkontrolle wurde ein konfluenter bEnd3 Monolayer eingesetzt und unter denselben Bedingungen lysiert. Die Lokalisation von ESAM erfolgte mittels affinitätsgereinigtem VE19 pAb, von β-Catenin mit kommerziell erhältlichem Antikörper.

4.1.13 Charakterisierung der ESAM Expression in stabil transfizierten MDCK II Zellen

Für funktionelle Analysen wurde das Tet-Off Zellexpressionssystem der Firma Clontech verwendet. Dazu wurden MDCK II Tet-Off Zellen mit dem rekombinanten Plasmid ESAM-pTRE2hyg stabil transfiziert. Die Genexpression wird durch das Entfernen von Doxycyclin (Dox) aus dem Kulturmedium induziert. Selbst bei 10 ng/ml Dox ist die Expression von ESAM noch vollständig unterdrückt, zur Sicherheit wurden standardmäßig 50 ng/ml Doxycyclin eingesetzt. ESAM kann 6 h nach Entfernen von Dox in den Zellkontakten nachgewiesen werden; die Expression nimmt über mehrere Stunden kontinuierlich zu. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie und Immunoblots wurde die Expression von ESAM bei verschiedenen Konfluenzstadien untersucht. In Abbildung 23 ist die FACS-Analyse derjenigen Klone dargestellt, welche für weitere Experimente oder zur Subklonierung verwendet wurden. Diese zeigen keine oder eine nur schwach konfluenzabhängige Verschiebung des ESAM-spezifischen Fluoreszenzsignals.

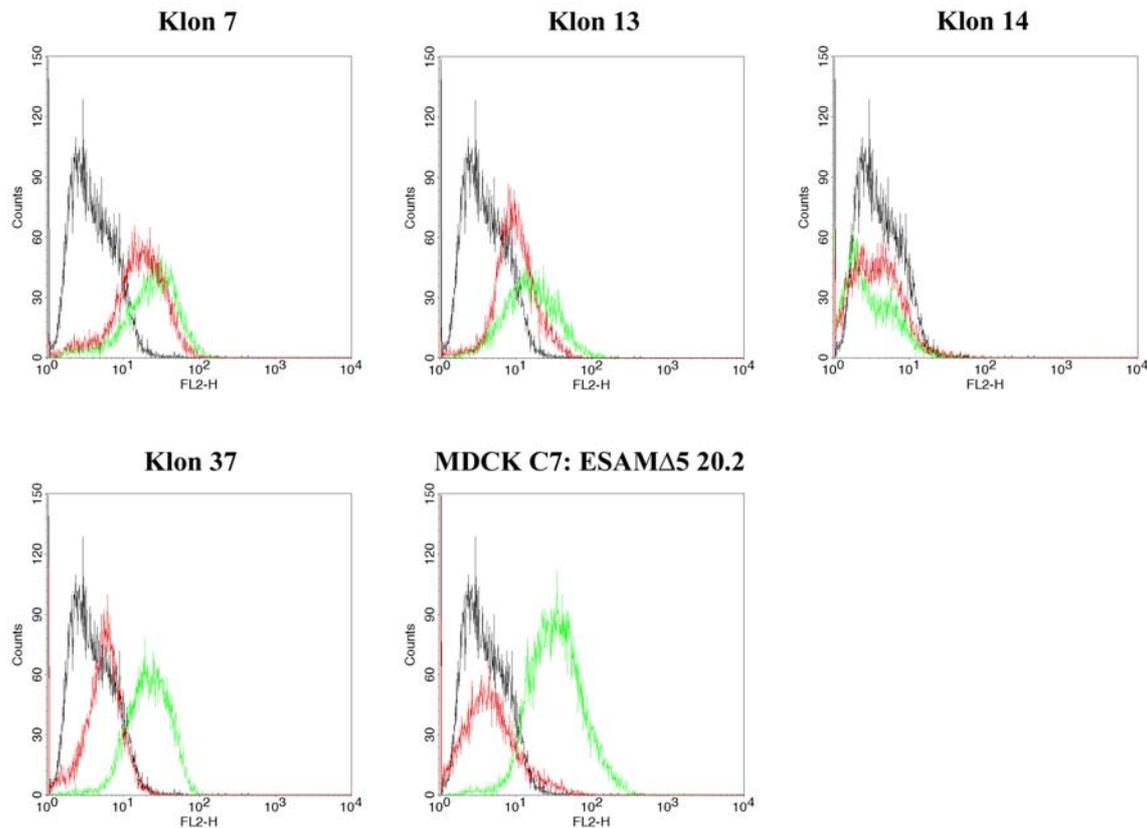


Abb. 23: Charakterisierung der stabil transfizierten MDCK II Klone. Die Expression von ESAM in den stabil transfizierten MDCK II Tet-Off Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Schwarz: pTRE2hyg Klon II als Negativkontrolle (V1G8.2), grün: subkonfluente Zellen (V1G8.2), rot: konfluente Zellen (V1G8.2).

Zum Vergleich wurden MDCK C7 Zellen eingesetzt, die nur im subkonfluenten Zustand ESAM Δ 5 produzieren. Als Negativkontrolle diente Klon 14, der kein ESAM exprimiert. Im Immunoblot (Abbildung 24) sind ebenfalls keine Unterschiede der ESAM-Expression bei verschiedenen Konfluenzstadien festzustellen und bei Anwesenheit von Doxycyclin ist die Expression vollständig unterdrückt. Allerdings unterscheiden sich die Proteinmengen von Klon 7 und Klon 37, was im Gegensatz zu den Ergebnissen der Durchflusszytometrie steht.

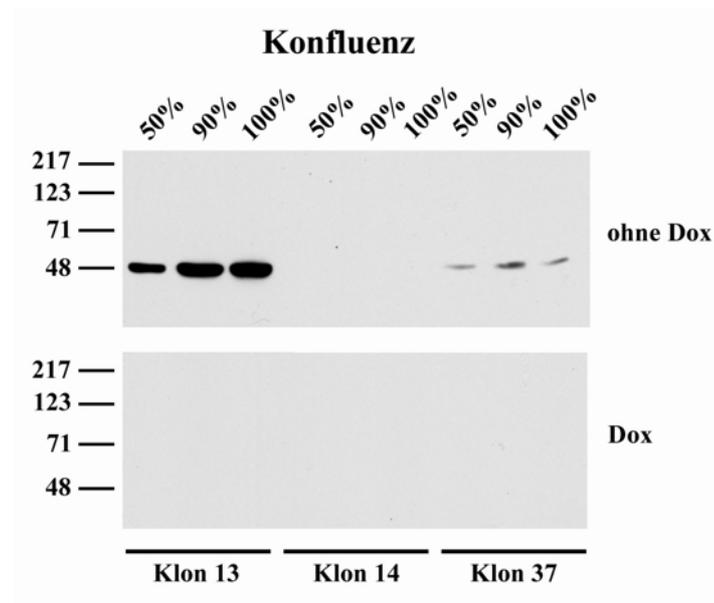


Abb. 24: ESAM Expression in MDCK II Transfektanten in Abhängigkeit von der Konfluenz. Bei den angegebenen Konfluenzstadien wurden stabil mit ESAM transfizierte MDCK II Tet-off Klone mit Harnstoff-SDS Puffer lysiert. Gleiche Proteinmengen wurden nach SDS-PAGE und Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit dem affinitätsgereinigten ESAM Antikörper VE20 analysiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, bei denen die ESAM-Expression durch Doxycyclin (Dox) unterdrückt wurde.

4.1.14 Konstitutive Expression von ESAM in der Endotheliazelllinie bEnd5

Die Expression von ESAM wurde durch Immunfluoreszenz in konfluenten Monolayern von bEnd5 Zellen untersucht (Abbildung 25). Es konnte weder in der Negativkontrolle ohne Primärantikörper, noch bei Verwendung des MCAR Antiserums ein spezifisches Signal detektiert werden. Sowohl ESAM als auch JAM-A sind in den Zellkontakten vorhanden und ihre Expression sowie ihre Lokalisation sind nach einer Stimulation für 16 h mit 5nM TNF- α nicht verändert.

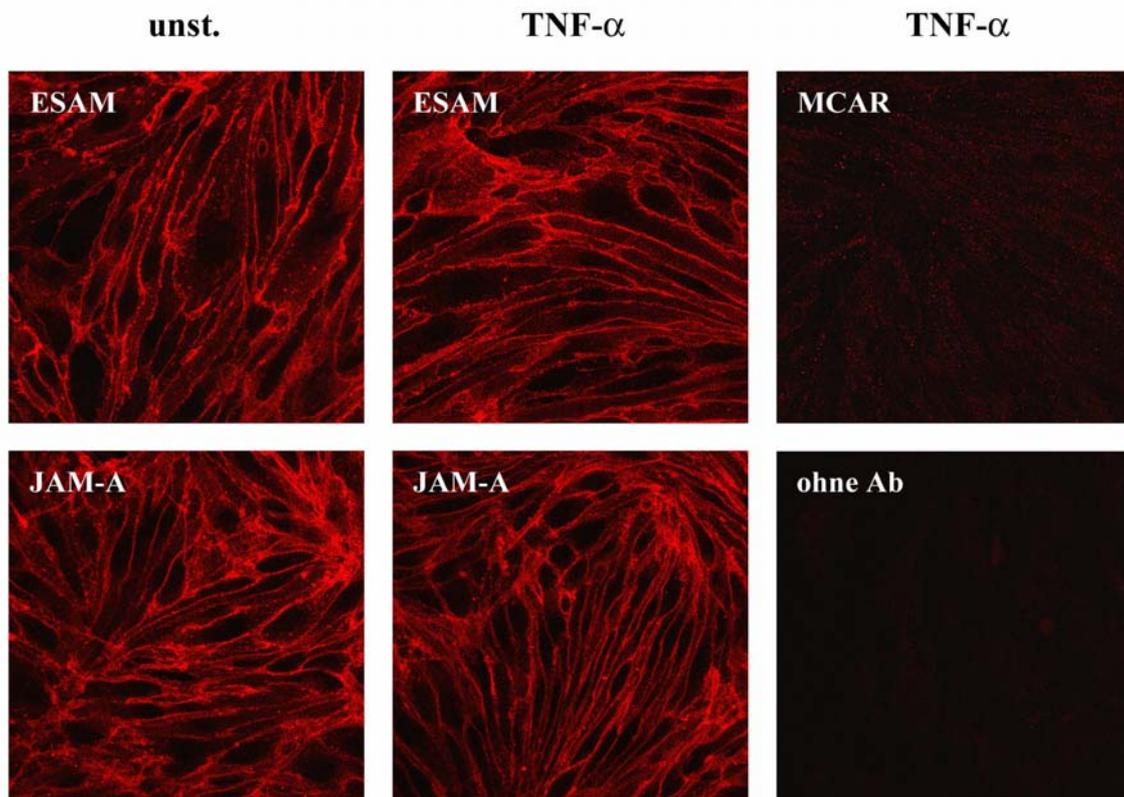


Abb. 25: Konstitutive Expression von ESAM in bEnd5. Es wurden $4 \cdot 10^4$ Zellen pro Transwell Filter ausgesät, die Zellen für 2 Tage kultiviert und teilweise für 16 h mit 5 nM TNF- α stimuliert. Nach einer PFA-Fixierung wurden die Zellen mit den affinitätsgereinigten Antiseren VE19 (ESAM), VE15 (MCAR) oder anti-JAM-A und anschließend mit Cy3 Esel anti-Kaninchen Antikörper inkubiert. Die Analyse erfolgte mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop.

4.2 Funktionelle Analysen von ESAM

In verschiedenen funktionellen Experimenten sollte untersucht werden, ob durch ektopische Expression des Tight Junction Moleküls ESAM oder durch den Einsatz von gegen ESAM gerichteten Antikörpern die Ausbildung oder die Integrität der Tight Junctions beeinträchtigt werden kann.

4.2.1 Die ektopische Expression von ESAM hat keinen reproduzierbaren Einfluss auf die Permeabilität bei *in vitro* Experimenten

Permeabilitätsassays mit CHO Transfektanten

Hierbei wurde die Diffusion von 40 kDa FITC-Dextran durch einen Monolayer von stabil transfizierten CHO Zellen gemessen, die auf Transwell Filtern mit 0,4 μm Porengröße kultiviert wurden. Mit dem CHO Mutterklon ESAM 3 und dem Subklon ESAM 3.3 konnte keine signifikante Verringerung der Permeabilität detektiert werden, wie sie in der Positivkontrolle, mit VE-Cadherin transfizierten CHO Zellen, gemessen wurde (Abbildung 26).

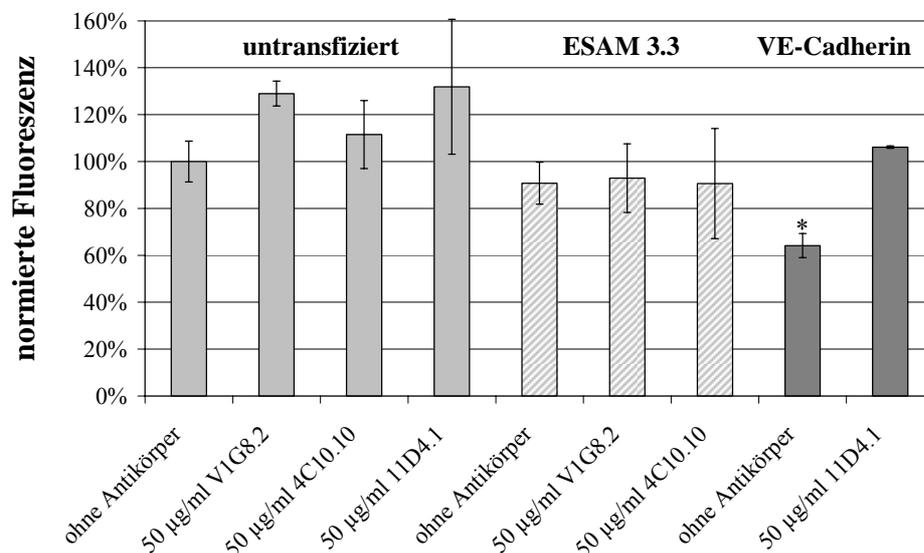


Abb. 26: Einfluss von Zelladhäsionsmolekülen auf die Permeabilität von stabil transfizierten CHO Zellen. CHO Transfektanten wurden auf Transwell Filter ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde die Diffusion von 40 kDa FITC-Dextran durch den intakten Monolayer bestimmt. Der Einfluss von Antikörpern auf die Zellkontakte wurde durch Inhibition mit spezifischen Antikörpern für 30 Min vor Zugabe von FITC-Dextran gemessen. Die Standardabweichung bezieht sich auf $n = 3$ Messwerte. Es ist eines von 3 vergleichbaren Experimenten dargestellt. Student T-Test: * $p < 0,01$.

Der Einsatz des VE-Cadherin Antikörpers 11D4.1 bewirkte eine Erhöhung der Diffusion bis auf das Niveau der untransfizierten Zellen. Die anti-ESAM Antikörper V1G8.2 und V4C10.10 konnten bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml die Permeabilität der ESAM Transfektanten nicht erhöhen und der Einsatz von mAb bei untransfizierten CHO Zellen bewirkte nur einen leichten, nicht signifikanten Anstieg der Diffusion. Allerdings gab es große klonale Unterschiede bei diesem Experiment. Während VE-Cadherin eine reproduzierbare Verringerung der Permeabilität um 25-45% im Vergleich zu untransfizierten Zellen zeigte, gab es ESAM Subklone, welche die Permeabilität um 35-55% erniedrigten und andere, die diese um denselben Faktor erhöhten. Dasselbe Phänomen der klonalen Varianz wurde mit MCAR-transfizierten Zellen beobachtet (nicht dargestellt). Es kann somit festgehalten werden, dass ESAM ein im Vergleich zu VE-Cadherin schwaches Zelladhäsionsmolekül ist, das wenn überhaupt nur einen sehr geringen Einfluss auf die Integrität der Zellkontakte ausüben kann.

Permeabilitätsassays mit MDCK II Transfektanten

Aufgrund der starken Schwankungen beim Permeabilitätsassay mit CHO Transfektanten und weil diese keine Adherens und Tight Junctions ausbilden, wurden MDCK II Tet-Off Transfektanten verwendet. Es konnte kein Unterschied zwischen ESAM exprimierenden und mit Leervektor transfizierten Zellen festgestellt werden, weder bei Verwendung von 10 kDa noch bei 40 kDa FITC-Dextran, selbst wenn die Diffusionszeit auf 4 h verlängert wurde.

Permeabilitätsassays mit bEnd3 Zellen

Für diese Experimente wurde die Endotheliomazelllinie bEnd3 verwendet, die endogen ESAM exprimiert. Auch hier konnte die Inhibition mit Antikörpern für 30 Min oder längere Zeit keine reproduzierbare Änderung der Permeabilität hervorrufen. Problematisch war bei diesem Zellsystem die hohe Standardabweichung, die geringe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei Verwendung der Positivkontrolle 11D4.1 (anti-VE-Cadherin mAb) und die unspezifischen Effekte von Isotypkontrollen, weshalb die Experimente beendet wurden.

4.2.2 Die ektopische Expression von ESAM hat keinen Einfluss auf den transepithelialen elektrischen Widerstand von CHO Transfektanten

Im Folgenden wurde der Einfluss der ektopischen Expression von ESAM in CHO Zellen auf den transepithelialen elektrischen Widerstand (TER) bestimmt. Dazu wurden CHO Transfektanten auf *electric cell-substrate impedance sensing* (ECIS) Elektroden Arrays ausgesät und bis zur Ausbildung eines Monolayers kultiviert. In einem Frequenzbereich zwischen 10 und 10⁵ Hz wurde die Impedanz bestimmt und durch Anpassen eines mathematischen Modells an die erhaltenen Messwerte wurde der Parameter R_b bestimmt, der ein Maß für den Widerstand des Zell-Zell Kontakts ist.

Tabelle 7: ECIS-Messung von CHO Transfektanten

CHO dhfr ⁻ Zellen	R_b [Ωcm^2]
untransfiziert	1,1 - 1,60
ESAM Subklon 3.2	1,3 - 2,4
ESAM Subklon 3.3	0,5 - 2,5
ESAM Subklon 12.6	0,6 - 2,4
VE-Cadherin	2,2 - 5,0

Zwischen untransfizierten und mit ESAM transfizierten CHO Subklonen ist kein signifikanter Unterschied zu detektieren (Tabelle 7). Die Expression von VE-Cadherin in CHO Zellen verursacht eine deutliche Erhöhung des R_b -Wertes.

4.2.3 ESAM hat keinen Einfluss auf den Aufbau des transepithelialen elektrischen Widerstandes bei transfizierten MDCK II

Stabil mit ESAM transfizierte MDCK II Tet-Off Zellen wurden in so hoher Zellzahl ausgesät, dass die Zellen nach dem Abflachen auf der Oberfläche Zellkontakte zum Aufbau eines konfluenten Monolayers eingehen konnten, ohne dass dafür noch eine weitere Zellteilung notwendig war, da ein Unterschied in der Proliferationsrate bei verschiedenen Klonen die Messung beeinflusst hätte. Es wurde der Widerstand bei 400 Hz in Abhängigkeit von der Zeit als Maß für den Aufbau der Tight Junctions betrachtet (Abbildung 27).

Beim Vergleich zwischen induzierten und nicht induzierten Subklonen zum einen und mit Leervektor und ESAM-pTRE2hyg stabil transfizierten MDCK II Tet-off Zellen zum anderen konnte kein Unterschied in der Steigung der Grafen als Maß für den Aufbau der Tight Junctions und dem Maximalwert als Maß für den TER der etablierten Tight Junction festgestellt werden. Die erhaltenen Daten gelten sowohl für die ESAM Klone 7, 13 und 14 als auch die hier gezeigten ESAM Subklone 7.1, 13.4 und 37.1.

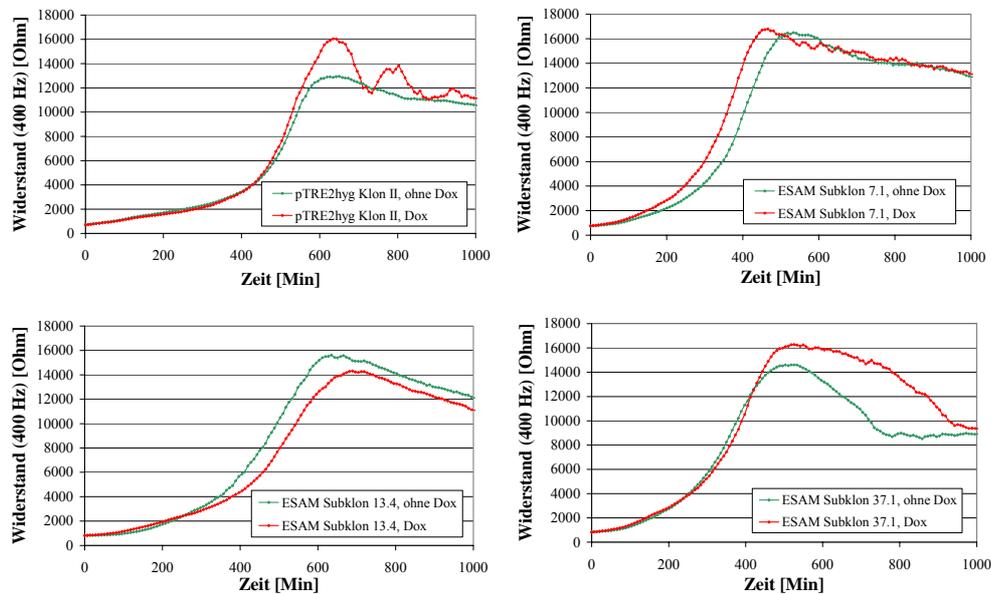


Abb. 27: Ektopisch exprimiertes ESAM hat keinen Einfluss auf den Aufbau von Tight Junctions in transfizierten MDCK II Zellen. Stabil mit ESAM transfizierte MDCK II Tet-Off Zellen wurden für mehr als 14 Tage mit oder ohne 50 ng/ml Dox kultiviert, in der Zelldichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen/cm² auf Goldelektroden ausgesät und bei 2% CO₂ kultiviert. Es wurde der Widerstand bei 400 Hz in Abhängigkeit von der Zeit als Maß für den Aufbau der Tight Junctions betrachtet.

4.2.4 ESAM hat keinen Effekt beim Schließen von Zellkontakten in transfizierten MDCK II

Der Einfluss von ESAM auf den Wiederaufbau bestehender Zellkontakte wurde mit Hilfe der Impedanzmessung bei einem Calcium-switch Experiment bestimmt. Die Inkubation eines konfluenten Monolayers mit Medium, das nur 5 μM Ca²⁺ enthielt, führte zum Öffnen von Tight und Adherens Junctions und somit zum Einbruch des TER, aber noch nicht zum Ablösen der Zellen von der Goldelektrode. Anschließend wurde durch Wechsel des Mediums eine Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration auf 1,8 mM bewirkt, was zum Schließen der Zellkontakte und zum Aufbau des TER führte. Dabei ist sowohl die Kinetik beim Wiederherstellen der Tight Junction, abzulesen an der Steigung der Graphen, als auch die Integrität der Tight Junction, zu erkennen an dem Maximalwert von R_b , nicht signifikant verschieden (Abbildung 28).

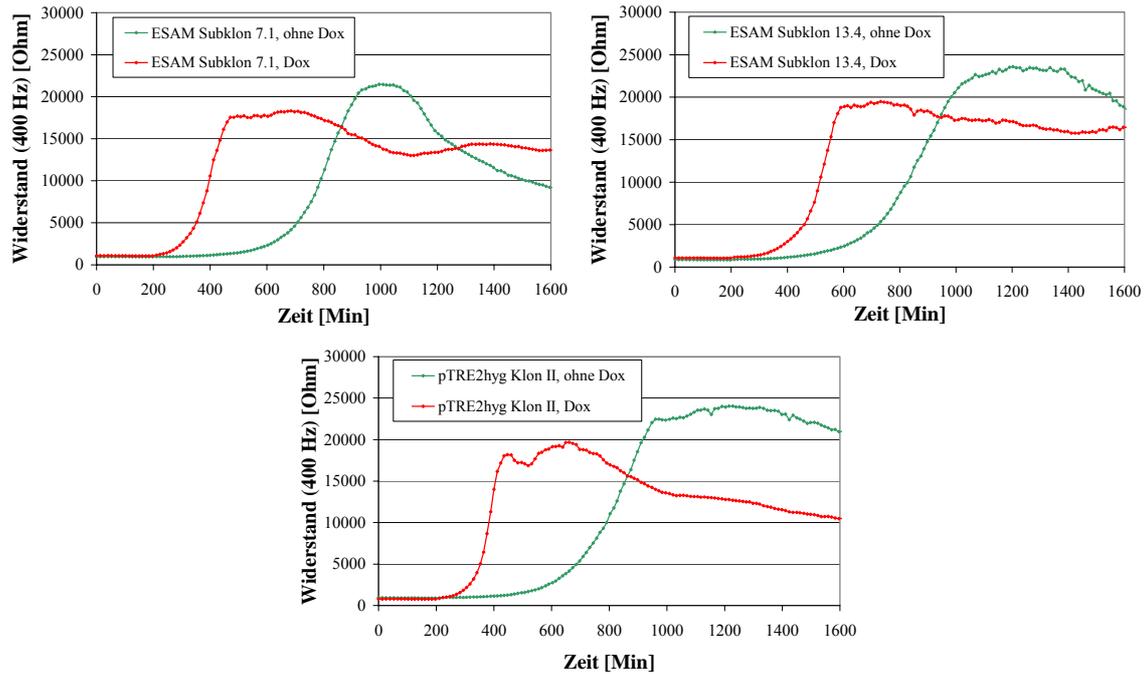


Abb. 28: ESAM hat keinen Effekt beim Schließen von Zellkontakten nach einem Calcium-switch in MDCK II Tet-Off Zellen. MDCK II Tet-Off Transfektanten wurden auf Goldelektroden bis zum Erreichen eines konfluenten Monolayers kultiviert, mit PBS gewaschen und über Nacht in Medium mit $5 \mu\text{M Ca}^{2+}$ inkubiert. Anschließend wurde durch Wechsel des Mediums eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration auf $1,8 \text{ mM}$ bewirkt und der zeitliche Verlauf der Impedanz gemessen.

4.2.5 Antikörper gegen ESAM können die transendotheliale Migration von neutrophilen Granulozyten *in vitro* nicht inhibieren

Aufgrund der zellulären Lokalisation von ESAM bestand die Möglichkeit, daß es am letzten Schritt der Leukozyten-Adhäsionskaskade, der Transmigration durch das Endothel, beteiligt ist. Deshalb wurde der Effekt verschiedener anti-ESAM Antikörper auf die Extravasation von Leukozyten bei *in vitro* Transmigrationsexperimenten analysiert.

4.2.5.1 Durch Kultivierung neutrophiler Granulozyten in WEHI-3B konditioniertem Medium wird die spontane Migration durch bEnd5 Monolayer erhöht

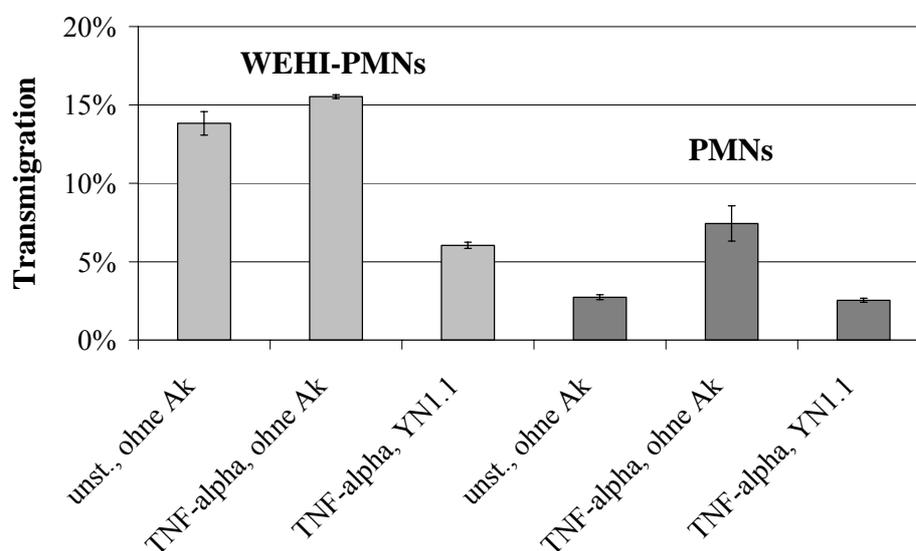


Abb. 29: Vergleich der spontanen Transmigration bei frisch isolierten und über Nacht in WEHI-3B konditioniertem Medium kultivierten PMNs. Es wurden $4 \cdot 10^4$ bEnd5 Zellen pro Filter ausgesät und 2 Tage kultiviert. Der Monolayer wurde teilweise für 16 h mit 5 nM TNF- α stimuliert. Vor der Zugabe der PMNs wurden die Zellen für 30 Min mit 20 μ g/ml YN1.1 (ICAM-1) inkubiert. Der Antikörper blieb während des Experiments auf den Zellen. Die Transmigration dauerte 1 h und die Zahl der durch den Monolayer und den Filter in das untere Kompartiment migrierenden Zellen wurde mit einem CASY Cell Counter bestimmt. Jeder Balken entspricht dem Mittelwert von drei Proben mit der dazugehörigen Standardabweichung.

Die Endotheliazelllinie bEnd5 wurde auf Transwell Filtern mit 5 μ m Porengröße kultiviert und für 16 h mit 5 nM TNF- α stimuliert. Im Zelloberflächen-ELISA (Daten nicht gezeigt) wurde konstitutiv ESAM und eine erhöhte Expression von ICAM-1 nach 16 h Stimulation mit TNF- α nachgewiesen. Bei frisch aus dem Knochenmark von NMRI Mäu-

sen isolierten Polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs) lag die Migrationsrate nach 1 h bei 7,4% (Abbildung 29). Durch die Kultivierung der PMNs über Nacht in WEHI-3B konditioniertem Medium wurde die Transmigrationsrate auf 15,5% erhöht. In beiden Fällen konnte mit dem monoklonalen Antikörper YN1.1, der an die mit LFA-1 interagierende erste Immunglobulin-Domäne von ICAM-1 bindet, die transendotheliale Migration um mehr als 60% inhibiert werden. Da die absoluten Zellzahlen bei den über Nacht kultivierten PMNs deutlicher über dem Hintergrundwert beim CASY Cell Counter waren, wurden diese Zellen in den folgenden Experimenten eingesetzt.

4.2.5.2 Kinetik der spontanen Migration von Polymorphkernigen Neutrophilen durch bEnd5 Monolayer

Zur Abschätzung des optimalen Zeitpunkts bei den *in vitro* Transmigrationsassays von aus Knochenmark isolierten neutrophilen Granulozyten durch bEnd5 Monolayer wurde das Experiment zu verschiedenen Zeitpunkten abgebrochen (Abbildung 30). Eine Zeitdauer von 1 h für die Migration war optimal, weil die Zellzahlen bei der Bestimmung mittels CASY Cell Counter deutlich über dem Hintergrund lagen und die Inhibition mit YN1.1 klar erkennbar war. Nach 90 Min war die Migrationsrate nicht mehr im linearen Bereich und auch die relative Inhibition mit dem ICAM-1 Antikörper YN1.1 geringer.

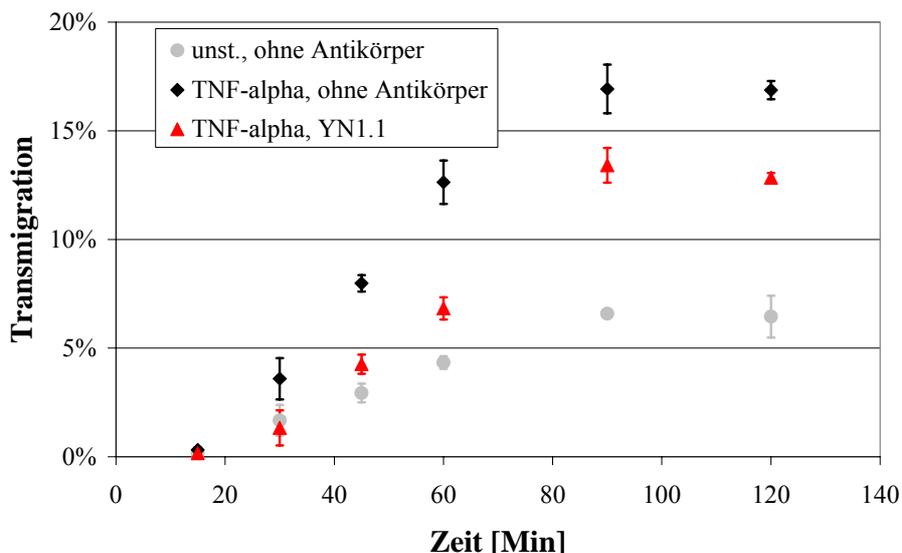


Abb. 30: Kinetik eines *in vitro* Transmigrationsexperiments von PMNs durch bEnd5 Monolayer. Unstimulierte oder mit TNF- α stimulierte bEnd5 Monolayer wurden eingesetzt. Zum Teil wurden die Zellen für 30 Min mit 20 $\mu\text{g/ml}$ YN1.1 inkubiert, die Antikörper wurden nicht ausgewaschen. Durch Zugabe von über Nacht in WEHI-3B konditioniertem Medium kultivierten PMNs wurde die Migration gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Experiment beendet und die Zellzahl im unteren Kompartiment des Transwell Filtersystems mittels CASY Cell Counter bestimmt. Die Integrität des Monolayers wurde anschließend über eine Filipin-Färbung kontrolliert. Pro Versuchsbedingung wurden 3 Proben eingesetzt, von denen Mittelwert und Standardabweichung bestimmt wurden.

4.2.5.3 ESAM-Antikörper können die transendotheliale Migration von Polymorphkernigen Neutrophilen nicht inhibieren

In diesem Experiment wurde der Einfluss von anti-ESAM Antikörpern auf die Migration der über Nacht in WEHI-3B konditioniertem Medium kultivierten neutrophilen Granulozyten untersucht. Dabei wurden 20 µg/ml Antikörper eingesetzt, die während der eigentlichen Transmigration anwesend waren. Dabei konnte mit dem anti-ICAM-1 Antikörper YN1.1 eine signifikante Inhibition von 42% erzielt werden, mit den monoklonalen ESAM Antikörpern V1G8.2 und V4C10.10 hingegen nicht (Abbildung 31). Mit diesen Antikörpern konnte bis zu einer Konzentration von 60 µg/ml nur eine Inhibition von 15% erreicht werden, die allerdings statistisch nicht signifikant war und auch mit Isotypkontrollen erzielt wurde.

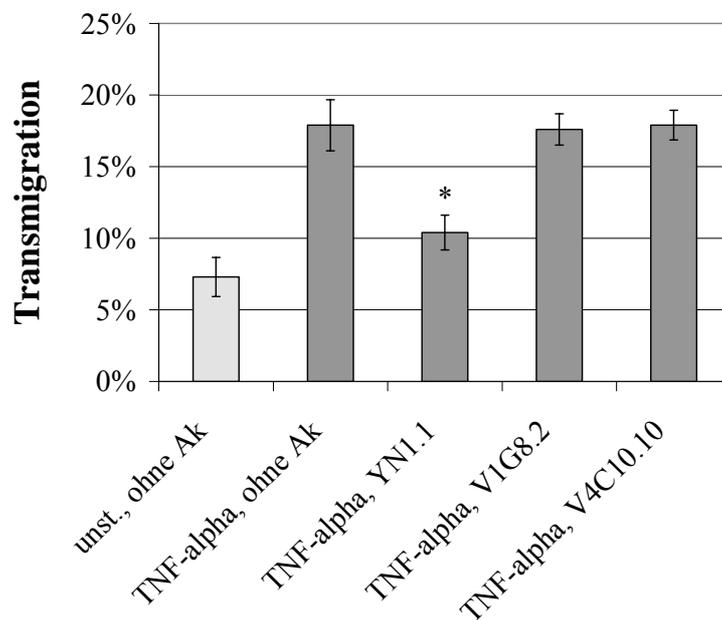


Abb. 31: Monoklonale anti-ESAM Antikörper können die transendotheliale Migration von *in vitro* differenzierten Granulozyten nicht inhibieren. Nach dem Aussäen der bEnd5 Zellen auf Transwell Filtern mit 5 µm Porengröße wurden die Zellen für 2 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Bis auf Kontrollfilter wurden die Zellen für 16 h mit 5 nM TNF-α stimuliert und für 30 Min mit 20 µg/ml monoklonalen Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden PMNs zugegeben und nach 1 h Migration die Zahl der im unteren Kompartiment vorhandenen Zellen bestimmt. Es ist eines von drei repräsentativen Experimenten dargestellt. Jeder Balken entspricht dem Mittelwert von drei Proben mit der dazugehörigen Standardabweichung (Student T-Test: * P< 0,05).

Auch mit den polyklonalen ESAM Antikörpern VE19 und VE20 konnte kein signifikanter Effekt bei der transendothelialen Migration der PMNs beobachtet werden (Abbildung 32). Die polyklonalen ESAM Antikörper verringerten selbst bei 60 µg/ml die Migration um nicht mehr als 15%, was auch mit der Isotypkontrolle Präserum erzielt werden konnte und somit auf einen unspezifischen Effekt zurückgeführt werden konnte.

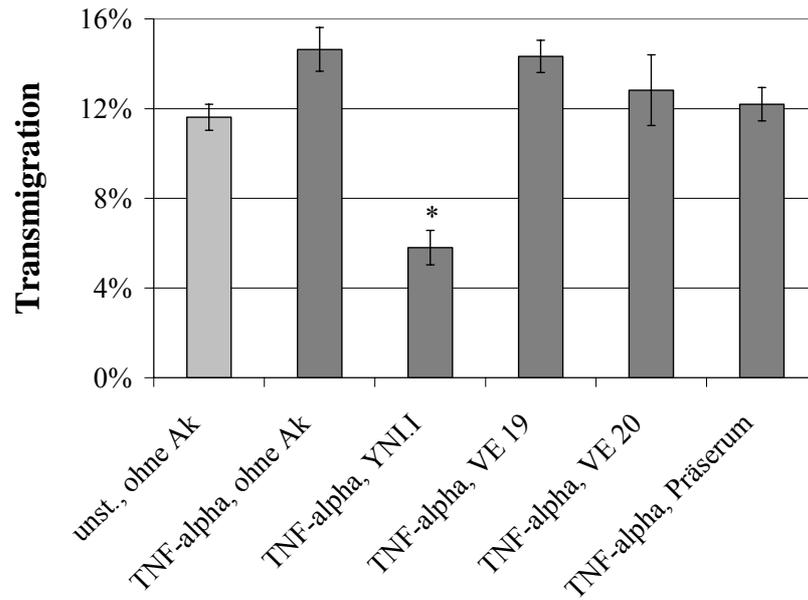


Abb. 32: Bei der transendothelialen Migration von Granulozyten zeigen polyklonale ESAM Antikörper keinen Effekt. Die bEnd5 Zellen wurden 2 Tage auf Transwell Filtern mit 5 µm Porengröße kultiviert, bis auf Kontrollfilter für 16 h mit 5 nM TNF- α stimuliert und für 30 Min mit 60 µg/ml monoklonalen Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden PMNs zugegeben und nach 1 h Migration die Zahl der im unteren Kompartiment vorhandenen Zellen bestimmt. Es ist eines von drei repräsentativen Experimenten dargestellt. Pro Versuchsbedingung wurden 3 Proben eingesetzt, von denen Mittelwert und Standardabweichung bestimmt wurden (Student T-Test: * P < 0,05).

4.2.5.4 ESAM-Antikörper können die transendotheliale Migration von PLP3 T-Zellen nicht inhibieren

Es wurden encephalitogene PLP3 T-Zellen eingesetzt, die bei dem Mausmodell für Multiple Sklerose, experimentelle autoimmune Encephalomyelitis (EAE), verwendet werden. Auch bei diesen *in vitro* Transmigrationsexperimenten zeigten weder die monoklonalen noch die polyklonalen anti-ESAM Antikörper selbst bei Verwendung von bis zu 40 µg/ml Antikörper signifikante Effekte (Abbildung 33).

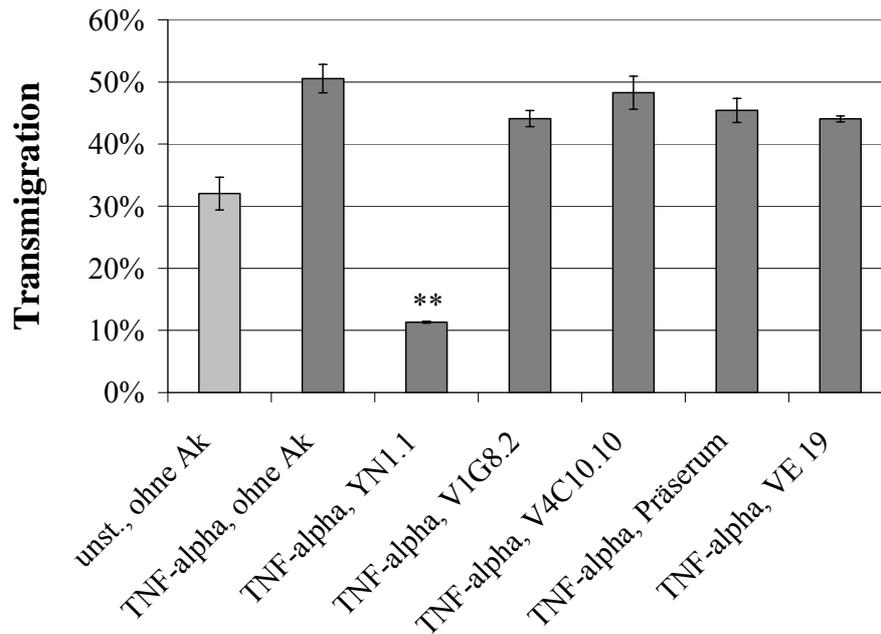


Abb. 33: Bei der transendothelialen Migration von autoreaktiven PLP3 T-Zellen zeigen weder monoklonale noch polyklonale ESAM Antikörper einen Effekt. bEnd5 Zellen wurden 2 Tage auf Transwell Filtern mit 5 µm Porengröße kultiviert, bis auf Kontrollfilter für 16 h mit 5 nM TNF-α stimuliert und für 30 Min mit 60 µg/ml monoklonalen Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden PMNs zugegeben und nach 1 h Migration die Zahl der im unteren Kompartiment vorhandenen Zellen bestimmt. Eines von zwei repräsentativen Experimenten ist dargestellt. Jeder Balken entspricht dem Mittelwert von drei Proben mit der dazugehörigen Standardabweichung (Student T-Test: ** P< 0,01).

4.2.5.5 Die transendotheliale Migrationsrate naiver T-Zellen kann durch anti-ESAM Antikörper nicht verringert werden

Die Präparation naiver T-Zellen erfolgte durch Homogenisierung von Lymphknoten, einen Histopaque Stufengradienten und eine Depletion von B-Zellen mit Hilfe von CD19 gekoppelten Dynabeads. Die so erhaltene Zellpopulation wurde mittels FACS-Analyse untersucht (Abbildung 34). Die CD19 positive Zellen wurde durch die B-Zell Depletion vollständig entfernt, während die restlichen Populationen nicht verändert wurden. Das von Monozyten und Granulozyten stark exprimiert CD11b konnte nicht nachgewiesen werden, wodurch gezeigt wurde, dass die Präparation einen sehr hohen Prozentsatz an T-Zellen enthielt.

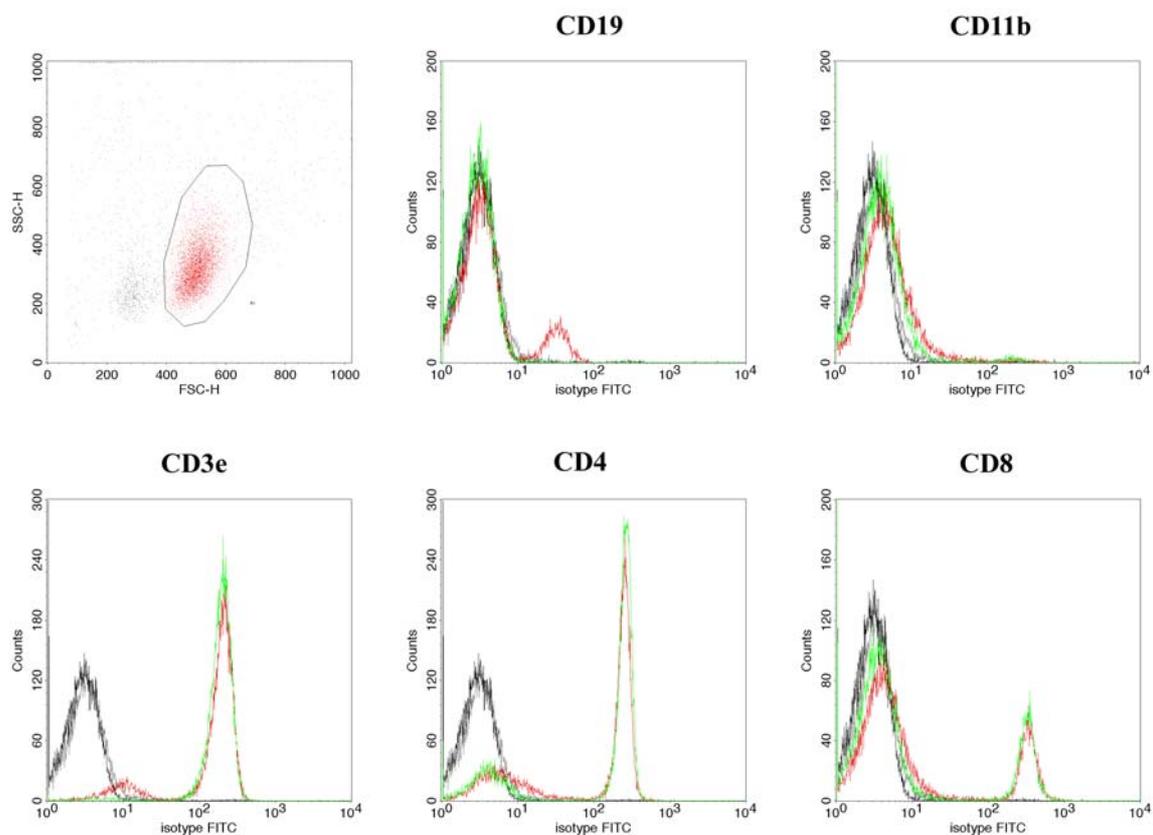


Abb. 34: Kontrolle der B-Zell Depletion nach Aufreinigung von Lymphozyten aus Lymphknoten. Einzelne Zellpopulationen wurden durch FACS-Analyse untersucht. Dabei wurden direkt gekoppelte Antikörper verwendet. Schwarz: Isotypkontrolle (FITC-IgG2a), rot: Zellen vor der B-Zell Depletion, grün: Zellen nach der B-Zell Depletion.

Bei der spontanen Migration von naiven T-Zellen ist die Migrationsrate nur sehr gering. Deshalb wurde SDF-1 α als chemotaktischer Faktor eingesetzt. Die Migrationsrate der naiven T-Zellen ist dabei von der Konzentration des im unteren Kompartiment vorgelegten Chemokins abhängig (Abbildung 35). Für die nachfolgenden Experimente wurden 100 ng/ml SDF-1 α eingesetzt, weil bei dieser Konzentration deutliche Migrationsraten zu messen waren.

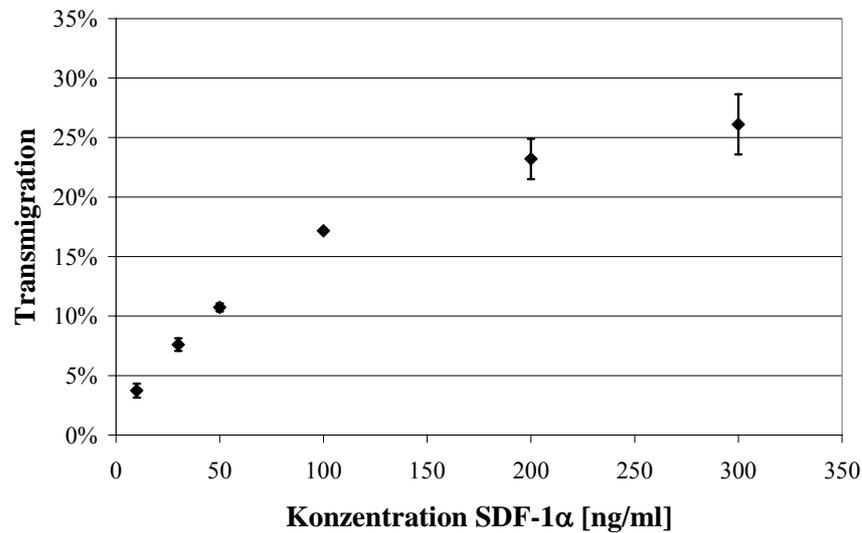


Abb. 35: Konzentrationsabhängigkeit der SDF-1 α induzierten transendothelialen Migration von naiven T-Zellen. Migration von naiven T-Zellen durch einen mit TNF- α stimulierten bEnd5 Monolayer. In das untere Kompartiment wurde SDF-1 α in den angegebenen Konzentrationen gegeben. Nach 4 h wurde die Zellzahl im unteren Kompartiment mittels CASY Cell Counter bestimmt. Pro Versuchsbedingung wurden 3 Proben eingesetzt, von denen Mittelwert und Standardabweichung bestimmt wurden.

Der Einfluss der polyklonalen anti-ESAM Antikörper auf die transendotheliale Migration von naiven T-Zellen wurde in drei unabhängigen Experimenten untersucht. Mit dem affinitätsgereinigten pAk VE19 wurde keine signifikante Verringerung der Transmigration erreicht (Abbildung 36).

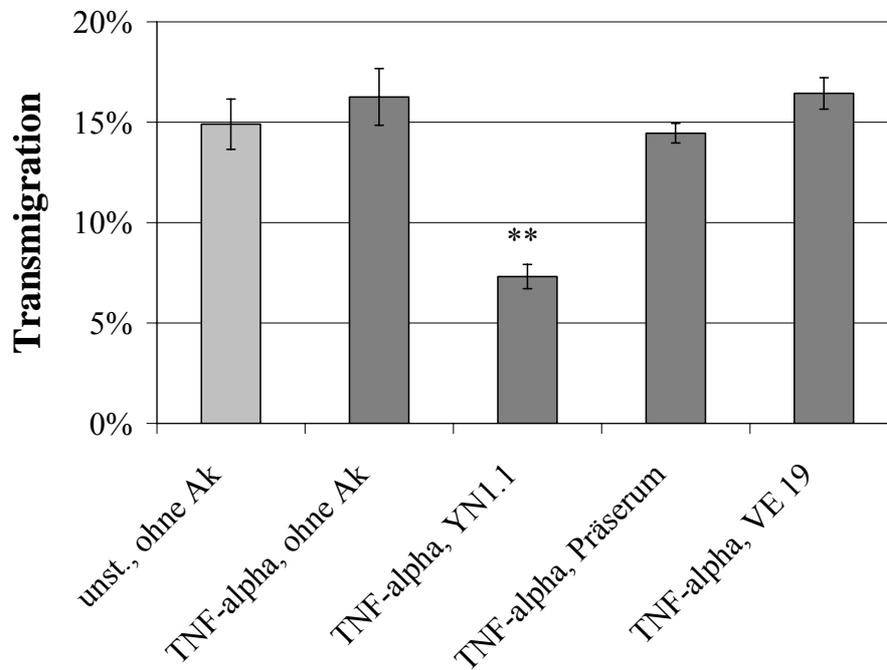


Abb. 36: Polyklonale anti-ESAM Antikörper können die Migration von naiven T-Zellen nicht inhibieren. bEnd5 Zellen wurden 2 Tage auf Transwell Filtern mit 5 µm Porengröße kultiviert, für 16 h mit 5 nM TNF-α stimuliert und für 30 Min mit 20 µg/ml Antikörper inkubiert. Anschließend wurden naive T-Zellen auf den Filter und 100 ng/ml SDF-1α in das untere Kompartiment gegeben. Nach 4 h Migration wurde die Zahl der im unteren Kompartiment vorhandenen Zellen bestimmt. Es ist eines von drei repräsentativen Experimenten dargestellt. Jeder Balken entspricht dem Mittelwert von drei Proben mit der dazugehörigen Standardabweichung (Student T-Test: ** P < 0,01).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse der *in vitro* Transmigrationsexperimente scheint ESAM keine Funktion bei der transendothelialen Migration von neutrophilen Granulozyten oder T-Zellen, im Entzündungsmodell und beim *lymphocyte homing* zu haben. Es besteht zwar die Möglichkeit, dass die verwendeten anti-ESAM Antikörper keine funktionelle Domäne binden. Allerdings ist dies eher unwahrscheinlich, weil auch polyklonale Antikörper keine Effekte gezeigt haben.

4.3 Funktionelle Analyse von mJAM-A

In der Literatur gibt es widersprüchliche Angaben darüber, ob JAM-A an der transendothelialen Migration von Leukozyten beteiligt ist. Deshalb wurden die schon bei der Untersuchung homo- und heterophiler Interaktionen verwendeten polyklonalen JAM-A Antikörper, die freundlicherweise von Dr. Klaus Ebnet zur Verfügung gestellt wurden, für *in vitro* Transmigrationsassays eingesetzt. Diese Experimente wurden analog zu den Versuchen mit anti-ESAM Antikörpern durchgeführt.

4.3.1 Polyklonale Antikörper gegen JAM-A inhibieren die transendotheliale Migration von neutrophilen Granulozyten durch bEnd5 Monolayer *in vitro*

Wie in Abbildung 37 gezeigt, konnte mit den polyklonalen JAM-A Antikörpern eine Inhibition der transendothelialen Migration von neutrophilen Granulozyten um 34% detektiert werden. Der Effekt war konzentrationsabhängig und bereits bei Verwendung von 20 µg/ml polyklonalem Antikörper maximal. Als Negativkontrolle wurde Präserum verwendet, das im Vergleich zu Proben ohne Antikörper keinen Unterschied zeigte.

Als weiteren Beweis für die Beteiligung von murinem JAM-A an der transendothelialen Migration von neutrophilen Granulozyten *in vitro* wurden der Endothelzellmonolayer zur Entfernung der pAk vor Zugabe der PMNs gewaschen. Auch unter diesen Umständen konnte eine signifikante Inhibition nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

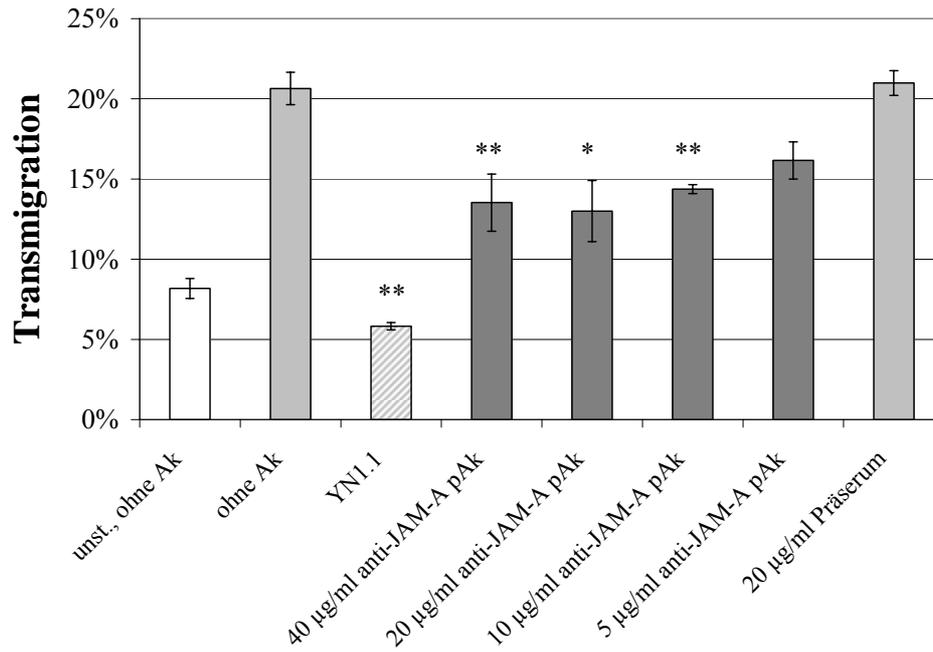


Abb. 37: Polyklonale JAM-A Antikörper inhibieren konzentrationsabhängig die trans-endotheliale Migration von PMNs. Konfluente bEnd5 Monolayer auf Polycarbonat Filtern mit 5 µm Porengröße wurde für 16 h mit 5 nM TNF- α stimuliert und für 30 Min mit Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden ohne vorheriges Entfernen der pAk PMNs auf den Monolayer gegeben und für 1 h inkubiert. Die Zahl der transmigrierten Zellen wurde mit dem CASY Cell Counter bestimmt und der Monolayer mit Filipin angefärbt. Die Standardabweichung bezieht sich auf Dreifachwerte (Student T-Test: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

4.3.2 JAM-A hat keinen Einfluss auf die transendotheliale Migration von PLP3 T-Zellen *in vitro*

Anschließend wurde überprüft, ob die polyklonalen JAM-A Antikörper auch die Migration von T-Zellen, im Entzündungsmodell mit encephalitogenen PLP3 T-Zellen oder mit naiven T-Zellen beim *in vitro* Modell für *lymphocyte homing*, beeinflussen können. Bei Verwendung von autoreaktiven PLP3 T-Zellen konnte keine signifikante Inhibition mit dem polyklonalen JAM-A Antikörper detektiert werden (Abbildung 38). Es gab zwar geringfügige Unterschiede zur Probe ohne Antikörper, die aber auch mit Präserum erzeugt werden konnten und somit unspezifisch waren. Der als Positivkontrolle eingesetzte anti-ICAM-1 Antikörper YN1.1 konnte die transendotheliale Migration statistisch signifikant inhibieren.

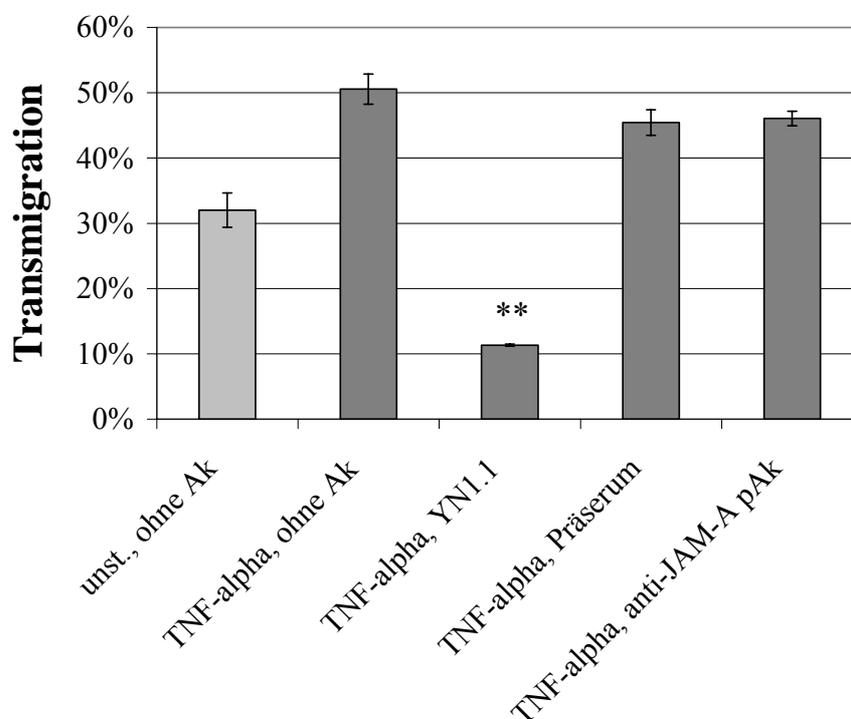


Abb. 38: Der polyklonale JAM-A Antikörper zeigt keinen Effekt bei der transendothelialen Migration autoreaktiver PLP3 T-Zellen *in vitro*. Ein konfluenter bEnd5 Monolayer auf Transwell Filtern wurde für 16 h mit 5 nM TNF- α stimuliert und für 30 Min mit Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden ohne vorheriges Entfernen der pAk PLP3 T-Zellen auf den Monolayer gegeben und für 3,5 h inkubiert. Die Zahl der transmigrierten Zellen wurde mit dem CASY Cell Counter bestimmt und der Monolayer mit Filipin angefärbt. Es ist eines von zwei repräsentativen Experimenten gezeigt. Die Standardabweichung bezieht sich auf Dreifachwerte (Student T-Test: ** $p < 0,01$).

4.3.3 Polyklonale JAM-A Antikörper können die transendotheliale Migration von naiven T-Zellen nicht beeinflussen

Für die Experimente mit naiven T-Zellen wurden diese wie schon zuvor bei Überprüfung der Funktionalität der anti-ESAM Antikörper aus Lymphknoten präpariert, aufgereinigt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Auch bei diesen Versuchen konnte keine Inhibition mit dem JAM-A Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 39). Als weitere Kontrolle wurden parallel zu diesen Experimenten *in vitro* Transmigrationsassays mit PMNs durchgeführt, bei denen der anti-JAM-A Antikörper die Migration signifikant inhibieren konnte.

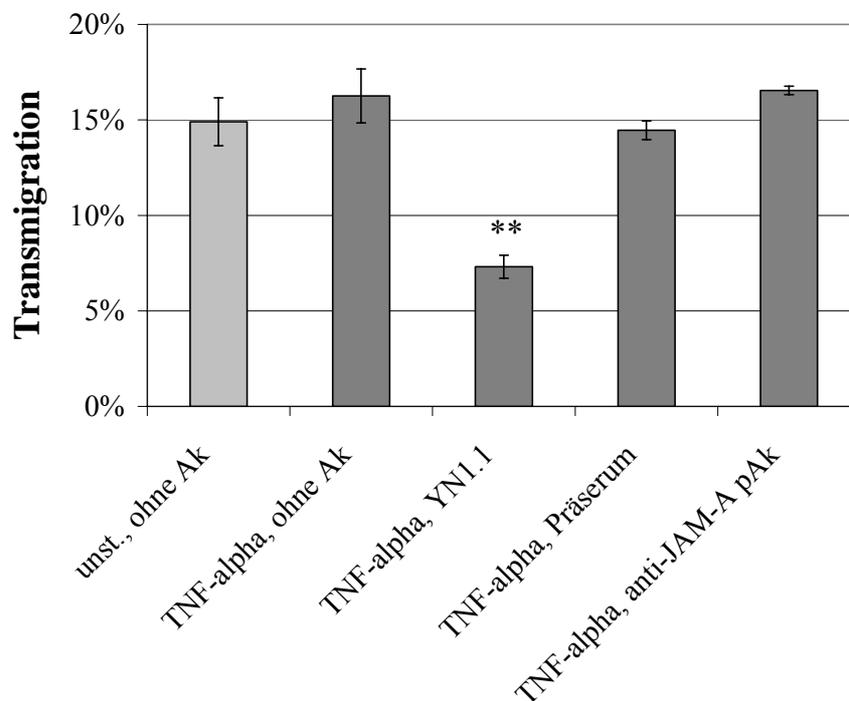


Abb. 39: Der polyklonale JAM-A Antikörper zeigt keinen Effekt bei der transendothelialen Migration naiver T-Zellen *in vitro*. Ein konfluenter bEnd5 Monolayer wurde bis auf die Stimulationskontrolle für 16 h mit 5 nM TNF- α stimuliert und für 30 Min mit 20 μ g/ml Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden 10^5 naive T-Zellen pro Filter zugegeben, 100 ng/ml SDF-1 α ins untere Kompartiment vorgelegt und für 4 h inkubiert. Die Zahl der transmigrierten Zellen wurde mit dem CASY Cell Counter bestimmt und der Monolayer mit Filipin angefärbt. Es ist eines von drei repräsentativen Experimenten gezeigt. Pro Versuchsbedingung wurden 3 Proben eingesetzt, von denen Mittelwert und Standardabweichung bestimmt wurden (Student T-Test: ** $p < 0,01$).

Somit kann festgehalten werden, dass JAM-A vermutlich nicht an der Transmigration von murinen T-Zellen beteiligt ist. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass T-Zellen ein anderes Epitop von JAM-A für die transendotheliale Migration benötigen als neutrophile Granulozyten, das von den polyklonalen Antikörpern nicht erkannt wird.

4.3.4 Murines JAM-A wird auf einer Subpopulation von Neutrophilen des peripheren Blutes exprimiert

Humanes JAM-A wird von mehreren Leukozyten Subpopulationen exprimiert (Liu et al., 2000). Mit monoklonalen Antikörpern gegen murines JAM-A konnte bisher nur eine schwache Expression auf MHC II positiven Antigen präsentierenden Zellen festgestellt werden (Malergue et al., 1998; Martin-Padura et al., 1998). Es sollte im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, ob sich diese Ergebnisse mit dem polyklonalen JAM-A Antikörper bestätigen lassen. Aus dem peripheren Blut von NMRI Mäusen wurden Leukozyten über einen Histopaque-Stufengradienten isoliert und durch Doppel- und Dreifachfärbungen markiert. Wie in Abbildung 40 zu sehen, wird JAM-A weder von T-Zellen (CD3e) noch B-Zellen (CD19) exprimiert. Da bei der hier angewandten Präparation die Zahl der Neutrophilen und Monozyten relativ gering ist, wurden zur Abgrenzung voneinander Dreifachmarkierungen durchgeführt. Die Ly-6G^{high} 7/4 Antigen^{high} exprimierende Population entspricht den neutrophilen Granulozyten, aber Monozyten (Ly-6G^{int} 7/4 Antigen^{high}) konnten - wenn überhaupt - nur wenige identifiziert werden, weshalb hier keine Aussage über sie getroffen werden kann. Bei den neutrophilen Granulozyten konnte mit dem polyklonalen Antikörper eine schwache Expression von JAM-A auf dieser Zellpopulation nachgewiesen werden.

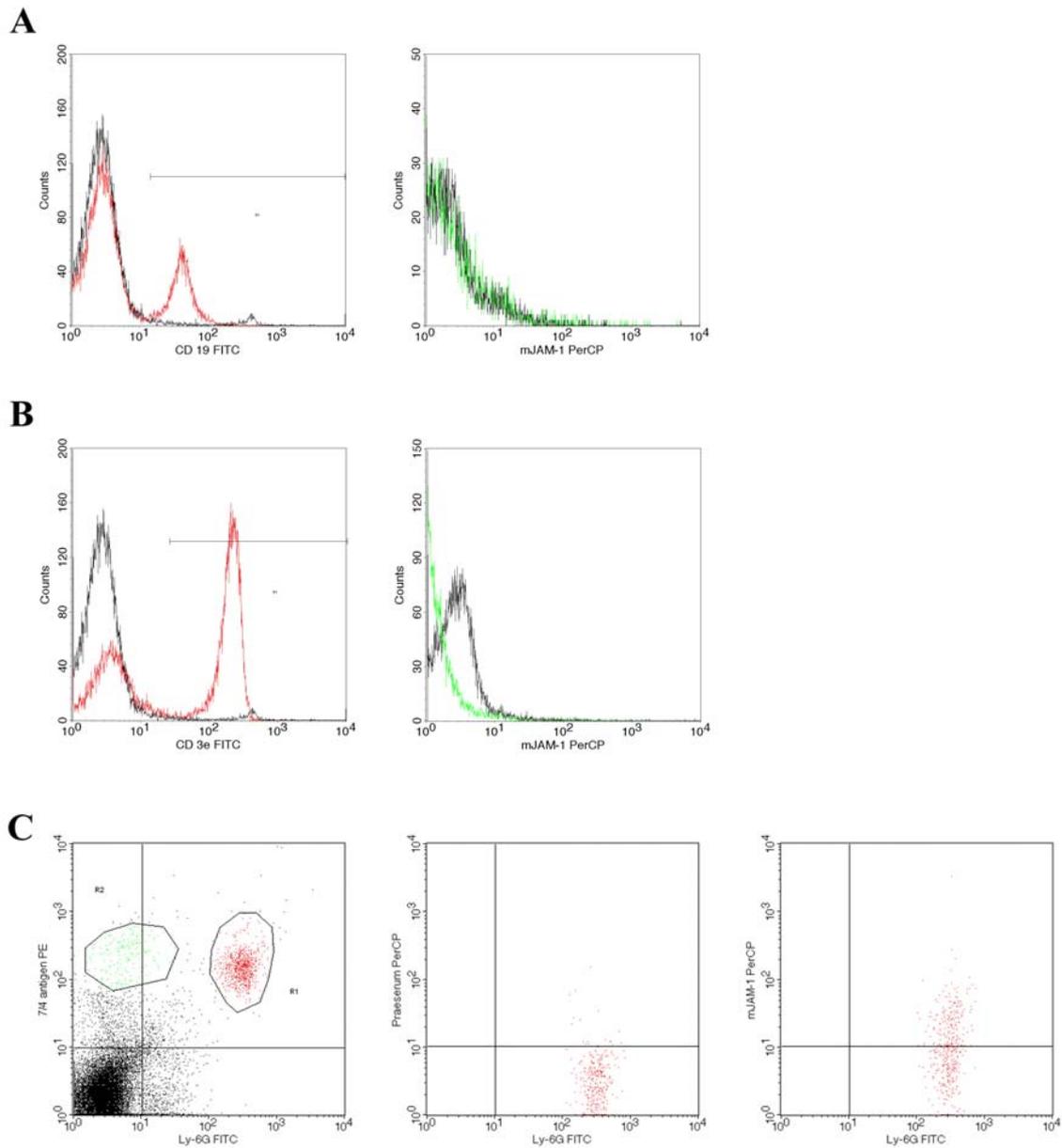


Abb. 40: JAM-A wird schwach von murinen Granulozyten exprimiert. FACS-Analyse von Leukozyten aus dem peripheren Blut. Nach einem Histopaque-Stufengradienten wurden die verschiedenen Zellpopulationen durch Doppel- und Dreifachmarkierungen auf die Expression von murinem JAM-A analysiert. **A:** B-Zellen, **B:** T-Zellen, **C:** neutrophile Granulozyten.

4.3.5 Keine Expression von murinem JAM-A auf neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark

Nach der Identifizierung von murinem JAM-A auf Neutrophilen aus dem peripheren Blut sollte festgestellt werden, ob der polyklonale Antikörper eine homophile oder heterophile Interaktion zwischen Endothelzellen und neutrophilen Granulozyten beeinflusst. Bei einer FACS-Analyse der Polymorphkernigen Neutrophilen aus dem Knochenmark, die über Nacht in WEHI-3B konditioniertem Medium kultivierten wurden und Ly-6G^{high} 7/4 Antigen^{high} exprimierten, konnte allerdings kein JAM-A detektiert werden (Abbildung 41). Als Positivkontrolle für die FACS-Färbung dienten stabil mit JAM-A transfizierte CHO Zellen.

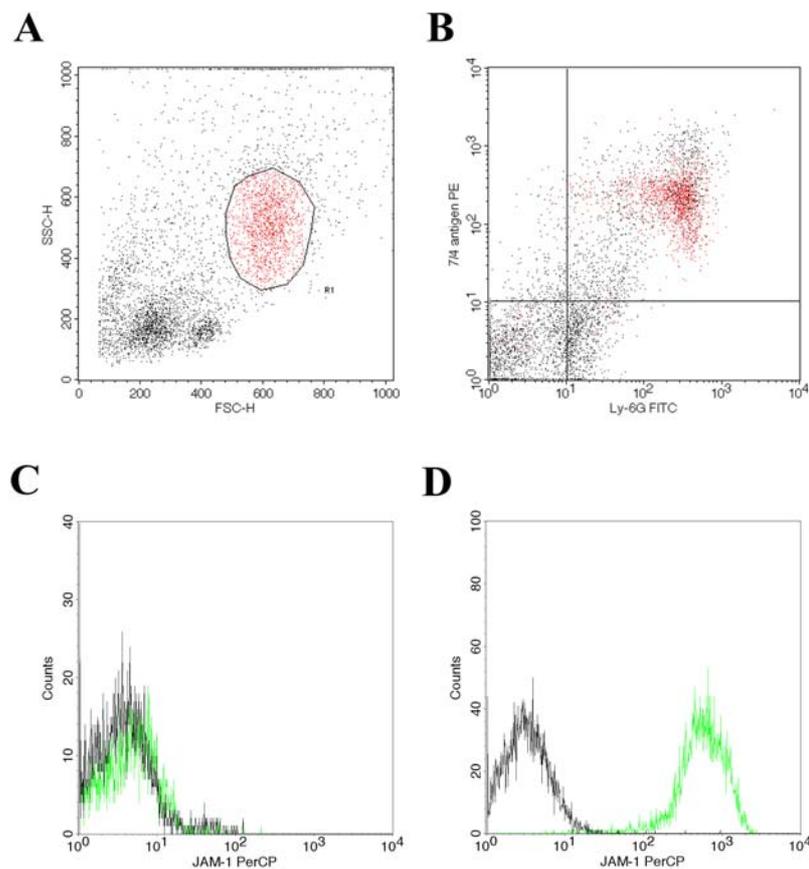


Abb. 41: JAM-A wird nicht auf neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark exprimiert. Analyse der für die *in vitro* Transmigrationsassays eingesetzten PMNs mittels Durchflusszytometrie. **A-C:** PMNs, **D:** JAM-A transfizierte CHO Zellen, **C** und **D:** schwarz: Präserum, grün: anti-JAM-A pAk

4.3.6 Polyklonale Antikörper gegen JAM-A inhibieren den Aufbau des transepithelialen elektrischen Widerstandes

Zur weiteren Charakterisierung der polyklonalen JAM-A Antikörper wurde ihr Einfluss auf den Aufbau von Zellkontakten untersucht. Für diese Untersuchungen wurde die murine Epithelzelllinie CMT eingesetzt, bei der endogenes JAM-A im Zellkontaktbereich mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen wurde (Abbildung 42).

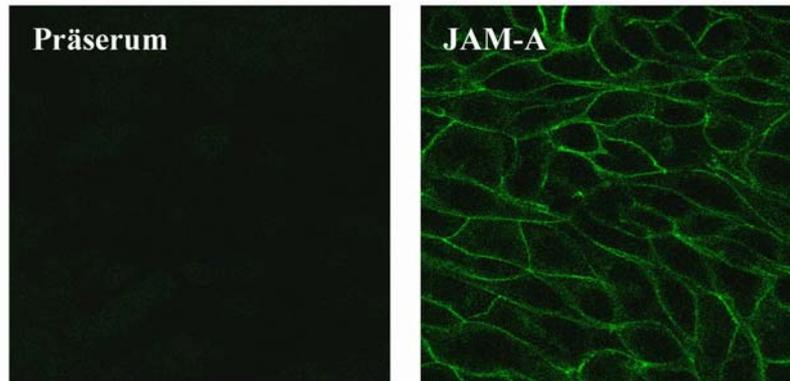


Abb. 42: Endogenes JAM-A in der murinen Epithelzelllinie CMT. Der konfluente CMT Monolayer wurde nach PFA-Fixierung mit polyklonalen Antikörpern gegen JAM-A gefärbt. Die Antikörper wurden durch Cy2 Esel anti-Ratten Antikörper detektiert und mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert.

CMT Zellen wurden bis zum Erreichen eines konfluenten Monolayers auf ECIS Elektroden Arrays kultiviert und dann für 3 h mit $3 \mu\text{M Ca}^{2+}$ inkubiert. Diese Zeitspanne war ausreichend, um den Zell-Zell Widerstand einbrechen zu lassen, aber kurz genug, damit die Zellen sich nicht von der Goldelektrode ablösen. Durch Zugabe von $1,8 \text{ mM Ca}^{2+}$ im Medium schließen sich die interepithelialen Zellkontakte wieder. Wie in Abbildung 43 dargestellt, verzögern polyklonale JAM-A Antikörper den Anstieg des Widerstandes, was auf einen verzögerten Aufbau der Zellkontakte schließen lässt. Zudem wird der Maximalwert des Parameters R_b im Vergleich zum Präserum verringert, was auf eine Störung der Integrität der Tight Junction zurückzuführen ist.

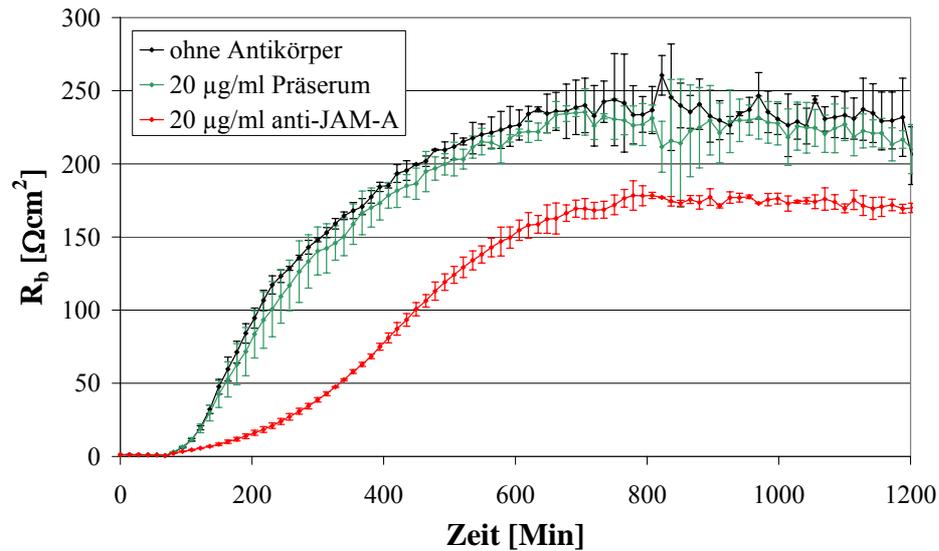


Abb. 43: JAM-A Antikörper verzögern den Aufbau des transepithelialen elektrischen Widerstandes und stören die Integrität der Tight Junction. CMT Zellen wurden auf ECIS Elektroden Arrays ausgesät und bis zum Erreichen eines konfluenten Monolayers kultiviert. Dann wurden die Zellen mit PBS/5mM EDTA gewaschen und für 3 h in Medium mit 3 μM Ca^{2+} kultiviert. Im Anschluß wurde die Kulturflüssigkeit gegen Medium mit 1,8 mM Ca^{2+} ausgetauscht und der Verlauf der Impedanz mit der Zeit bestimmt. Anschließend wurde ein mathematisches Modell an die Messergebnisse angepasst.

Es konnte zudem festgestellt werden, dass dieser Effekt konzentrationsabhängig ist, was für seine Spezifität spricht (Abbildung 44). Bis zu einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-JAM-A Antikörper war der Aufbau der Zellkontakte verlangsamt und der Maximalwert von R_b geringer im Vergleich zur Isotypkontrolle. Der Effekt war bei Einsatz von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Antikörper maximal.

Mit einem JAM-A hIgG₁ Fusionsprotein, das analog zu ESAM-hIgG₁ aus der extrazellulären Domäne von JAM-A und der hinge, C_{H2} und C_{H3} Domäne von humanem IgG₁ besteht, konnte der Aufbau und die Integrität der CMT Zellkontakte nicht gestört werden (Abbildung 45).

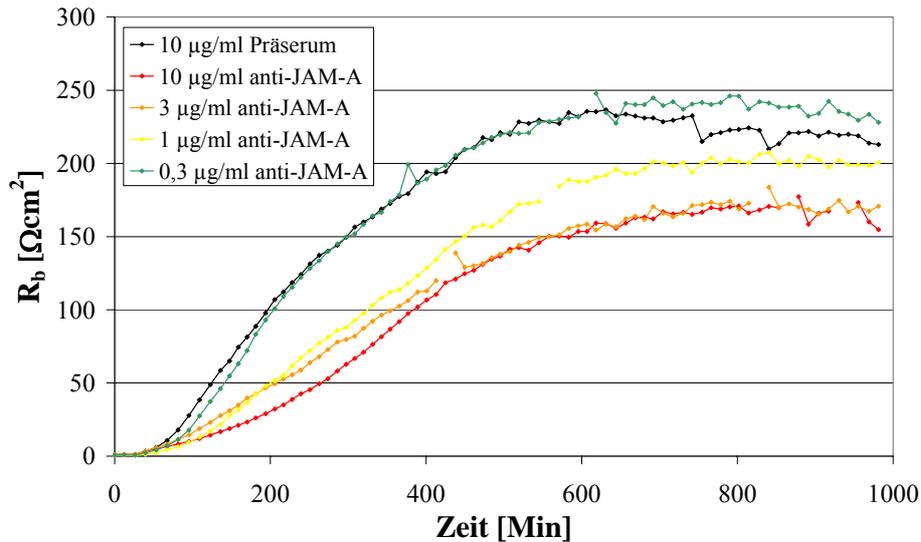


Abb. 44: Konzentrationsabhängiger Effekt der anti-JAM-A pAK beim Calcium-switch Experiment. CMT Zellen wurden auf ECIS Elektroden Arrays ausgesät und bis zum Erreichen eines konfluenten Monolayers kultiviert. Dann wurden die Zellen mit PBS/5mM EDTA gewaschen und für 3 h in Medium mit $3 \mu\text{M Ca}^{2+}$ kultiviert. Im Anschluss wurde die Kulturflüssigkeit gegen Medium mit $1,8 \text{ mM Ca}^{2+}$ ausgetauscht und der Verlauf der Impedanz mit der Zeit bestimmt. Anschließend wurde ein mathematisches Modell an die Messergebnisse angepasst.

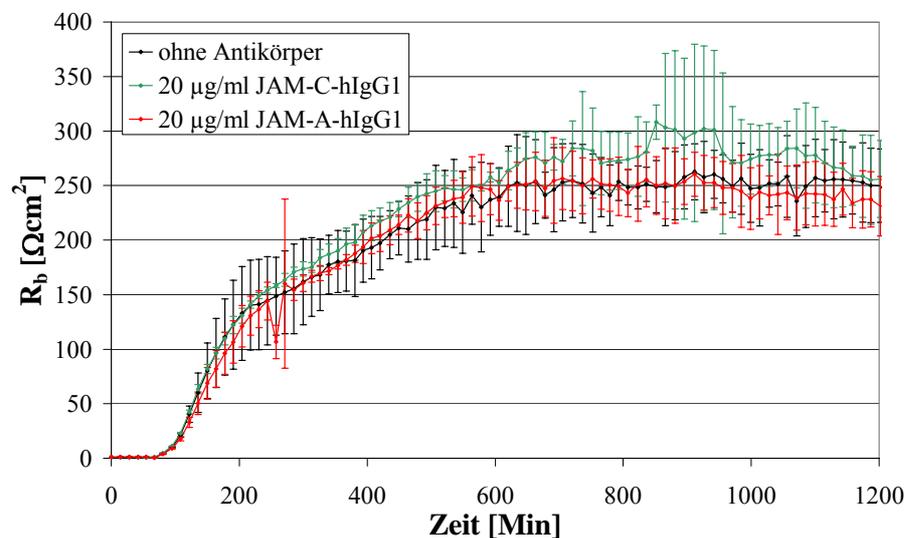


Abb. 45: Das JAM-A-hIgG₁ Fusionsprotein hat keinen Effekt beim Calcium-switch Experiment. CMT Zellen wurden auf ECIS Elektroden Arrays ausgesät und bis zum Erreichen eines konfluenten Monolayers kultiviert. Dann wurden die Zellen mit PBS/5mM EDTA gewaschen und für 3 h in Medium mit $3 \mu\text{M Ca}^{2+}$ kultiviert. Im Anschluss wurde die Kulturflüssigkeit gegen Medium mit $1,8 \text{ mM Ca}^{2+}$ ausgetauscht und der Verlauf der Impedanz mit der Zeit bestimmt. Anschließend wurde ein mathematisches Modell an die Messergebnisse angepasst.

5 Diskussion

Die Kontrolle endothelialer Zellkontakte ist für verschiedene physiologische Prozesse von entscheidender Bedeutung. So ist die Extravasation von Leukozyten im Rahmen des *lymphocyte homing* oder einer Entzündung ein ebenso streng regulierter Prozess wie die Kontrolle der parazellulären Permeabilität oder das Öffnen und Schließen von Zellkontakten bei den zellulären Vorgängen der Angiogenese. Die Suche nach neuen Proteinen und die Charakterisierung bekannter Proteine im endothelialen Zellkontaktbereich tragen zum Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen bei.

Zu Beginn dieser Arbeit war in dieser Arbeitsgruppe bereits mit Hilfe des mAk V1G8 aus Triton-Lysaten der Endotheliomazelllinie bEnd3 ein Protein mit einem Molekulargewicht von 55 kDa immunpräzipitiert worden. Eine mittels MALDI-TOF erhaltene Peptid-Sequenz führte nach einem Vergleich mit NCBI Datenbanken zur Identifizierung eines ESTs, das für ein zu diesem Zeitpunkt unbekanntes Proteins codiert und hohe Homologie zu MCAR aufweist.

Zunächst wurde im Rahmen dieser Arbeit das von dem mAk V1G8 erkannte 55 kDa Protein kloniert sowie dessen Expressionsmuster und zelluläre Lokalisation untersucht. Im weiteren Verlauf wurden funktionelle Analysen durchgeführt. Außerdem wurden pAk gegen das Tight Junction-assoziierte murine JAM-A getestet, um sowohl deren Einfluss auf die transendotheliale Migration von Leukozyten als auch auf den Aufbau von Zellkontakten zu untersuchen.

5.1 Klonierung eines durch den monoklonalen Antikörper V1G8 erkannten Antigens

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein neues endothelspezifisches Transmembranprotein kloniert und charakterisiert, das von dem mAk V1G8 erkannt wird. Die Sequenz umfasst einen ORF von 1185 bp und codiert für ein Protein mit 394 Aminosäuren mit einem abgeleiteten Molekulargewicht von 45,7 kDa. Da mit dem mAk V1G8 ein 55 kDa Protein aus Triton-Lysaten von bEnd3 Zellen präzipitiert wurde, kann von einer posttranslationalen Modifikation ausgegangen werden. Sequenzanalysen sagen ein Signalpeptid mit 29 Aminosäuren und ein putatives Typ I Transmembranprotein mit einer Transmembrandomäne zwischen V₂₅₂ und Y₂₇₄ voraus. Die Extrazellulärdomäne enthält 4 potentielle N-Glykosylierungsmotive, außerdem sind 7 mögliche O-Glykosylierungs- und 21 potentielle Phosphorylierungsstellen identifiziert worden, welche das Molekulargewicht von 55 kDa erklären könnten. Die cytoplasmatische Region umfasst 120 Aminosäuren. Während der Charakterisierung des 1G8 Antigens wurde von der Arbeitsgruppe Quertermous das *endothelial cell-selective adhesion molecule* (ESAM) identifiziert (Hirata

et al., 2001), dessen Sequenz mit dem hier charakterisierten 1G8 Antigen übereinstimmt. Um unnötige Verwirrungen zu vermeiden, wird in dieser Arbeit die Bezeichnung ESAM verwendet.

5.2 ESAM ist Mitglied der CTX Genfamilie

ESAM konnte als neues Mitglied der CTX Genfamilie identifiziert werden, die eine Unterfamilie der Immunglobulin Superfamilie darstellt (Chretien et al., 1998). Charakteristisch für die CTX Genfamilie sind zwei Immunglobulin-Domänen, Membran-distal eine variable V und Membran-proximal eine konstante C2-Domäne. Ein besonderes Kennzeichen von ESAM ist, dass dem Molekül verglichen mit anderen Proteinen der CTX Genfamilie in der variablen V-Domäne die Disulfidbrücke fehlt. Die Sequenzhomologie zwischen ESAM sowie CAR, BT-IgSF und JAM4 ist höher als zu den JAMs. Zudem besitzen die Proteine einen cytoplasmatischen Teil von 107-166 Aminosäuren und C-terminal ein PDZ-Domänen Bindungsmotiv Typ I. Somit konnte gezeigt werden, dass ESAM zusammen mit CAR, BT-IgSF und JAM4 eine Unterfamilie innerhalb der CTX Genfamilie bildet. JAM-A, JAM-B und JAM-C bilden eine weitere Unterfamilie innerhalb der CTX Genfamilie. Ihre cytoplasmatischen Domänen sind mit 39-43 Aminosäuren deutlich kürzer im Vergleich zu ESAM und enden in einem PDZ-Domänen Bindungsmotiv Typ II. Die drei JAM Proteine binden PDZ-Domänen der cytoplasmatischen Proteine ZO-1, ZO-2, ZO-3 sowie AF-6 und ASIP/PAR-3 (Bazzoni et al., 2000; Ebnet et al., 2000; Ebnet et al., 2001; Itoh et al., 2001; Ebnet et al., 2003). Für ESAM konnte in *GST pull-down* Experimenten die Bindung zu keinem dieser cytoplasmatischen Proteine nachgewiesen werden (Ebnet et al., 2003; Nasdala et al., 2002). Durch unterschiedliche PDZ-Domänen Bindungsmotive werden verschiedene cytoplasmatische Proteinkomplexe gebunden, womit voraussichtlich für ESAM eine andere physiologische Funktion als für JAM-A verbunden ist.

Für das zu ESAM homologe CAR ist eine PDZ-Domänen abhängige Bindung an *ligand-of numb protein X* (LNX) gezeigt worden (Sollerbrant et al., 2003). LNX wiederum bindet und reguliert das Expressionsniveau von Numb, das am Schicksal von Zellen während der Entwicklung beteiligt ist (Dho et al., 1998; Knoblich et al., 1997). Deshalb könnte CAR an der Bildung eines funktionellen Komplexes mit LNX und Numb beteiligt sein. Aufgrund desselben PDZ-Domänen Bindungsmotivs wie CAR besteht die Möglichkeit, dass ESAM im Endothel die Funktion des überwiegend epithelial und neuronal exprimierten CAR übernimmt, an LNX bindet und eine entwicklungsphysiologisch wichtige Rolle spielt.

JAM4 besitzt ebenfalls ein PDZ-Domänen Bindungsmotiv Typ I und bindet an die Membran-assoziierte Guanylatkinase MAGI-1 (Hirabayashi et al., 2003). Durch einen Yeast-Two Hybrid Screen wurde in dieser Arbeitsgruppe bereits eine Bindung von ESAM an MAGI-1 gezeigt (Wegmann et al., Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht). Eine Interaktion von MAGI-1 mit den Aktin-bündelnden Proteinen Synaptodopin und α -Actinin-4 deutet auf eine Beteiligung von MAGI-1 an der Dynamik des Aktin-Cytoskeletts in polarisierten Epithelzellen hin (Patrie et al., 2002). Die Bindung von humanem MAGI-1 an den *brain*

angiogenesis inhibitor 1 (BAI1) impliziert eine Beteiligung von ESAM an der Angiogenese. ESAM knock-out Mäuse sind lebensfähig, phänotypisch normal und haben keine offensichtlichen morphologischen Defekte im Gefäßsystem (Ishida et al., 2003). Allerdings zeigen sie ein reduziertes Tumorwachstum und eine verminderte Tumorangiogenese. Somit hat ESAM eine redundante Funktion bei der physiologischen Angiogenese, jedoch eine essentielle Rolle bei der pathologischen Angiogenese.

5.3 ESAM wird spezifisch von Endothelzellen und aktivierten Thrombozyten exprimiert

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ESAM mit verschiedenen Antikörpern aus Triton-Lysaten der Endotheliomazelllinien bEnd3, bEnd5 (nicht gezeigt), MyEnd und 1G11 als 55 kDa Protein präzipitiert werden. In der Epithelzelllinie CMT wurde das Antigen hingegen nicht detektiert.

In der Arbeitsgruppe von Quertermous wurde durch Analysen endothelialer Zelllinien und *in situ* Hybridisierung an Maus-Embryo Schnitten eine endothelspezifische Expression von ESAM festgestellt (Hirata et al., 2001). Im adulten Gewebe hingegen wurde bei *in situ* Hybridisierungen kein spezifisches Signal detektiert. Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte ESAM auf vaskulären Endothelien in allen untersuchten adulten Geweben der Maus (Zunge, Herz, Niere, Gehirn, Darm und Lymphknoten) auf Proteinebene nachgewiesen werden (Nasdala et al., 2002). ESAM ist auf Arteriolen, Venolen, Kapillaren, zudem auf Endocard, Kapillaren der Nierenglomeruli und HEVs lokalisiert, wo Lymphozyten in die Lymphknoten auswandern. ESAM ist auf Epithelien nicht vorhanden, und die endothelspezifische Gewebeverteilung wurde durch gegen die cytoplasmatische oder die extrazelluläre Domäne von ESAM gerichtete pAk bestätigt, um eine Maskierung von ESAM durch post-translationale Modifikationen auszuschließen.

Auch für JAM-B und JAM-C ist eine Lokalisation auf Endothelien in verschiedenen Organen und HEVs beschrieben worden (Cunningham et al., 2000; Palmeri et al., 2000; Aurrand-Lions et al., 2001; Arrate et al., 2001; Liang et al., 2002). JAM-A hingegen ist auf Endothel und Epithel vorhanden (Martin-Padura et al., 1998). Das zu ESAM homologe CAR ist auf neuronalen sowie epithelialen Zellen (Tomko et al., 2000) und HCAR zudem auf HUVECs vorhanden (Carson et al., 1999). JAM4 hingegen ist auf Nierenglomeruli und Epithelzellen des Dünndarms lokalisiert (Hirabayashi et al., 2003). Für JAM-A, JAM-B und JAM-C, die alle auf Endothel exprimiert werden, gibt es Hinweise, dass die Moleküle an der Diapedese von Leukozyten beteiligt sind (Martin-Padura et al., 1998; Del Maschio et al., 1999; Ostermann et al., 2002; Cunningham et al., 2002). Aufgrund der endothelspezifischen Expression von ESAM wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Funktion bei der Extravasation von Leukozyten oder der Kontrolle der parazellulären Permeabilität untersucht. Es gibt aber keine Hinweise auf eine Beteiligung von ESAM bei diesen Prozessen, worauf im Folgenden näher eingegangen wird (Kapitel 5.6, 5.7 und 5.8).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ESAM im interendothelialen Zellkontaktbereich von Endotheliazelllinien wie bEnd5 lokalisiert ist und sich seine Expression durch TNF- α und in Abhängigkeit von der Konfluenz nicht verändert. Die Expression von HCAR nimmt in HUVECs hingegen mit zunehmender Konfluenz zu (Carson et al., 1999). Die physiologische Relevanz dafür ist bisher nicht klar.

Bei FACS-Analysen von Leukozyten konnte auf keiner Leukozyten-Population aus dem peripheren Blut von Mäusen eine ESAM-Expression detektiert werden (Nasdala et al., 2002). Allerdings wurde sowohl auf aktivierten Thrombozyten als auch auf Megakaryozyten ein starkes ESAM Signal detektiert. Das schnelle Erscheinen von ESAM auf der Oberfläche von Thrombozyten nach einer Aktivierung mit Thrombin spricht für eine Speicherung des Proteins in Granula ähnlich wie bei P-Selektin (Hsu-Lin et al., 1984; McEver & Martin, 1984). Allerdings ist P-Selektin in Endothelzellen in Weibel-Palade Körperchen gespeichert und dort nicht wie ESAM konstitutiv exprimiert. Aufgrund seiner Fähigkeit zur homophilen Adhäsion (Kapitel 5.4) könnte ESAM an der Aggregation von Plättchen beteiligt sein. Humanes JAM-A wird konstitutiv auf Neutrophilen, Monozyten, einer Subpopulation von Lymphozyten, Erythrozyten und Thrombozyten exprimiert (Williams et al., 1999; Liu et al., 2000; Sobocka et al., 2000), murines JAM-A konnte nur auf Thrombozyten und dendritischen Zellen detektiert werden (Martin-Padura et al., 1998; Malergue et al., 1998). Eine Expression von humanem ESAM auf Leukozyten ist somit nicht auszuschließen. JAM-A wird im Gegensatz zu murinem ESAM konstitutiv auf Plättchen exprimiert (Malergue et al., 1998; Naik et al., 1995; Sobocka et al., 2000). Die physiologische Funktion von JAM-A auf Thrombozyten ist unklar, aber durch den F11 Antikörper wird eine Aktivierung ausgelöst (Naik et al., 1995; Sobocka et al., 2000), die zur Phosphorylierung von JAM-A führt (Ozaki et al., 2000). JAM-A scheint im Zellkontaktbereich von aggregierten Thrombozyten Cluster zu bilden (Ozaki et al., 2000). Möglicherweise wird JAM-A direkt durch die Protein Kinase C phosphoryliert, und diese Phosphorylierung könnte an der Aktivierung von Plättchen beteiligt sein. Für ESAM sind mit Hilfe von Net Phos verschiedene Phosphorylierungsstellen vorausgesagt worden. ESAM könnte eine Funktion bei der Aggregation von Thrombozyten haben.

5.4 ESAM ist ein Zelladhäsionsmolekül

Proteine der CTX Genfamilie wie JAM-A, JAM-B und JAM-C können homophile Interaktionen *in trans* eingehen, was durch ektopische Expression dieser Moleküle in CHO und MDCK Zellen gezeigt werden konnte (Aurrand-Lions et al., 2001; Aurrand-Lions et al., 2001; Cunningham et al., 2000; Ebnet et al., 2003; Ebnet et al., 2001; Martin-Padura et al., 1998). Zudem spricht eine Proteininteraktion zwischen JAM-B und JAM-C für eine mögliche Beteiligung der Moleküle an der transendothelialen Migration von Leukozyten (Arrate et al., 2001; Liang et al., 2002). Im Verlauf dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ESAM in stabil transfizierten CHO Zellen homophile Bindung *in trans* vermittelt. Es wurde jedoch keine heterophile Interaktion mit MVAR, JAM-A, JAM-B oder JAM-C, die ek-

topisch auf CHO Zellen exprimiert wurden und Proteine der CTX Genfamilie sind, nachgewiesen. Somit konnte keine weitere heterophile Interaktion zwischen den untersuchten Mitgliedern der CTX Genfamilie nachgewiesen werden. Diese wäre beispielsweise zwischen Endothelzellen und zwischen Endothelzellen und Leukozyten denkbar gewesen.

Aufgrund seiner Sequenzhomologie zu JAM-A kann vermutet werden, dass ESAM cis-Dimere bildet, bevor es eine homophile trans-Bindung eingeht (Bazzoni et al., 2000; Kostrewa et al., 2001). Außerdem unterstützt die Transfektion von CHO Zellen mit ESAM eine Ca^{2+} unabhängige Zellaggregation (Hirata et al., 2001; Nasdala et al., 2002). Auch MCAR kann die Bildung von CHO Zellaggregaten unterstützen (Honda et al., 2000). Ektopisch exprimiertes JAM-A auf CHO Zellen kann hingegen nicht an JAM-A-Fc Konstrukt binden, weil vermutlich die homotypische Interaktion eine geringe Affinität besitzt und durch die Cluster-Bildung von JAM-A an Tight Junctions die Avidität erhöht wird (Cunningham et al., 2000).

5.5 ESAM ist ein Tight Junction-assoziiertes Molekül

Ektopisch exprimiertes ESAM mit einem C-terminalen Flag-tag kolokalisiert in caninen epithelialen MDCK II Zellen mit dem über den gesamten Zellkontaktbereich verteilten β -Catenin, und war deshalb zunächst als Adherens Junction-assoziiertes Molekül identifiziert worden (Hirata et al., 2001). Dies stand im Widerspruch zu den subzellulären Lokalisationsdaten, die wir in Kooperation mit Hartwig Wolburg erhielten (Nasdala et al., 2002). Auf Ultradünnschnitten konnte durch Immunogoldmarkierung gezeigt werden, dass ESAM in Blutkapillaren von Muskel und Gehirn mit den Tight Junction-assoziierten Proteinen ZO-1, Claudin-5 und Occludin kolokalisiert. Außerdem wurde ESAM nicht in Bereichen gefunden, die negativ für diese Tight Junction Proteine sind.

Um diesen offensichtlichen Widerspruch zu klären, wurden MDCK C7 Zellen mit ESAM oder ESAM $\Delta 5$, das C-terminal um 5 Aminosäuren verkürzt ist, transfiziert. Die caninen epithelialen MDCK C7 Zellen wurden auf die Ausbildung eines hohen transepithelialen Widerstandes selektiert und sind mit MDCK I Zellen vergleichbar (Gekle et al., 1994; Wunsch et al., 1995). Sowohl ESAM als auch ESAM $\Delta 5$ kolokalisieren im apikalen Bereich der MDCK C7 Zellen mit dem Tight Junction-assoziierten ZO-1 und nicht mit dem Adherens Junction Protein β -Catenin. Somit scheint das PDZ-Domänen Bindungsmotiv, das bei ESAM $\Delta 5$ fehlt und bei Verwendung eines C-terminalen Flag-Tags maskiert wird, in MDCK C7 Zellen nicht zur Rekrutierung von ESAM an die epithelialen Tight Junction benötigt zu werden. Auch in MDCK II Tet-Off Zellen, die einen sehr viel geringeren TER aufbauen als MDCK I Zellen, kolokalisiert ESAM mit ZO-1 und nicht mit β -Catenin. MDCK I Zellen exprimieren im Gegensatz zu MDCK II Zellen kein Claudin 2, dennoch unterscheiden sich die Tight Junction Stränge morphologisch nicht (Furuse et al., 2001). Somit ist die Tight Junction Lokalisation von ESAM weder endothelspezifisch, noch abhängig vom PDZ-Domänen Bindungsmotiv, und sie wird auch nicht vom verwendeten MDCK Typ beeinflusst.

CAR wurde durch Immunogoldmarkierung als Tight Junction-assoziiertes Protein in Epithelzellen identifiziert (Cohen et al., 2001). Im Epithel der Atemwege hingegen ist CAR kurz unterhalb von ZO-1 und mit β -Catenin überlappend lokalisiert (Walters et al., 2002). Auch JAM-A konnte durch Immunogoldmarkierung als Tight Junction Molekül in epitheliale Gewebe identifiziert werden (Martin-Padura et al., 1998). Außerdem wurde JAM-A in Epithelzellen direkt neben Tight Junction Strängen nachgewiesen (Itoh et al., 2001). JAM-C hingegen ist nach ektopischer Expression in MDCK Zellen im apikalen Bereich angereichert (Aurrand-Lions et al., 2001), im Darmepithel jedoch deutlich basolateral und dort nicht mit Tight Junctions, sondern mit Desmosomen assoziiert (Zen et al., 2004).

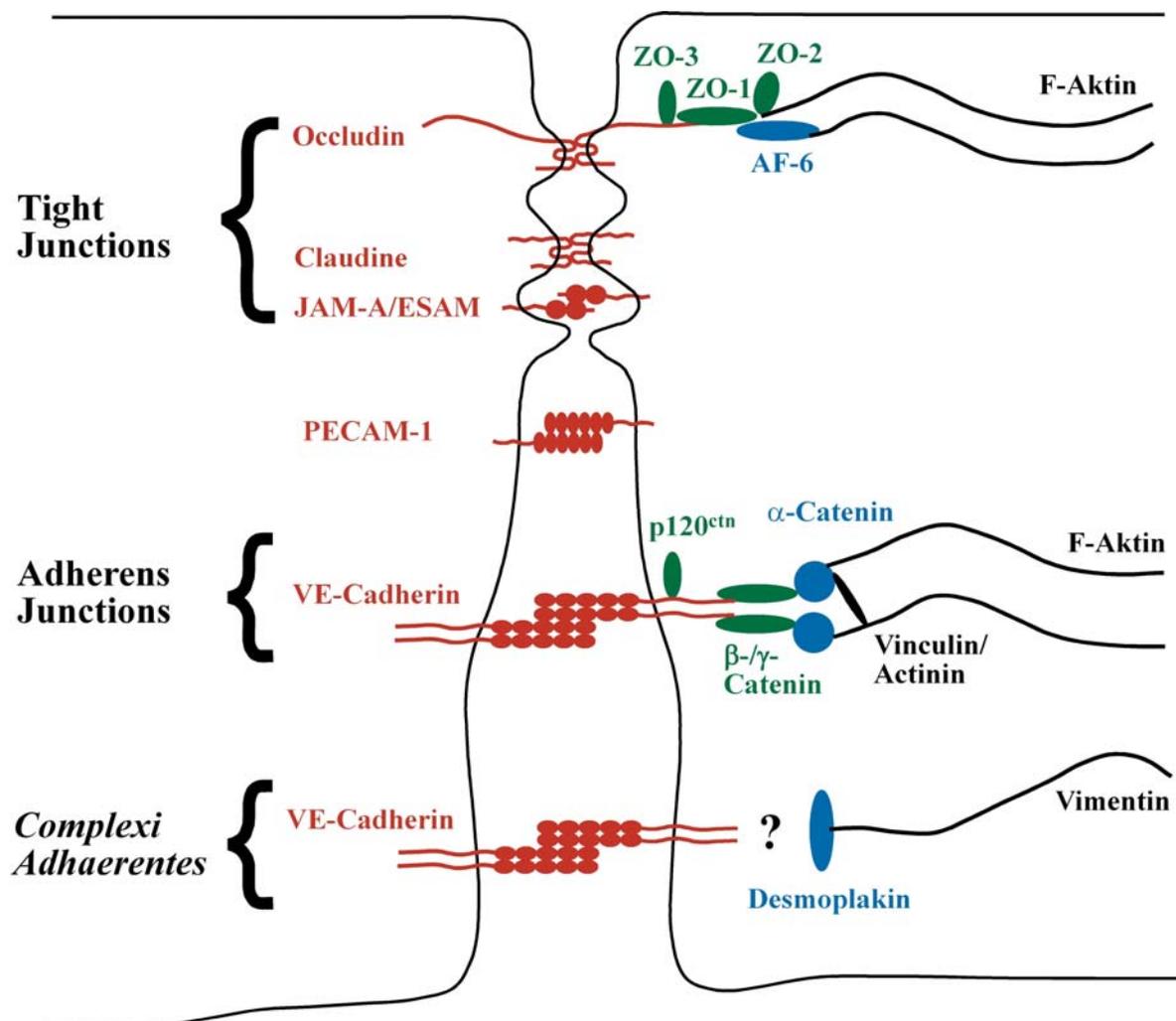


Abb. 46: Ausgewählte Moleküle endothelialer Zellkontakte

Stabil mit ESAM transfizierte MDCK II Tet-Off Zellen mussten nach einer PFA-Fixierung mit Triton-X 100 permeabilisiert werden, um ESAM in der Immunfluoreszenz sichtbar zu machen. Die Zugänglichkeit extrazellulärer Epitope von ESAM für Antikörper wurde vermutlich durch Tight Junction Stränge, die von Occludin und Claudinen gebildet werden, erschwert. Möglicherweise wird ESAM wie JAM-A ebenfalls nicht in diese Proteinstränge eingebunden (Itoh et al., 2001), sondern liegt wie CAR im Epithel der Atemwege direkt unterhalb der Proteinstränge, aber dennoch mit Tight Junctions assoziiert, vor (Walters et al., 2002).

5.6 Einfluss von ESAM auf die Barriereigenschaften von Tight Junctions

Die Assoziation von ESAM mit endothelialen Tight Junctions und seine Fähigkeit, homophile Adhäsion zwischen transfizierten CHO Zellen zu unterstützen, weisen auf eine mögliche Funktion von ESAM bei der Kontrolle interendothelialer Zellkontakte hin.

Ektopisch in CHO Zellen exprimiertes ESAM verursacht keine reproduzierbare Verringerung der Permeabilität von 40 kDa FITC-Dextran im Vergleich zu untransfizierten Zellen. Allerdings kommt es bei der Verwendung verschiedener Subklone zu konträren Ergebnissen. ECIS-Messungen der CHO Transfektanten zeigen keinen Unterschied zwischen ESAM exprimierenden und untransfizierten CHO Zellen, ektopisch exprimiertes VE-Cadherin jedoch erhöht den R_b -Wert signifikant. Da CHO Zellen weder Tight noch Adhärenz Junctions ausbilden, kann die Erhöhung des Parameters R_b mit der Barriereeigenschaft von VE-Cadherin erklärt werden. ESAM ist somit nicht in der Lage, in CHO Zellen eine Diffusionsbarriere zu bilden, obwohl es ein Zelladhäsionsmolekül ist und Aggregation von CHO Transfektanten vermitteln kann.

Auch bei Verwendung von MDCK II Tet-Off Zellen konnte die Expression von ESAM die Permeabilität und den TER des Monolayers nicht verändern, was ebenfalls gegen eine Beteiligung von ESAM an einer parazellulären Diffusionsbarriere spricht.

Ektopisch exprimiertes JAM-A verringert die Permeabilität eines CHO Monolayers (Martin-Padura et al., 1998), während exogenes JAM-A in MDCK Zellen keine Änderung hervorruft (Aurrand-Lions et al., 2001). Für JAM-C sind die Ergebnisse konträr, da die Permeabilität in CHO Transfektanten verringert, in MDCK Transfektanten jedoch erhöht wird (Aurrand-Lions et al., 2001). Auch CAR verringert die parazelluläre Permeabilität in stabil transfizierten CHO Zellen, während ektopisch exprimiertes HCAR in MDCK Zellen den TER erhöht (Cohen et al., 2001). Diese Unterschiede sind vermutlich auf die verschiedenen Zellsysteme zurückzuführen.

5.7 Einfluss von ESAM auf die Zellkontaktbildung

Ein möglicher Einfluss von ESAM auf die Ausbildung von Zellkontakten wurde durch zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze untersucht. Bei dem Aussaat-Experiment wurden stabil mit ESAM transfizierte MDCK II Tet-Off Zellen in hoher Zellzahl ausgesät, damit sie sofort nach dem Spreiten auf der Goldelektrode des ECIS Arrays Zellkontakte aufbauen, ohne dass die normale Zellproliferation dies beeinflussen kann. Die Expression von ESAM hatte keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Zellkontaktbildung und konnte auch die Integrität der Zellkontakte nicht beeinflussen. In einem anderen Versuchsaufbau wurden bestehende Zellkontakte durch einen Calcium-switch geöffnet und der zeitliche Verlauf der Zellkontaktbildung beobachtet. Auch hier konnte ektopisch exprimiertes ESAM weder die Geschwindigkeit des Zellkontaktaufbaus noch die Barriereeigenschaft des Monolayers verändern. Da ESAM im Gegensatz zu JAM-A weder an ZO-1, ZO-2, ZO-3 noch an AF-6 und ASIP/PAR-3 bindet (Bazzoni et al., 2000; Ebnet et al., 2000; Ebnet et al., 2001; Itoh et al., 2001; Ebnet et al., 2003; Nasdala et al., 2002), könnte dies ein weiterer Hinweis darauf sein, dass ESAM am Aufbau der Zellpolarität nicht beteiligt ist.

5.8 Funktion von ESAM bei der Öffnung endothelialer Zellkontakte während der transendothelialen Migration von Leukozyten

Aufgrund seiner Lokalisation im endothelialen Zellkontakt könnte ESAM an der Regulation der transendothelialen Migration von Leukozyten beteiligt sein. In transendothelialen Migrationsstudien mit verschiedenen Leukozyten-Populationen wurde *in vitro* der Einfluss monoklonaler und polyklonaler Antikörper, die gegen die extrazelluläre Domäne von murinem ESAM gerichtet sind, untersucht. Weder bei neutrophilen Granulozyten, noch bei naiven T-Zellen, noch bei autoreaktiven PLP3 T-Zellen konnte eine Inhibition der Migration festgestellt werden. Bei der Verwendung polyklonaler Antikörper ist es wahrscheinlich, dass mögliche funktionelle Epitope gebunden werden. Somit scheint ESAM nicht an der Kontrolle der transendothelialen Migration beteiligt zu sein. Für JAM-A hingegen gibt es widersprüchliche Angaben zu einer Beteiligung. Darauf wird in Kapitel 5.10 näher eingegangen.

Die Bedeutung von ESAM bei der transendothelialen Migration könnte in Abhängigkeit des Gefäßabschnitts oder der Leukozyten-Population variieren. Auch der Entzündungsstimulus könnte eine Rolle spielen, wie die Verwendung des anti-JAM-A mAk BV11 in Meningitismodellen zeigt. Während nach Induktion mit TNF- α und IL-1 β ein inhibitorischer Effekt festgestellt werden kann (Del Maschio et al., 1999), trifft dies für bakteriell oder viral ausgelöste Meningitis nicht zu (Lechner et al., 2000). Bei PECAM-knock-out Mäuse ist die Diapedese nach Injektion von TNF- α normal, aber nach Injektion des Cytokins

IL-1 β ist die Migration durch die subendotheliale Basalmembran blockiert (Thompson et al., 2001). Die bisherigen Ergebnisse der *in vitro* Transmigrationsexperimente sprechen nicht für eine Beteiligung von ESAM an der Diapedese.

5.9 Ausblick für ESAM Studien

Transmembranproteine der Tight Junctions ragen in den parazellulären Spalt. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Proteine eine wichtige Funktion bei der Ausbildung der parazellulären Permeabilität und der Regulation der Leukozytenextravasation haben. Cytoplasmatische, Tight Junction-assoziierte Proteine sind am Aufbau und der Regulation der Zellkontakte beteiligt, an der Verankerung an das Cytoskelett und der Signaltransduktion.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte keine Beteiligung von ESAM an der Kontrolle der Diapedese von Leukozyten oder der vaskulären Permeabilität festgestellt werden. Inzwischen gibt es Hinweise für eine physiologische Bedeutung von ESAM bei der Angiogenese (Ishida et al., 2003) ESAM-knock-out Mäuse sind lebensfähig, phänotypisch normal und haben keinen offenkundigen morphologischen Defekt im Gefäßsystem. Allerdings zeigen sie ein reduziertes Tumorwachstum und verminderte Tumorangio-genese. Deshalb scheint ESAM an der pathologischen, aber nicht an der physiologischen Angiogenese beteiligt zu sein.

Für die weitere Aufklärung der physiologischen Funktion des integralen Transmembranproteins ESAM müssen extra- und intrazelluläre Bindungspartner identifiziert werden. Möglicherweise ist ESAM wie andere Adhäsionsmoleküle an der Signaltransduktion beteiligt.

5.10 JAM-A Antikörper inhibieren die transendotheliale Migration von Granulozyten

Das Tight Junction-assoziierte JAM-A wird in Epithelzellen und Endothelzellen exprimiert (Martin-Padura et al., 1998). Während das humane JAM-A zudem konstitutiv auf Neutrophilen, Monozyten, einer Subpopulation von Lymphozyten, Erythrozyten und Thrombozyten vorhanden ist (Williams et al., 1999; Liu et al., 2000; Sobocka et al., 2000), konnte murines JAM-A zwar auf Thrombozyten und dendritischen Zellen, aber bisher auf keiner Leukozytenpopulation detektiert werden (Martin-Padura et al., 1998; Malergue et al., 1998). Das Expressionsprofil deutet auf einen Einfluss von JAM-A bei der transendothelialen Migration hin, wozu es widersprüchliche Publikationen gibt. Um die Frage zu klären, ob JAM-A tatsächlich eine Rolle bei der Extravasation spielt, wurden pAk gegen die Extrazellulärdomäne von murinem JAM-A auf ihren Einfluß bei der Transmigration von Leukozyten untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte die transendotheliale Migration von Granulozyten mit einem affinitätsgereinigten pAk gegen murines JAM-A in einem *in vitro* Experiment statistisch signifikant um 34% inhibiert werden. Die Konzentrationsabhängigkeit und eine Blockierung auch nach Entfernung ungebundener Antikörper aus dem Versuchsaufbau sprechen für einen spezifischen Effekt. Die Inhibition der transendothelialen Migration von Granulozyten war nicht vollständig. Somit kann JAM-A nicht ausschließlich für die Kontrolle der Diapedese von murinen Granulozyten verantwortlich sein. Mit demselben anti-JAM-A pAk konnte weder die Transmigration von naiven T-Zellen noch von autoreaktiven PLP3-T-Zellen blockiert werden. JAM-A ist somit spezifisch an der transendothelialen Migration von Granulozyten, aber nicht von T-Zellen beteiligt.

Der erste Hinweis für eine Beteiligung von murinem JAM-A an der transendothelialen Migration von Leukozyten wurde durch die Blockierung der Migration von humanen Monozyten durch einen konfluenten murinen Endothelzellrasen mit dem mAk BV11 *in vitro* erbracht (Martin-Padura et al., 1998). Dies wurde *in vivo* durch die Inhibition der Monozyteninfiltration in subkutane Luftpolster nach Chemokingabe und eine reduzierte Extravasation von Leukozyten in die Cerebrospinalflüssigkeit und ins Gehirnparenchym von Mäusen, bei denen durch kombinierte Gabe von TNF- α und IL-1 β eine Meningitis ausgelöst wurde, untermauert (Martin-Padura et al., 1998; Del Maschio et al., 1999). Ein Einfluss von Fc-Rezeptoren auf Leukozyten konnte durch Verwendung von Fab-Fragmenten und einer Isotypkontrolle ausgeschlossen werden. Dieser Effekt konnte in einem durch das lymphozytäre Choriomeningitis Virus oder das Bakterium *Listeria monocytogenes* induzierten murinen Meningitismodell nicht bestätigt werden (Lechner et al., 2000). Die widersprüchlichen Ergebnisse könnten auf unterschiedliche Mechanismen bei der transendothelialen Migration zurückzuführen sein. So werden bei einer infektiösen Meningitis die Cytokine TNF- α und IFN- γ exprimiert, welche in HUVECs zu einer Umverteilung von hu-

manem JAM-A auf die apikale Oberfläche und zur Reduzierung der Transmigration von Neutrophilen führen (Ozaki et al., 1999). Somit wäre ein möglicher adhäsiver Effekt von JAM-A, der zu einer Stabilisierung interendothelialer Zellkontakte führt, nur im experimentellen Meningitismodell vorhanden, wo er mit dem mAk aufgehoben werden könnte.

Zwar induziert die Stimulation mit TNF- α und IFN- γ eine Umverteilung von PECAM-1 und JAM-A aus dem lateralen Zellkontaktbereich, aber per se ist keine negative Regulation der transendothelialen Migration von Neutrophilen und Monozyten unter Strömungsbedingungen *in vitro* festzustellen (Shaw et al., 2001). Verschiedene mAk gegen humanes JAM-A zeigten im Gegensatz zu anti-PECAM-1 mAk keinen Effekt bei der Diapedese unter diesen experimentellen Voraussetzungen. Dies könnte an der Verwendung von mAk liegen, die möglicherweise das funktionelle Epitop, das für Adhäsion und Transmigration von Leukozyten verantwortlich ist, nicht erkennen. Der mAk BV11, der gegen murines JAM-A gerichtet ist, blockiert die Bildung von Dimeren zwischen rekombinantem löslichen JAM-A (Bazzoni et al., 2000).

Bei der transepithelialen und transendothelialen Migration von humanen Neutrophilen auf Filtern *in vitro* konnte mit verschiedenen mAk und einem pAk gegen humanes JAM-A keine Inhibition erzielt werden (Liu et al., 2000). Es konnte aber gezeigt werden, dass unter statischen und physiologischen Strömungsbedingungen humanes JAM-A zur LFA-1 abhängigen transendothelialen Migration von T-Zellen und Neutrophilen beitragen kann (Ostermann et al., 2002). An der Interaktion zwischen humanem JAM-A mit dem Leukozyten-Integrin LFA-1 ist die Membran-proximale Domäne von JAM-A beteiligt, die nicht an der Dimer-Bildung beteiligt ist.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimente bestätigen eine Beteiligung von murinem JAM-A an der transendothelialen Migration von Granulozyten. Bei naiven und autoreaktiven murinen PLP3 T-Zellen hatte derselbe pAk keinen Einfluss. Wegen der vorliegenden *in vitro* Daten scheint murines JAM-A spezifisch an der Diapedese von Granulozyten beteiligt zu sein.

Aufgrund der Ergebnisse mit dem mAk BV11 wird von einer Störung der homophilen Interaktion zwischen leukozytärem und endothelialelem JAM-A ausgegangen. Allerdings konnte mit den bisher verwendeten mAk murines JAM-A auf keiner Leukozyten-Population detektiert werden. Um die Frage zu klären, ob es sich um eine homophile oder um eine heterophile Interaktion handelt, wurden Leukozyten auf die Expression von JAM-A hin untersucht.

5.11 Expression von murinem JAM-A auf Granulozyten

Mit den bisher verwendeten mAk gegen murines JAM-A konnte keine Expression auf Leukozyten detektiert werden (Martin-Padura et al., 1998; Malergue et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte mit einem pAk die Expression von murinem JAM-A auf Granulozyten aus dem peripheren Blut detektiert werden. Diese Diskrepanz zu den vorherigen

Untersuchungen könnte dadurch erklärt werden, dass die verwendeten mAk an Epitope von murinem JAM-A binden, die auf Granulozyten verdeckt sind. So kann beispielsweise Endomucin auf den HEVs lymphatischer Organe nicht mit mAk, sondern nur mit pAk detektiert werden (Samulowitz et al., 2002). Es ist auch nicht auszuschließen, dass die Expression von JAM-A auf Granulozyten eine Kontamination von Thrombozyten darstellt, auf denen JAM-A exprimiert wird (Malergue et al., 1998; Martin-Padura et al., 1998). Allerdings ist dies unwahrscheinlich, weil die Expression von JAM-A auf Thrombozyten sehr viel stärker ist als auf Granulozyten (Daten nicht gezeigt).

Interessanterweise konnte auf den *in vitro* differenzierten Granulozyten aus dem Knochenmark keine JAM-A Expression detektiert werden. Möglicherweise fehlen den Granulozyten für die Differenzierung Signale, die unter physiologischen Umständen zur Expression von murinem JAM-A führen. Da Granulozyten aus dem Knochenmark für den *in vitro* Transmigrationsassay eingesetzt wurden, kann nur eine heterophile Interaktion von JAM-A an der Kontrolle der transendothelialen Migration beteiligt sein. Möglicherweise ist der heterophile Ligand auf Leukozyten das Integrin LFA-1, für das eine Interaktion mit humanem JAM-A nachgewiesen wurde (Ostermann et al., 2002). Ob auch *in vivo* eine heterophile Interaktion von murinem JAM-A für die Kontrolle der transendothelialen Migration verantwortlich ist, muss noch getestet werden. Auch die Beteiligung von Fc-Rezeptoren muss durch Verwendung von Fab-Fragmenten ausgeschlossen werden.

5.12 Einfluss von JAM-A auf den Wiederaufbau der Zellkontakte und die Integrität der Tight Junction

In einem Calcium-switch Experiment konnte mit demselben pAk gegen murines JAM-A der Aufbau des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TER) nicht nur verlangsamt, sondern auch die Integrität des Zellkontakts gestört werden. Liu et al. konnte mit mAk gegen humanes JAM-A ebenfalls einen verzögerten Aufbau des TER messen, allerdings wurde mit demselben mAk keine Inhibition bei transendothelialer und transepithelialer Migration *in vitro* festgestellt (Liu et al., 2000). Interessanterweise konnte weder von Liu (Liu et al., 2000) noch im Rahmen dieser Arbeit mit rekombinantem löslichem JAM-A Fusionsprotein eine Blockierung gezeigt werden. Eine mögliche Ursache wäre eine nicht korrekte Faltung des Fusionsproteins. Es bleibt unklar, weshalb der Parameter R_b , der ein Maß für die Zell-Zell Interaktion ist, bei Verwendung des anti- JAM-A pAk nicht den Maximalwert erreicht. Die gestörte Integrität der Tight Junction ist durch eine sterische Hinderung durch die pAk, Endozytose von JAM-A oder durch einer Quervernetzung von JAM-A auf der Oberfläche, die zu einem outside-in signaling führt, erklärbar.

Literatur

- Aberle, H., Butz, S., Stappert, J., Weissig, H., Kemler, R., & Hoschuetzky, H. (1994). *As Sci.*, 107, 3655-3663.
- Ager, A. (1994). Lymphocyte recirculation and homing: roles of adhesion molecules and chemoattractants. *Trends Cell Biol*, 4(9), 326-333.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2004). *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH-Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (4. Aufl.).
- Ali, J., Liao, F., Martens, E., & Muller, W. A. (1997). Vascular endothelial cadherin (VE-cadherin): cloning and role in endothelial cell-cell adhesion. *Microcirculation*, 4(2), 267-277.
- Allport, J. R., Muller, W. A., & Luscinskas, F. W. (2000). Monocytes induce reversible focal changes in vascular endothelial cadherin complex during transendothelial migration under flow. *J. Cell Biol.*, 148, 203-216.
- Allt, G., & Lawrenson, J. G. (2001). Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs*, 169(1), 1-11.
- Alon, R., Kassner, P. D., Carr, M. W., Finger, E. B., Hemler, M. E., & Springer, T. A. (1995). The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J. Cell Biol.*, 128, 1243-1253.
- Anderson, A. O., & Anderson, N. D. (1976). Lymphocyte emigration from high endothelial venules in rat lymph nodes. *Immunology*, 31(5), 731-748.
- Anderson, J. M., & Van Itallie, C. M. (1995). Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol*, 269(4 Pt 1), G467-475.
- Anderson, J. M., Balda, M. S., & Fanning, A. S. (1993). The structure and regulation of tight junctions. *Curr Opin Cell Biol*, 5(5), 772-778.
- Andersson, S., Davis, D. N., Dählback, H., Jörnvall, H., & Russell, D. W. (1989). Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J. Biol. Chem.*, 264, 8222-8229.
- Arrate, M. P., Rodriguez, J. M., Tran, T. M., Brock, T. A., & Cunningham, S. A. (2001). Cloning of human junctional adhesion molecule 3 (JAM3) and its identification as the JAM2 counter-receptor. *J Biol Chem*, 276(49), 45826-45832.
- Asa, D., Raycroft, L., Ma, L., Aeed, P. A., Kaytes, P. S., Elhammer, A. P., & Geng, J. G. (1995). The P-selectin glycoprotein ligand functions as a common human leukocyte ligand for P- and E-selectins. *J. Biol. Chem.*, 270, 11662-11670.

- Aurrand-Lions, M. A., Duncan, L., Du Pasquier, L., & Imhof, B. A. (2000). Cloning of JAM-2 and JAM-3: an emerging junctional adhesion molecular family? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 251, 91-98.
- Aurrand-Lions, M., Duncan, L., Ballestrem, C., & Imhof, B. A. (2001). JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J Biol Chem*, 276(4), 2733-2741.
- Aurrand-Lions, M., Johnson-Leger, C., Wong, C., Du Pasquier, L., & Imhof, B. A. (2001). Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. *Blood*, 98(13), 3699-3707.
- Babinska, A., Kedees, M. H., Athar, H., Ahmed, T., Batuman, O., Ehrlich, Y. H., Hussain, M. M., & Kornecki, E. (2002). F11-receptor (F11R/JAM) mediates platelet adhesion to endothelial cells: role in inflammatory thrombosis. *Thromb Haemost*, 88(5), 843-850.
- Baggiolini, M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 392, 565-568.
- Baggiolini, M., & Dahinden, C. A. (1994). CC chemokines in allergic inflammation. *Immunol. Today*, 15, 127-133.
- Baumhueter, S., Dybdal, N., Kyle, C., & Lasky, L. A. (1994). Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood*, 84, 2554-2565.
- Bazzoni, G., Martinez-Estrada, O. M., Mueller, F., Nelboeck, P., Schmid, G., Bartfai, T., Dejana, E., & Brockhaus, M. (2000). Homophilic interaction of junctional adhesion molecule. *J Biol Chem*, 275(40), 30970-30976.
- Bazzoni, G., Martinez-Estrada, O. M., Orsenigo, F., Cordenonsi, M., Citi, S., & Dejana, E. (2000). Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem*, 275(27), 20520-20526.
- Behrens, J., von Kries, J. P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., & Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, 382, 638-642.
- Ben-Baruch, A., Michiel, D. F., & Oppenheim, J. J. (1995). Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J Biol Chem*, 270(20), 11703-11706.
- Berg, E. L., Goldstein, L. A., Jutila, M. A., Nakache, M., Picker, L. J., Streeter, P. R., Wu, N. W., Zhou, D., & Butcher, E. C. (1989). Homing receptors and vascular addresses: cell adhesion molecules that direct lymphocyte traffic. *Immunol Rev*, 108, 5-18.
- Berg, E. L., McEvoy, L. M., Berlin, C., Bargatze, R. F., & Butcher, E. C. (1993). L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature*, 366(6456), 695-698.

- Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L., & Finberg, R. W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, 275(5304), 1320-1323.
- Berlin, C., Bargatze, R. F., Campbell, J. J., von Andrian, U. H., Szabo, M. C., Hasslen, S. R., Nelson, R. D., Berg, E. L., Erlandsen, S. L., & Butcher, E. C. (1995). alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell*, 80(3), 413-422.
- Bevilacqua, M. P., Pober, J. S., Mendrick, D. L., Cotran, R. S., & Gimbrone, M. A., Jr. (1987). Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 9238-9242.
- Beyer, E. C. (1993). Gap junctions. *Int Rev Cytol*, 137C, 1-37.
- Bilder, D. (2003). PDZ domain polarity complexes. *Curr Biol*, 13(17), R661-662.
- Bogen, S., Pak, J., Garifallou, M., Deng, X., & Muller, W. A. (1994). Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. *J. Exp. Med.*, 179, 1059-1064.
- Boller, K., Vestweber, D., & Kemler, R. (1985). Cell-adhesion molecule uvomorulin is localized in the intermediate junctions of adult intestinal epithelial cells. *J. Cell. Biol.*, 100, 327-332.
- Breier, G., Breviario, F., Caveda, L., Berthier, R., Schnurch, H., Gotsch, U., Vestweber, D., Risau, W., & Dejana, E. (1996). Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood*, 87(2), 630-641.
- Bruzzone, R., Haefliger, J. A., Gimlich, R. L., & Paul, D. L. (1993). Connexin40, a component of gap junctions in vascular endothelium, is restricted in its ability to interact with other connexins. *Mol Biol Cell*, 4(1), 7-20.
- Burns, A. R., Bowden, R. A., MacDonell, S. D., Walker, D. C., Odebunmi, T. O., Donachie, E. M., Simon, S. I., Entman, M. L., & Smith, C. W. (2000). Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration. *J Cell Sci*, 113 (Pt 1), 45-57.
- Burns, A. R., Walker, D. C., Brown, E. S., Thurmon, L. T., Bowden, R. A., Keese, C. R., Simon, S. I., Entman, M. L., & Smith, C. W. (1997). Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners. *J Immunol*, 159(6), 2893-2903.
- Butcher, E. C., & Picker, L. J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*, 272, 60-66.
- Carlos, T. M., & Harlan, J. M. (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*, 84(7), 2068-2101.

- Carson, S. D., Chapman, N. N., & Tracy, S. M. (1997). Purification of the putative coxsackievirus B receptor from HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 233(2), 325-328.
- Carson, S. D., Hobbs, J. T., Tracy, S. M., & Chapman, N. M. (1999). Expression of the coxsackievirus and adenovirus receptor in cultured human umbilical vein endothelial cells: regulation in response to cell density. *J Virol*, 73(8), 7077-7079.
- Chretien, I., Marcuz, A., Courtet, M., Katevuo, K., Vainio, O., Heath, J. K., White, S. J., & Du Pasquier, L. (1998). CTX, a *Xenopus* thymocyte receptor, defines a molecular family conserved throughout vertebrates. *Eur. J. Immunol.*, 28, 4094-4104.
- Clark, R. A., Alon, R., & Springer, T. A. (1996). CD44 and hyaluronan-dependent rolling interactions of lymphocytes on tonsillar stroma. *J Cell Biol*, 134(4), 1075-1087.
- Claude, P. (1978). Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol*, 39(2-3), 219-232.
- Cohen, C. J., Shieh, J. T., Pickles, R. J., Okegawa, T., Hsieh, J. T., & Bergelson, J. M. (2001). The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 15191-15196.
- Cole, D. E., & Quamme, G. A. (2000). Inherited disorders of renal magnesium handling. *J Am Soc Nephrol*, 11(10), 1937-1947.
- Corada, M., Mariotti, M., Thurston, G., Smith, K., Kunkel, R., Brockhaus, M., Lampugnani, M. G., Martin-Padura, I., Stoppacciaro, A., Ruco, L., McDonald, D. M., Ward, P. A., & Dejana, E. (1999). Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 9815-9820.
- Cunningham, S. A., Arrate, M. P., Rodriguez, J. M., Bjercke, R. J., Vanderslice, P., Morris, A. P., & Brock, T. A. (2000). A novel protein with homology to the junctional adhesion molecule. *J. Biol. Chem.*, 275, 34750-34756.
- Cunningham, S. A., Rodriguez, J. M., Arrate, M. P., Tran, T. M., & Brock, T. A. (2002). JAM2 interacts with alpha4beta1. Facilitation by JAM3. *J Biol Chem*, 277(31), 27589-27592.
- Daniel, J. M., & Reynolds, A. B. (1995). The tyrosine kinase substrate p120cas binds directly to E-cadherin but not to the adenomatous polyposis coli protein or alpha-catenin. *Mol. Cell Biol.*, 15, 4819-4824.
- DeGrendele, H. C., Estess, P., Picker, L. J., & Siegelman, M. H. (1996). CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J. Exp. Med.*, 183, 1119-1130.
- Dejana, E., Bazzoni, G., & Lampugnani, M. G. (1999). Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Exp Cell Res*, 252(1), 13-19.

- Dejana, E., Corada, M., & Lampugnani, M. G. (1995). Endothelial cell-to-cell junctions. *Faseb J*, 9(10), 910-918.
- Del Maschio, A., De Luigi, A., Martin-Padura, I., Brockhaus, M., Bartfai, T., Fruscella, P., Adorini, L., Martino, G., Furlan, R., De Simoni, M. G., & Dejana, E. (1999). Leukocyte recruitment in the cerebrospinal fluid of mice with experimental meningitis is inhibited by an antibody to junctional adhesion molecule (JAM). *J. Exp. Med.*, 190, 1351-1356.
- Dho, S. E., Jacob, S., Wolting, C. D., French, M. B., Rohrschneider, L. R., & McGlade, C. J. (1998). The mammalian numb phosphotyrosine-binding domain. Characterization of binding specificity and identification of a novel PDZ domain-containing numb binding protein, LNX. *J Biol Chem*, 273(15), 9179-9187.
- Diamond, J. M. (1977). Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *Physiologist*, 20(1), 10-18.
- Dong, Q. G., Bernasconi, S., Lostaglio, S., De Calmanovici, R. W., Martin-Padura, I., Breviario, F., Garlanda, C., Ramponi, S., Mantovani, A., & Vecchi, A. (1997). A general strategy for isolation of endothelial cells from murine tissues. Characterization of two endothelial cell lines from the murine lung and subcutaneous sponge implants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17(8), 1599-1604.
- Duncan, G. S., Andrew, D. P., Takimoto, H., Kaufman, S. A., Yoshida, H., Spellberg, J., Luis de la Pompa, J., Elia, A., Wakeham, A., Karan-Tamir, B., Muller, W. A., Senaldi, G., Zukowski, M. M., & Mak, T. W. (1999). Genetic evidence for functional redundancy of Platelet/Endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1-dependent and PECAM-1-independent functions. *J Immunol*, 162(5), 3022-3030.
- Dustin, M. L., Rothlein, R., Bhan, A. K., Dinarello, C. A., & Springer, T. A. (1986). Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol*, 137(1), 245-254.
- Ebnet, K., & Vestweber, D. (1999). Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem Cell Biol*, 112(1), 1-23.
- Ebnet, K., Aurrand-Lions, M., Kuhn, A., Kiefer, F., Butz, S., Zander, K., Meyer zu Brickwedde, M. K., Suzuki, A., Imhof, B. A., & Vestweber, D. (2003). The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *J Cell Sci*, 116(Pt 19), 3879-3891.
- Ebnet, K., Schulz, C. U., Meyer Zu Brickwedde, M. K., Pendl, G. G., & Vestweber, D. (2000). Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J Biol Chem*, 275(36), 27979-27988.

- Ebnet, K., Suzuki, A., Horikoshi, Y., Hirose, T., Meyer Zu Brickwedde, M. K., Ohno, S., & Vestweber, D. (2001). The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *Embo J*, 20(14), 3738-3748.
- Ebnet, K., Suzuki, A., Ohno, S., & Vestweber, D. (2004). Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci*, 117(Pt 1), 19-29.
- Fanning, A. S., & Anderson, J. M. (1996). Protein-protein interactions: PDZ domain networks. *Curr Biol*, 6(11), 1385-1388.
- Fanning, A. S., & Anderson, J. M. (1999). Protein modules as organizers of membrane structure. *Curr Opin Cell Biol*, 11(4), 432-439.
- Fanning, A. S., Jameson, B. J., Jesaitis, L. A., & Anderson, J. M. (1998). The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, 273(45), 29745-29753.
- Fanning, A. S., Ma, T. Y., & Anderson, J. M. (2002). Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1. *Faseb J*, 16(13), 1835-1837.
- Farquhar, M. G., & Palade, G. E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol.*, 17, 375-412.
- Feldmann, H., Bugany, H., Mahner, F., Klenk, H. D., Drenckhahn, D., & Schnittler, H. J. (1996). Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages. *J Virol*, 70(4), 2208-2214.
- Feng, D., Nagy, J. A., Pyne, K., Dvorak, H. F., & Dvorak, A. M. (1998). Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J Exp Med*, 187(6), 903-915.
- Foxall, C., Watson, S. R., Dowbenko, D., Fennie, C., Lasky, L. A., Kiso, M., Hasegawa, A., Asa, D., & Brandley, B. K. (1992). The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide. *J Cell Biol*, 117(4), 895-902.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., & Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.*, 141, 1539-1550.
- Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., & Tsukita, S. (2001). Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol*, 153(2), 263-272.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., & Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.*, 123, 1777-1788.

- Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K., & Tsukita, S. (1998). A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J. Cell Biol.*, 143, 391-401.
- Gallatin, W. M., Weissman, I. L., & Butcher, E. C. (1983). A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature*, 304(5921), 30-34.
- Garrod, D. R. (1986). Desmosomes, cell adhesion molecules and the adhesive properties of cells in tissues. *J Cell Sci Suppl*, 4, 221-237.
- Gautam, N., Olofsson, A. M., Herwald, H., Iversen, L. F., Lundgren-Akerlund, E., Hedqvist, P., Arfors, K. E., Flodgaard, H., & Lindbom, L. (2001). Heparin-binding protein (HBP/CAP37): a missing link in neutrophil-evoked alteration of vascular permeability. *Nat Med*, 7(10), 1123-1127.
- Geiger, B., & Ginsberg, D. (1991). The cytoplasmic domain of adherens-type junctions. *Cell Motil. Cytoskel.*, 20, 1-6.
- Gekle, M., Wunsch, S., Oberleithner, H., & Silbernagl, S. (1994). Characterization of two MDCK-cell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties. *Pflugers Arch*, 428(2), 157-162.
- Giaever, I., & Keese, C. R. (1991). Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(17), 7896-7900.
- Giaever, I., & Keese, C. R. (1993). A morphological biosensor for mammalian cells. *Nature*, 366(6455), 591-592.
- Ginsberg, M. H. (1995). Integrins: dynamic regulation of ligand binding. *Biochem. Soc. Trans.*, 23, 439-446.
- Gotsch, U., Borges, E., Bosse, R., Boggemeyer, E., Simon, M., Mossmann, H., & Vestweber, D. (1997). VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci*, 110 (Pt 5), 583-588.
- Graesser, D., Solowiej, A., Bruckner, M., Osterweil, E., Juedes, A., Davis, S., Ruddle, N. H., Engelhardt, B., & Madri, J. A. (2002). Altered vascular permeability and early onset of experimental autoimmune encephalomyelitis in PECAM-1-deficient mice. *J Clin Invest*, 109(3), 383-392.
- Guan, K. L., & Dixon, J. E. (1991). Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal. Biochem.*, 192, 262-267.
- Gumbiner, B. (1987). Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. *Am J Physiol*, 253(6 Pt 1), C749-758.
- Gumbiner, B. M. (1993). Breaking through the tight junction barrier [comment]. *J. Cell Biol.*, 123, 1631-1633.

- Gumbiner, B. M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, 84(3), 345-357.
- Gumbiner, B., Lowenkopf, T., & Apatira, D. (1991). Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(8), 3460-3464.
- Haas, T. A., & Plow, E. F. (1994). Integrin-ligand interactions: a year in review. *Curr Opin Cell Biol*, 6(5), 656-662.
- Hafezi-Moghadam, A., Thomas, K. L., Prorock, A. J., Huo, Y., & Ley, K. (2001). L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment. *J Exp Med*, 193(7), 863-872.
- Hansen, J. E., Lund, O., Rapacki, K., & Brunak, S. (1997). O-GLYCBASE version 2.0: a revised database of O-glycosylated proteins. *Nucleic Acids Res.*, 25, 278-282.
- Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E. S., Hibbard, J., & Stevenson, B. R. (1998). ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol*, 141(1), 199-208.
- Hattori, R., Hamilton, K. K., Fugate, R. D., McEver, R. P., & Sims, P. J. (1989). Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem*, 264(14), 7768-7771.
- Henderson, R. B., Lim, L. H., Tessier, P. A., Gavins, F. N., Mathies, M., Perretti, M., & Hogg, N. (2001). The use of lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice to determine the role of LFA-1, Mac-1, and alpha4 integrin in the inflammatory response of neutrophils. *J Exp Med*, 194(2), 219-226.
- Herrenknecht, K., Ozawa, M., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Lenter, M., & Kemler, R. (1991). The uvomorulin-anchorage protein alpha catenin is a vinculin homologue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(20), 9156-9160.
- Hirabayashi, S., Tajima, M., Yao, I., Nishimura, W., Mori, H., & Hata, Y. (2003). JAM4, a junctional cell adhesion molecule interacting with a tight junction protein, MAGI-1. *Mol Cell Biol*, 23(12), 4267-4282.
- Hirata, K., Ishida, T., Penta, K., Rezaee, M., Yang, E., Wohlgemuth, J., & Quertermous, T. (2001). Cloning of an immunoglobulin family adhesion molecule selectively expressed by endothelial cells. *J Biol Chem*, 276(19), 16223-16231.
- Hixenbaugh, E. A., Goeckeler, Z. M., Papaiya, N. N., Wysolmerski, R. B., Silverstein, S. C., & Huang, A. J. (1997). Stimulated neutrophils induce myosin light chain phosphorylation and isometric tension in endothelial cells. *Am J Physiol*, 273(2 Pt 2), H981-988.
- Honda, T., Saitoh, H., Masuko, M., Katagiri-Abe, T., Tominaga, K., Kozakai, I., Kobayashi, K., Kumanishi, T., Watanabe, Y. G., Odani, S., & Kuwano, R. (2000). The

- coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain. *Mol. Brain Res*, 77, 19-28.
- Hsu-Lin, S., Berman, C. L., Furie, B. C., August, D., & Furie, B. (1984). A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets. *J Biol Chem*, 259(14), 9121-9126.
- Huang, A. J., Furie, M. B., Nicholson, S. C., Fischbarg, J., Liebovitch, L. S., & Silverstein, S. C. (1988). Effects of human neutrophil chemotaxis across human endothelial cell monolayers on the permeability of these monolayers to ions and macromolecules. *J Cell Physiol*, 135(3), 355-366.
- Huang, A. J., Manning, J. E., Bandak, T. M., Rataou, M. C., Hanser, K. R., & Silverstein, S. C. (1993). Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells. *J Cell Biol*, 120(6), 1371-1380.
- Huelsken, J., & Behrens, J. (2002). The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*, 115(Pt 21), 3977-3978.
- Hulsken, J., Birchmeier, W., & Behrens, J. (1994). E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol*, 127(6 Pt 2), 2061-2069.
- Imai, Y., Singer, M. S., Fennie, C., Lasky, L. A., & Rosen, S. D. (1991). Identification of a carbohydrate-based endothelial ligand for a lymphocyte homing receptor. *J Cell Biol*, 113(5), 1213-1221.
- Ishida, T., Kundu, R. K., Yang, E., Hirata, K., Ho, Y. D., & Quertermous, T. (2003). Targeted disruption of endothelial cell-selective adhesion molecule inhibits angiogenic processes in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 278(36), 34598-34604.
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., & Tsukita, S. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J. Cell Biol.*, 147, 1351-1363.
- Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., Ozaki, H., Kita, T., & Tsukita, S. (2001). Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol*, 154(3), 491-497.
- Jesaitis, L. A., & Goodenough, D. A. (1994). Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *J Cell Biol*, 124(6), 949-961.
- Johnson-Leger, C. A., Aurrand-Lions, M., Beltraminelli, N., Fasel, N., & Imhof, B. A. (2002). Junctional adhesion molecule-2 (JAM-2) promotes lymphocyte transendothelial migration. *Blood*, 100(7), 2479-2486.
- Kennedy, M. B. (1995). Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains. *Trends Biochem Sci*, 20(9), 350.

- Kishimoto, T. K., Jutila, M. A., & Butcher, E. C. (1990). Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(6), 2244-2248.
- Knoblich, J. A. (1997). Mechanisms of asymmetric cell division during animal development. *Curr Opin Cell Biol*, 9(6), 833-841.
- Kostrewa, D., Brockhaus, M., D'Arcy, A., Dale, G. E., Nelboeck, P., Schmid, G., Mueller, F., Bazzoni, G., Dejana, E., Bartfai, T., Winkler, F. K., & Hennig, M. (2001). X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif. *Embo J*, 20(16), 4391-4398.
- Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.*, 15, 8125-8148.
- Kucik, D. F., Dustin, M. L., Miller, J. M., & Brown, E. J. (1996). Adhesion-activating phorbol ester increases the mobility of leukocyte integrin LFA-1 in cultured lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, 97, 2139-2144.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lampugnani, M. G., & Dejana, E. (1997). Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Curr Opin Cell Biol*, 9(5), 674-682.
- Lampugnani, M. G., Resnati, M., Raiteri, M., Pigott, R., Pisacane, A., Houen, G., Ruco, L. P., & Dejana, E. (1992). A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol*, 118(6), 1511-1522.
- Larson, D. M., Wroblewski, M. J., Sagar, G. D., Westphale, E. M., & Beyer, E. C. (1997). Differential regulation of connexin43 and connexin37 in endothelial cells by cell density, growth, and TGF-beta1. *Am J Physiol*, 272(2 Pt 1), C405-415.
- Lasky, L. A., Singer, M. S., Dowbenko, D., Imai, Y., Henzel, W. J., Grimley, C., Fennie, C., Gillett, N., Watson, S. R., & Rosen, S. D. (1992). An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell*, 69(6), 927-938.
- Lechner, F., Sahrbacher, U., Suter, T., Frei, K., Brockhaus, M., Koedel, U., & Fontana, A. (2000). Antibodies to the junctional adhesion molecule cause disruption of endothelial cells and Do not prevent leukocyte influx into the meninges after viral or bacterial infection. *J. Infect Dis.*, 182, 978-982.
- Levinovitz, A., Muhlhoff, J., Isenmann, S., & Vestweber, D. (1993). Identification of a glycoprotein ligand for E-selectin on mouse myeloid cells. *J Cell Biol*, 121(2), 449-459.
- Liang, T. W., Chiu, H. H., Gurney, A., Sidle, A., Tumas, D. B., Schow, P., Foster, J., Klassen, T., Dennis, K., DeMarco, R. A., Pham, T., Frantz, G., & Fong, S. (2002). Vascular endothelial-junctional adhesion molecule (VE-JAM)/JAM 2 interacts with T, NK, and dendritic cells through JAM 3. *J Immunol*, 168(4), 1618-1626.

- Liao, F., Ali, J., Greene, T., & Muller, W. A. (1997). Soluble domain 1 of platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM) is sufficient to block transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Exp Med*, 185(7), 1349-1357.
- Liao, F., Huynh, H. K., Eiroa, A., Greene, T., Polizzi, E., & Muller, W. A. (1995). Migration of monocytes across endothelium and passage through extracellular matrix involve separate molecular domains of PECAM-1. *J Exp Med*, 182(5), 1337-1343.
- Liu, Y., Nusrat, A., Schnell, F. J., Reaves, T. A., Walsh, S., Pochet, M., & Parkos, C. A. (2000). Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J. Cell Sci.*, 113, 2363-2374.
- Lorenzon, P., Vecile, E., Nardon, E., Ferrero, E., Harlan, J. M., Tedesco, F., & Dobrina, A. (1998). Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors. *J Cell Biol*, 142(5), 1381-1391.
- Makarova, O., Roh, M. H., Liu, C. J., Laurinec, S., & Margolis, B. (2003). Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1). *Gene*, 302(1-2), 21-29.
- Malergue, F., Galland, F., Martin, F., Mansuelle, P., Aurrand-Lions, M., & Naquet, P. (1998). A novel immunoglobulin superfamily junctional molecule expressed by antigen presenting cells, endothelial cells and platelets. *Mol Immunol*, 35(17), 1111-1119.
- Mamdouh, Z., Chen, X., Pierini, L. M., Maxfield, F. R., & Muller, W. A. (2003). Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis. *Nature*, 421(6924), 748-753.
- Mantovani, A. (1999). The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol. Today*, 20, 254-257.
- Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D., & Dejana, E. (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cell Biol.*, 142, 117-127.
- McCarthy, K. M., Skare, I. B., Stankewich, M. C., Furuse, M., Tsukita, S., Rogers, R. A., Lynch, R. D., & Schneeberger, E. E. (1996). Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci*, 109 (Pt 9), 2287-2298.
- McEver, R. P., & Martin, M. N. (1984). A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *J Biol Chem*, 259(15), 9799-9804.
- McEver, R. P., Beckstead, J. H., Moore, K. L., Marshall-Carlson, L., & Bainton, D. F. (1989). GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest*, 84(1), 92-99.

- Mohamadzadeh, M., DeGrendele, H., Arizpe, H., Estess, P., & Siegelman, M. (1998). Pro-inflammatory stimuli regulate endothelial hyaluronan expression and CD44/HA-dependent primary adhesion. *J. Clin. Invest.*, 101, 97-108.
- Moog-Lutz, C., Cave-Riant, F., Guibal, F. C., Breau, M. A., Di Gioia, Y., Couraud, P. O., Cayre, Y. E., Bourdoulous, S., & Lutz, P. G. (2003). JAML, a novel protein with characteristics of a junctional adhesion molecule, is induced during differentiation of myeloid leukemia cells. *Blood*, 102(9), 3371-3378.
- Moore, K. L., Stults, N. L., Diaz, S., Smith, D. F., Cummings, R. D., Varki, A., & McEver, R. P. (1992). Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol*, 118(2), 445-456.
- Morgan, S. M., Samulowitz, U., Darley, L., Simmons, D. L., & Vestweber, D. (1999). Biochemical characterization and molecular cloning of a novel endothelial specific sialomucin. *Blood*, 93, 165-175.
- Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K., & Tsukita, S. (1999). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(2), 511-516.
- Muller, W. A. (2002). Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab Invest*, 82(5), 521-533.
- Muller, W. A. (2003). Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol*, 24(6), 327-334.
- Muller, W. A., Ratti, C. M., McDonnell, S. L., & Cohn, Z. A. (1989). A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. *J Exp Med*, 170(2), 399-414.
- Muller, W. A., Weigl, S. A., Deng, X., & Phillips, D. M. (1993). PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med*, 178(2), 449-460.
- Nagafuchi, A., Takeichi, M., & Tsukita, S. (1991). The 102 kd cadherin-associated protein: similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. *Cell*, 65, 849-857.
- Naik, U. P., Ehrlich, Y. H., & Kornecki, E. (1995). Mechanisms of platelet activation by a stimulatory antibody: cross-linking of a novel platelet receptor for monoclonal antibody F11 with the Fc gamma RII receptor. *Biochem J*, 310 (Pt 1), 155-162.
- Nasdala, I., Wolburg-Buchholz, K., Wolburg, H., Kuhn, A., Ebnet, K., Brachtendorf, G., Samulowitz, U., Kuster, B., Engelhardt, B., Vestweber, D., & Butz, S. (2002). A transmembrane tight junction protein selectively expressed on endothelial cells and platelets. *J Biol Chem*, 277(18), 16294-16303.
- Newman, P. J., Berndt, M. C., Gorski, J., White, G. C., 2nd, Lyman, S., Paddock, C., & Muller, W. A. (1990). PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*, 247(4947), 1219-1222.

- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., & Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol*, 161(3), 653-660.
- Ohno, S. (2001). Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Curr Opin Cell Biol*, 13(5), 641-648.
- Ostermann, G., Weber, K. S., Zerneck, A., Schroder, A., & Weber, C. (2002). JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immunol*, 3(2), 151-158.
- Ozaki, H., Ishii, K., Arai, H., Horiuchi, H., Kawamoto, T., Suzuki, H., & Kita, T. (2000). Junctional adhesion molecule (JAM) is phosphorylated by protein kinase C upon platelet activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 276, 873-878.
- Ozaki, H., Ishii, K., Horiuchi, H., Arai, H., Kawamoto, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Kita, T. (1999). Cutting edge: combined treatment of TNF-alpha and IFN-gamma causes redistribution of junctional adhesion molecule in human endothelial cells. *J Immunol*, 163(2), 553-557.
- Pabst, R., & Binns, R. M. (1989). Heterogeneity of lymphocyte homing physiology: several mechanisms operate in the control of migration to lymphoid and non-lymphoid organs in vivo. *Immunol Rev*, 108, 83-109.
- Palmeri, D., van Zante, A., Huang, C. C., Hemmerich, S., & Rosen, S. D. (2000). Vascular Endothelial Junction-associated Molecule, a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily, Is Localized to Intercellular Boundaries of Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.*, 275, 19139-19145.
- Panes, J., & Granger, D. N. (1998). Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology*, 114(5), 1066-1090.
- Patrie, K. M., Drescher A. J., Welihinda, A., Mundel, P., Margolis, B. (2002). Interaction of two actin-binding proteins, synaptopodin and alpha-actinin-4, with the tight junction protein MAGI-1. *J. Biol. Chem.*, 277, 30183-90
- Phillips, M. L., Nudelman, E., Gaeta, F. C., Perez, M., Singhal, A. K., Hakomori, S., & Paulson, J. C. (1990). ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex. *Science*, 250(4984), 1130-1132.
- Pitts, J. D., & Finbow, M. E. (1986). The gap junction. *J Cell Sci Suppl*, 4, 239-266.
- Pober, J. S., Lapierre, L. A., Stolpen, A. H., Brock, T. A., Springer, T. A., Fiers, W., Bevilacqua, M. P., Mendrick, D. L., & Gimbrone, M. A., Jr. (1987). Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. *J Immunol*, 138(10), 3319-3324.

- Polacek, D., Bech, F., McKinsey, J. F., & Davies, P. F. (1997). Connexin43 gene expression in the rabbit arterial wall: effects of hypercholesterolemia, balloon injury and their combination. *J Vasc Res*, 34(1), 19-30.
- Ponting, C. P. (1997). Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein Sci*, 6(2), 464-468.
- Preece, G., Murphy, G., & Ager, A. (1996). Metalloproteinase mediated regulation of L-selectin levels on leucocytes. *J. Biol. Chem.*, 271, 11634-11640.
- Raschperger, E., Engstrom, U., Pettersson, R. F., & Fuxe, J. (2004). CLMP, a novel member of the CTX family and a new component of epithelial tight junctions. *J Biol Chem*, 279(1), 796-804.
- Rigby, S., & Dailey, M. O. (2000). Traffic of L-selectin-negative T cells to sites of inflammation. *Eur J Immunol*, 30(1), 98-107.
- Roh, M. H., Liu, C. J., Laurinec, S., & Margolis, B. (2002). The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight junctions. *J Biol Chem*, 277(30), 27501-27509.
- Roh, M. H., Makarova, O., Liu, C. J., Shin, K., Lee, S., Laurinec, S., Goyal, M., Wiggins, R., & Margolis, B. (2002). The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J Cell Biol*, 157(1), 161-172.
- Romer, L. H., McLean, N. V., Yan, H. C., Daise, M., Sun, J., & DeLisser, H. M. (1995). IFN-gamma and TNF-alpha induce redistribution of PECAM-1 (CD31) on human endothelial cells. *J Immunol*, 154(12), 6582-6592.
- Russ, G. (1983). [Preparation and use of monoclonal antibodies]. *Bratisl Lek Listy*, 80(3), 257-266.
- Saitou, M., Fujimoto, K., Doi, Y., Itoh, M., Fujimoto, T., Furuse, M., Takano, H., Noda, T., & Tsukita, S. (1998). Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J. Cell Biol.*, 141, 397-408.
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J. D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., & Tsukita, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell*, 11(12), 4131-4142.
- Sako, D., Chang, X. J., Barone, K. M., Vachino, G., White, H. M., Shaw, G., Veldman, G. M., Bean, K. M., Ahern, T. J., Furie, B., & et al. (1993). Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell*, 75(6), 1179-1186.
- Salmi, M., & Jalkanen, S. (1997). How Do Lymphocytes Know Where to Go: Current Concepts and Enigmas of Lymphocyte Homing. *Adv. Immunol.*, 64, 139-218.
- Samulowitz, U., Kuhn, A., Brachtendorf, G., Nawroth, R., Braun, A., Bankfalvi, A., Bockler, W., & Vestweber, D. (2002). Human endomucin: distribution pattern, expres-

- sion on high endothelial venules, and decoration with the MECA-79 epitope. *Am J Pathol*, 160(5), 1669-1681.
- Santoso, S., Sachs, U. J., Kroll, H., Linder, M., Ruf, A., Preissner, K. T., & Chavakis, T. (2002). The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J Exp Med*, 196(5), 679-691.
- Sasseti, C., Tangemann, K., Singer, M. S., Kershaw, D. B., & Rosen, S. D. (1998). Identification of podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin: parallels to CD34. *J. Exp. Med.*, 187, 1965-1975.
- Schenkel, A. R., Mamdouh, Z., Chen, X., Liebman, R. M., & Muller, W. A. (2002). CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat Immunol*, 3(2), 143-150.
- Schmelz, M., & Franke, W. W. (1993). Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: the syndesmos connecting retothelial cells of lymph nodes. *Eur J Cell Biol*, 61(2), 274-289.
- Schmelz, M., Moll, R., Kuhn, C., & Franke, W. W. (1994). Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: II. Different types of lymphatic vessels. *Differentiation*, 57(2), 97-117.
- Schmidt, A., Heid, H. W., Schafer, S., Nuber, U. A., Zimbelmann, R., & Franke, W. W. (1994). Desmosomes and cytoskeletal architecture in epithelial differentiation: cell type-specific plaque components and intermediate filament anchorage. *Eur J Cell Biol*, 65(2), 229-245.
- Schneeberger, E. E., & Lynch, R. D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286(6), C1213-1228.
- Schwarz, M. A., Owaribe, K., Kartenbeck, J., & Franke, W. W. (1990). Desmosomes and hemidesmosomes: constitutive molecular components. *ann. rev. Cell Biol.*, 6, 461-491.
- Setiadi, H., Disdier, M., Green, S. A., Canfield, W. M., & McEver, R. P. (1995). Residues throughout the cytoplasmic domain affect the internalization efficiency of P-selectin. *J Biol Chem*, 270(45), 26818-26826.
- Shaw, S. K., Bamba, P. S., Perkins, B. N., & Luscinskas, F. W. (2001). Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J Immunol*, 167(4), 2323-2330.
- Shaw, S. K., Perkins, B. N., Lim, Y. C., Liu, Y., Nusrat, A., Schnell, F. J., Parkos, C. A., & Luscinskas, F. W. (2001). Reduced expression of junctional adhesion molecule and platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) at human vascular endothelial junctions by cytokines tumor necrosis factor-alpha plus interferon-gamma Does not reduce leukocyte transmigration under flow. *Am J Pathol*, 159(6), 2281-2291.

- Shibamoto, S., Hayakawa, M., Takeuchi, K., Hori, T., Miyazawa, K., Kitamura, N., Johnson, K. R., Wheelock, M. J., Matsuyoshi, N., Takeichi, M., & et al. (1995). Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes. *J Cell Biol.*, 128, 949-957.
- Shimizu, Y., Rose, D. M., & Ginsberg, M. H. (1999). Integrins in the immune system. *Adv. Immunol.*, 72, 325-380.
- Simionescu, M. (2000). Morphogenesis of endothelium. Harwood Academic, Amsterdam, Ch. 1.
- Simionescu, M., Simionescu, N., & Palade, G. E. (1975). Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. The microvasculature. *J Cell Biol*, 67(3), 863-885.
- Simionescu, M., Simionescu, N., & Palade, G. E. (1976). Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. Arteries and veins. *J Cell Biol*, 68(3), 705-723.
- Simionescu, N., & Simionescu, M. (1991). Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. A look from cell biology. *Cell Biol. Rev.*, 25, 5-80.
- Sobočka, M. B., Sobocki, T., Banerjee, P., Weiss, C., Rushbrook, J. I., Norin, A. J., Hartwig, J., Salifu, M. O., Markell, M. S., Babinska, A., Ehrlich, Y. H., & Kornecki, E. (2000). Cloning of the human platelet F11 receptor: a cell adhesion molecule member of the immunoglobulin superfamily involved in platelet aggregation. *Blood*, 95, 2600-2609.
- Sollerbrant, K., Raschperger, E., Mirza, M., Engstrom, U., Philipson, L., Ljungdahl, P. O., & Pettersson, R. F. (2003). The Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) forms a complex with the PDZ domain-containing protein ligand-of-*numb* protein-X (LNX). *J Biol Chem*, 278(9), 7439-7444.
- Songyang, Z., Fanning, A. S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S. M., Chishti, A. H., Crompton, A., Chan, A. C., Anderson, J. M., & Cantley, L. C. (1997). Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science*, 275, 73-77.
- Springer, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*, 76, 301-314.
- Steedmaier, M., Levinovitz, A., Isenmann, S., Borges, E., Lenter, M., Kocher, H. P., Kleuser, B., & Vestweber, D. (1995). The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature*, 373(6515), 615-620.
- Steinbuch, M., & Audran, R. (1969). The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Arch Biochem Biophys*, 134(2), 279-284.
- Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S., & Goodenough, D. A. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol*, 103(3), 755-766.

- Straight, S. W., Shin, K., Fogg, V. C., Fan, S., Liu, C. J., Roh, M., & Margolis, B. (2004). Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects. *Mol Biol Cell*, 15(4), 1981-1990.
- Stuiver, I., & O'Toole, T. E. (1995). Regulation of integrin function and cellular adhesion. *Stem Cells*, 13(3), 250-262.
- Suzu, S., Hayashi, Y., Harumi, T., Nomaguchi, K., Yamada, M., Hayasawa, H., & Motoyoshi, K. (2002). Molecular cloning of a novel immunoglobulin superfamily gene preferentially expressed by brain and testis. *Biochem Biophys Res Commun*, 296(5), 1215-1221.
- Takai, Y., & Nakanishi, H. (2003). Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J Cell Sci*, 116(Pt 1), 17-27.
- Takeda, K., Kaisho, T., & Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, 21, 335-376.
- Takei, F. (1985). Inhibition of mixed lymphocyte response by a rat monoclonal antibody to a novel murine lymphocyte activation antigen (MALA-2). *J. Immunol.*, 134, 1403-1407.
- Tanaka, Y., Adams, D. H., & Shaw, S. (1993). Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol Today*, 14(3), 111-115.
- Tanentzapf, G., & Tepass, U. (2003). Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. *Nat Cell Biol*, 5(1), 46-52.
- Thompson, R. D., Noble, K. E., Larbi, K. Y., Dewar, A., Duncan, G. S., Mak, T. W., & Nourshargh, S. (2001). Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)-deficient mice demonstrate a transient and cytokine-specific role for PECAM-1 in leukocyte migration through the perivascular basement membrane. *Blood*, 97(6), 1854-1860.
- Tomko, R. P., Johansson, C. B., Totrov, M., Abagyan, R., Frisen, J., & Philipson, L. (2000). Expression of the adenovirus receptor and its interaction with the fiber knob. *Exp Cell Res*, 255(1), 47-55.
- Tomko, R. P., Xu, R., & Philipson, L. (1997). HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(7), 3352-3356.
- Tsukita, S., & Furuse, M. (1999). Occludin and claudins in tight junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol.*, 9, 268-273.
- Tsukita, S., Furuse, M., & Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(4), 285-293.

- Tsukita, S., Tsukita, S., Nagafuchi, A., & Yonemura, S. (1992). Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 4, 834-839.
- Vaccaro, P., & Dente, L. (2002). PDZ domains: troubles in classification. *FEBS Lett*, 512(1-3), 345-349.
- Valiron, O., Chevrier, V., Usson, Y., Breviario, F., Job, D., & Dejana, E. (1996). Desmoplakin expression and organization at human umbilical vein endothelial cell-to-cell junctions. *J Cell Sci*, 109 (Pt 8), 2141-2149.
- van Kooyk, Y., Weder, P., Heije, K., & Figdor, C. G. (1994). Extracellular Ca²⁺ modulates leukocyte function-associated antigen-1 cell surface distribution on T lymphocytes and consequently affects cell adhesion. *J. Cell Biol.*, 124, 1061-1070.
- van Raaij, M. J., Chouin, E., van der Zandt, H., Bergelson, J. M., & Cusack, S. (2000). Dimeric structure of the coxsackievirus and adenovirus receptor D1 domain at 1.7 Å resolution. *Structure Fold Des*, 8(11), 1147-1155.
- Vestweber, D., & Blanks, J. E. (1999). Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev*, 79(1), 181-213.
- Vestweber, D., & Kemler, R. (1985). Identification of a putative cell adhesion domain of uvomorulin. *EMBO J.*, 4, 3393-3398.
- Walters, R. W., Freimuth, P., Moninger, T. O., Ganske, I., Zabner, J., & Welsh, M. J. (2002). Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell*, 110(6), 789-799.
- Walz, G., Aruffo, A., Kolanus, W., Bevilacqua, M., & Seed, B. (1990). Recognition by ELAM-1 of the sialyl-Lex determinant on myeloid and tumor cells. *Science*, 250(4984), 1132-1135.
- Ward, S. G., Bacon, K., & Westwick, J. (1998). Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. *Immunity*, 9, 1-11.
- Wegener, J., Keese, C. R., & Giaever, I. (2000). Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces. *Exp Cell Res*, 259(1), 158-166.
- Wellicome, S. M., Thornhill, M. H., Pitzalis, C., Thomas, D. S., Lanchbury, J. S., Panayi, G. S., & Haskard, D. O. (1990). A monoclonal antibody that detects a novel antigen on endothelial cells that is induced by tumor necrosis factor, IL-1, or lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, 144, 2558-2565.
- Wessel, D., & Flugge, U. I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*, 138(1), 141-143.

- Wiedle, G., Dunon, D., & Imhof, B. A. (2001). Current concepts in lymphocyte homing and recirculation. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 38(1), 1-31.
- Williams, L. A., Martin-Padura, I., Dejana, E., Hogg, N., & Simmons, D. L. (1999). Identification and characterisation of human Junctional Adhesion Molecule (JAM). *Mol Immunol*, 36(17), 1175-1188.
- Wunsch, S., Gekle, M., Kersting, U., Schuricht, B., & Oberleithner, H. (1995). Phenotypically and karyotypically distinct Madin-Darby canine kidney cell clones respond differently to alkaline stress. *J Cell Physiol*, 164(1), 164-171.
- Zen, K., Babbin, B. A., Liu, Y., Whelan, J. B., Nusrat, A., & Parkos, C. A. (2004). JAM-C is a Component of Desmosomes and a Ligand for CD11b/CD18 - mediated Neutrophil Transepithelial Migration. *Mol Biol Cell*.
- Zollner, O., Lenter, M. C., Blanks, J. E., Borges, E., Steegmaier, M., Zerwes, H. G., & Vestweber, D. (1997). L-selectin from human, but not from mouse neutrophils binds directly to E-selectin. *J Cell Biol*, 136(3), 707-716.

Lebenslauf

Persönliches

Name: Ines Nasdala
 Geburtsdatum: 11.05.1974
 Geburtsort: Hannover
 Eltern: Hans Nasdala und Siglinde Nasdala, geb. Bracke
 Familienstand: ledig

Schule, Ausbildung, Beruf

1979 – 1986 Peter-Petersen-Schule in Hannover
 (Vor- und Grundschule, Orientierungsstufe)
 1986 – 1993 Bismarckschule Hannover (Gymnasium)
 1993 Abitur
 Okt. 1993 – Dez. 1999 Biochemie-Studium an der Universität Hannover
 Sept. 1996 – Juli 1997 Einjähriger Studienaufenthalt an der Michigan
 Technological University (MTU), Houghton, USA
 (finanziert durch Fulbright-Reisestipendium sowie
 Vollstipendium der MTU)
 Juni – Dez. 1999 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Karl Bauer
 MPI für experimentelle Endokrinologie
 Thema: Biochemische Analyse einer kongenital hypothyroi-
 den Mausmutante
 seit Juli 2000 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Zellbiologie
 (ZMBE) bei Prof. Dr. Dietmar Vestweber in Münster

Münster, den 30.06.2004

Publikationsliste

Teile dieser Dissertation sind wie folgt veröffentlicht:

Ines Nasdala, Karen Wolburg-Buchholz, Hartwig Wolburg, Annegret Kuhn, Klaus Ebnet, Gertrud Brachtendorf, Ulrike Samulowitz, Bernhard Kuster, Britta Engelhardt, Dietmar Vestweber, and Stefan Butz

A Transmembrane Tight Junction Protein Selectively Expressed on Endothelial Cells and Platelets

Journal of Biological Chemistry, 2002, Vol. 277, pp.16294-16303